

## Tesis de Posgrado

# Quimioluminiscencia y lipoperoxidación en hígado de mamíferos en condiciones fisiológicas y de estrés oxidativo

Fraga, César Guillermo

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Fraga, César Guillermo. (1985). Quimioluminiscencia y lipoperoxidación en hígado de mamíferos en condiciones fisiológicas y de estrés oxidativo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1921\\_Fraga.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1921_Fraga.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Fraga, César Guillermo. "Quimioluminiscencia y lipoperoxidación en hígado de mamíferos en condiciones fisiológicas y de estrés oxidativo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1921\\_Fraga.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1921_Fraga.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

QUIMIOLUMINISCENCIA Y LIPOPEROXIDACION EN HIGADO DE MAMIFEROS  
EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y DE ESTRES OXIDATIVO

CESAR GUILLERMO FRAGA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO BOVERIS

LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO DE QUIMICA Y FISICOQUIMICA BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1985

N.º 1921

1921  
Ej 2

A mis padres

A Patricia

A Ignacio

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Boveris por haberme brindado la oportunidad de iniciar mi formación científica junto a una persona de sus cualidades humanas e intelectuales. Asimismo le agradezco la dirección de este trabajo de Tesis, el constante apoyo científico y su amistad.

A los Dres. Alcides F. Rega y Alejandro C. Paladini por haberme permitido realizar esta Tesis en la Orientación Fisicoquímica del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas.

Al Dr. Osvaldo R. Koch por la asistencia brindada en la realización de proyectos conjuntos.

A los Dres. Jorge D. Coussio y Rubén Rondina por el uso del equipo de microcomputación del IQIMEFA, con el cual fue escrita esta Tesis.

A la Dra. Alcira M. del C. Batlle por sus oportunos consejos para la elección de los cursos de postgrado seguidos.

A Haydée Vicencio por su incondicional asistencia y afecto.

A todos mis compañeros de Fisicoquímica y a Natalio Kotliar por la colaboración brindada durante estos años tanto en el plano científico como personal.

A los Laboratorios Gador por la impresión de los ejemplares de esta Tesis.

El texto de esta Tesis ha sido escrito con un impresor EPSON Mx 80 comandado por una microcomputadora Apple II Plus, usando el programa Homeword. Este programa no tiene capacidad para escribir acentos, símbolo de grados, etc., motivo por el cual estos signos fueron agregados a mano y seguramente algunos habrán pasado desapercibidos. El sistema empleado tampoco tiene capacidad para insertar supra o subíndices por lo que en muchas fórmulas químicas, los números aparecen en el mismo renglón que los símbolos químicos (por ejemplo, H<sub>2</sub>O en lugar de H<sub>2</sub>O).

Los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados total o parcialmente según el siguiente detalle:

Chemiluminescence of the in situ rat liver after acute ethanol intoxication. Effect of (+)-cyanidanol-3. Videla, L.A., Fraga, C.G., Koch, O.R. y Boveris, A. Biochem.Pharmacol. 32:2822-2825 (1983)

Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. Boveris, A., Fraga, C.G., Varsavsky, A.I. y Koch, O.R. Arch.Biochem.Biophys. 227: 534-541 (1983)

Increased carbon tetrachloride-stimulated chemiluminescence in the in situ liver of barbital-treated mice. Fraga, C.G., Llesuy, S.F. y Boveris, A. Acta Physiol.Pharmacol.Latinoam. 34:143-150 (1984)

Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. Boveris, A., Llesuy, S.F. y Fraga, C.G. J.Free Radicals Biol.Med. 1:131-138 (1985)

In situ liver chemiluminescence under physiological conditions and situations of oxidative stress. Fraga, C.G., Llesuy, S.F., Koch, O.R. y Boveris, A. Acta Med.Rom. (en prensa)

## ABREVIATURAS

BOOH	Hidroperóxido de t-butilo
RH	Acido graso poliinsaturado
R <sup>•</sup>	Radical libre de ácido graso poliinsaturado
ROOH	Hidroperóxido de ácido graso poliinsaturado
ROO <sup>•</sup>	Radical libre del hidroperóxido de ácido graso poliinsaturado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
RO*	Grupo carbonilo excitado

# Indice

## INTRODUCCION

1.1.	Oxígeno y radicales libres en sistemas biológicos	1
1.2.	Química del oxígeno	2
1.2.1.	Oxígeno molecular	2
1.2.2.	Productos de la reducción del oxígeno	4
1.3.	Radicales libres	5
1.3.1.	Etapa de iniciación	5
1.3.2.	Etapa de propagación	6
1.3.3.	Etapa de terminación	7
1.4.	Radicales libres en sistemas biológicos	7
1.5.	Peroxidación lipídica	9
1.5.1.	Evaluación de la peroxidación lipídica <u>in vitro</u>	12
1.5.1.1.	Formación de malondialdehído	13
1.5.1.2.	Consumo de oxígeno	13
1.5.1.3.	Formación de dienos conjugados	13
1.5.2.	Evaluación de la peroxidación lipídica <u>in vivo</u>	14
1.5.2.1.	Quimioluminiscencia de baja intensidad de sistemas biológicos	14
1.5.2.2.	Exhalación de alcanos	16
1.5.2.3.	Liberación de glutatión	16
1.6.	Defensas antioxidantes	17
1.6.1.	Enzimas antioxidantes	17
1.6.1.1.	Superóxido dismutasa	17
1.6.1.2.	Catalasa	18
1.6.1.3.	Glutatión peroxidasa	19
1.6.2.	Sustancias antioxidantes	21
1.6.2.1.	Glutatión	21
1.6.2.2.	Vitamina E	22
1.6.2.3.	Vitamina C	24
1.6.2.4.	Vitamina A	24



1.6.2.5.	β-caroteno	24
1.6.2.6.	Polifenoles vegetales	25
1.7.	Estrés oxidativo	26
1.7.1.	Hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono	27
1.7.2.	Hepatotoxicidad del etanol	30
1.8.	Trabajo desarrollado en esta Tesis	31

## MATERIALES Y METODOS

2.1.	Contador de fotones	34
2.1.1.	Fotomultiplicador	35
2.1.2.	Fuente de alto voltaje	37
2.1.3.	Amplificador-discriminador	37
2.1.4.	Enfriador	39
2.1.5.	Contador de frecuencia y registrador	39
2.1.6.	Caja hermética	40
2.2.	Medida de quimioluminiscencia	41
2.2.1.	Medida de quimioluminiscencia de hígado <u>in situ</u>	41
2.2.2.	Medida de quimioluminiscencia de fracciones subcelulares	43
2.3.	Fraccionamiento subcelular	44
2.4.	Animales y tratamientos	46
2.4.1.	Intoxicación con tetracloruro de carbono	46
2.4.2.	Tratamiento con barbital	46
2.4.3.	Intoxicación con etanol	46
2.4.3.1.	Intoxicación aguda	46
2.4.3.2.	Intoxicación crónica	47
2.4.4.	Deficiencia en vitamina E y selenio	48
2.4.5.	Efecto antioxidante de polifenoles vegetales	48
2.5.	Actividades enzimáticas	49
2.5.1.	Superóxido dismutasa	49

2.5.2.	Catalasa	52
2.5.3.	Glutati3n peroxidasa	53
2.5.4.	Enzimas marcadoras de da1o hep1tico	54
2.6.	Otras determinaciones	54
2.6.1.	Medida de la producci3n de an3n super3xido	54
2.6.2.	Medida del contenido de glutati3n	55
2.6.3.	Medida de la formaci3n de malondialdeh3do	56
2.6.4.	Medida de la formaci3n de dienos conjugados	57
2.6.5.	Determinaci3n de prote3nas	57
2.7.	Drogas y reactivos	57
2.7.1.	Polifenoles vegetales	57
2.7.2.	Drogas y reactivos comerciales	58
2.8.	Estadística y expresi3n de los resultados	60

## RESULTADOS

3.	Quimioluminiscencia de sistemas biol3gicos	61
3.1.	Determinaci3n de las condiciones 3ptimas de funcionamiento del contador de fotones	61
3.1.1.	Voltaje aplicado	61
3.1.2.	Rango de discriminaci3n	62
3.1.3.	Eficiencia del contador de fotones	64
3.1.3.1.	Quimioluminiscencia de semillas de soja	64
3.1.3.2.	Quimioluminiscencia del sistema citocromo c-per3xido de hidr3geno	64
3.2.	Quimioluminiscencia de h3gado	65
3.2.1.	Quimioluminiscencia de h3gado medida <u>in situ</u>	65
3.2.1.1.	Emisi3n espont1nea de h3gado de rata y rat3n	65
3.2.1.2.	Espesor activo de emisi3n	67
3.2.1.3.	An1lisis espectral de la quimioluminiscencia espont1nea	69

3.2.2.	Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares de hígado	71
4.	Intoxicación con tetracloruro de carbono	74
4.1.	Quimioluminiscencia de hígado de ratón	74
4.1.1.	Emisión espontánea del hígado	74
4.1.2.	Emisión espontánea del hígado de raton determinada en forma transcutánea	76
4.1.3.	Análisis espectral de la emisión estimulada por tetracloruro de carbono	77
4.2.	Efecto del barbital sódico sobre el hígado de ratón	77
4.2.1.	Masa hepática y microsomal	77
4.2.2.	Quimioluminiscencia de hígado de ratón	78
4.2.3.	Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares iniciada por hidroperóxido de t-butilo	82
4.2.4.	Actividad de las enzimas antioxidantes	84
5.	Intoxicación con etanol	86
5.1.	Intoxicación crónica	86
5.1.1.	Efectos nutricionales de las dietas	86
5.1.2.	Contenido proteico del hígado	86
5.1.3.	Quimioluminiscencia espontánea del hígado	88
5.1.4.	Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares	89
5.1.5.	Producción microsomal de anión superóxido	92
5.1.6.	Actividad de superóxido dismutasa	95
5.2.	Intoxicación aguda	95
5.2.1.	Quimioluminiscencia espontánea del hígado	95
5.2.2.	Formación de malondialdehido	96
5.2.3.	Formación de dienos conjugados	97
6.	Deficiencias en vitamina E y selenio	99
6.1.	Efectos de las dietas sobre el crecimiento	99

6.2.	Sobrevida y necrosis	100
6.2.1.	Actividad de las enzimas marcadoras de lesión hepática	101
6.3.	Quimioluminiscencia espontánea de hígado	102
6.4.	Actividad de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa	103
7.	Efecto de polifenoles sobre la quimioluminiscencia del hígado	107
7.1.	Quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado	107
7.1.1.	Solubilización de los polifenoles	107
7.1.2.	Efecto de los polifenoles sobre la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de ratón	108
7.2.	Efecto de los polifenoles sobre la quimioluminiscencia de hígado medida <u>in situ</u>	109
7.2.1.	Intoxicación aguda con etanol	111
7.2.2.	Intoxicación aguda con tetracloruro de carbono	112

## DISCUSION

8.1.	Radicales libres en sistemas biológicos	115
8.2.	Lipoperoxidación y quimioluminiscencia espontánea de hígado	116
8.3.	Características de la emisión espontánea	119
8.4.	Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares	122
8.5.	Toxicidad del tetracloruro de carbono	124
8.6.	Intoxicación crónica con etanol	129
8.7.	Intoxicación aguda con etanol	133
8.8.	Deficiencias en vitamina E y selenio	136
8.9.	Efecto antioxidante de polifenoles vegetales	139
8.10.	Quimioluminiscencia de hígado medida <u>in situ</u> y su relación con la lipoperoxidación	142

CONCLUSIONES	146
REFERENCIAS	149
RESUMEN	162

# **Introducción**

1.1. Oxígeno y radicales libres en sistemas biológicos.

El oxígeno condiciona la viabilidad de la materia viva. Así como un organismo aerobio no puede vivir sin oxígeno, altas concentraciones de oxígeno causan en el mismo organismo lesiones irreversibles (Figura 1).

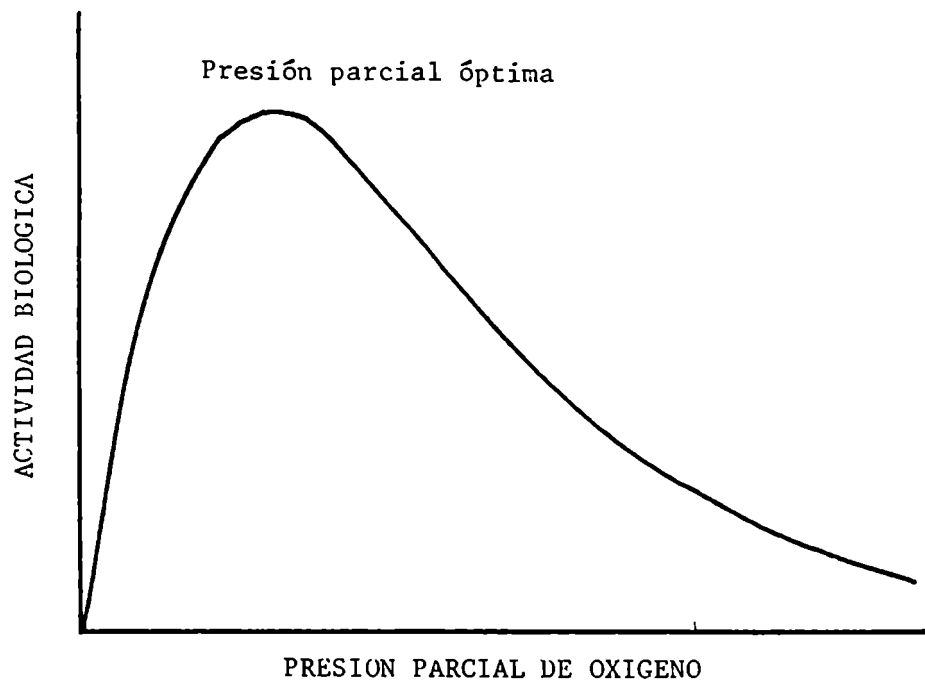


FIGURA 1. Efecto del oxígeno sobre la actividad biológica. Tomado de Gilbert, 1981.

Gerschman en 1954 postula la existencia de un mecanismo común para el daño producido por la irradiación con rayos X y la toxicidad del oxígeno. Ese mecanismo común incluye radicales libres del oxígeno como intermediarios químicos en la producción del daño celular.

En la actualidad se considera que los radicales libres estarían asociados, entre otras patologías, con cáncer, enfermedades del corazón y envejecimiento (Tappel, 1973; Pietronigro y col., 1977; Fridovich, 1978; Totter, 1980; Tolmasoff y col., 1980; Ames y col., 1980; Oberley, 1982). La toxicidad de estos radicales, se debe a su potencialidad como iniciadores de cadenas de reacciones capaces de producir modificaciones en la actividad de moléculas y estructuras esenciales para el normal desenvolvimiento de la actividad biológica (ADN, ARN, nucleótidos, proteínas, membranas celulares, etc).

Ya que la formación de estas especies tóxicas es un hecho fisiológico, durante la evolución, los organismos aerobios desarrollaron adecuados sistemas de defensa antioxidante, a fin de reducir a un mínimo su potencial capacidad destructiva.

## 1.2. Química del oxígeno.

### 1.2.1. Oxígeno molecular.

El oxígeno molecular tiene, en su estado fundamental, dos electrones desapareados, con sus spines paralelos, en diferentes orbitales (Figura 2).

De acuerdo con esta disposición, se define un estado triplete ( $^3\Sigma$ ) para la molécula de oxígeno en su estado fundamental. Si se produce la inversión del spin de uno de los electrones se forma un estado singulete. Esta inversión del spin puede ocurrir con formación de dos estados con diferente



energía: un estado  $^1\Delta$ , donde los dos electrones ocupan el mismo orbital y un estado  $^1\Sigma$  donde ocupan distintos orbitales (Figura 2).

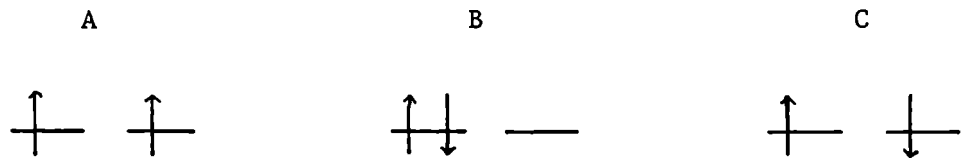
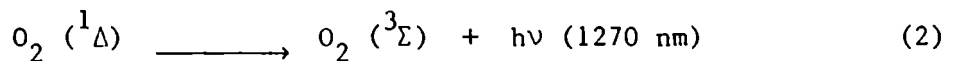
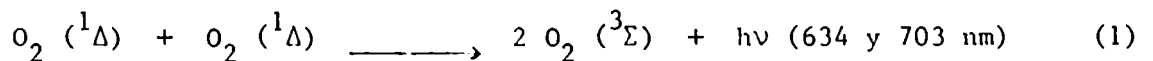


FIGURA 2. Distribución de los electrones en los orbitales moleculares externos de la molécula de oxígeno. Estado  $^3\Sigma$  (A); estado  $^1\Delta$  (B); y estado  $^1\Sigma$  (C).

El tiempo de vida media del estado  $^1\Delta$  es mucho mayor que el del estado  $^1\Sigma$ , por lo que es probable que sólo el primero sea reactivo en sistemas biológicos. La desexcitación de los estados singulete, se produce con emisión de energía electromagnética. Las reacciones 1 y 2, muestran las posibles formas de desexcitación: la dimol con bandas de emisión a 634 y 703 nm y la monomol con una banda a 1270 nm (Khan y Kasha, 1976). La identificación del oxígeno singulete en sistemas biológicos se llevó a cabo por caracterización de sus bandas de emisión (Lengfelder y col., 1983).



### 1.2.2. Productos de la reducción del oxígeno.

De acuerdo con Michaelis (1946), la reducción del oxígeno ocurre en pasos univalentes. La figura 3, muestra un esquema de esta reducción, donde se aprecian las especies que se producen en cada paso.

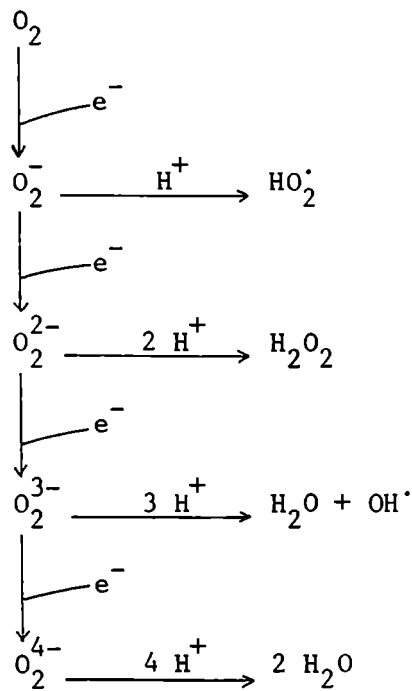
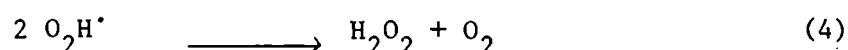
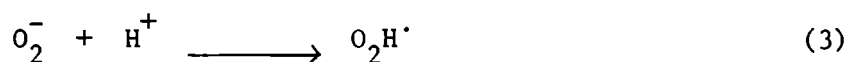


FIGURA 3. Reacciones involucradas en la reducción del oxígeno.

El oxígeno molecular debe recibir cuatro electrones, para formar  $H_2O$ . La adición de un primer electrón a la molécula de oxígeno (Figura 3), da lugar a la formación de un radical cargado negativamente, el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Esta especie es estable en medio acuoso, y su reactividad se incrementa en medios menos polares. A pH fisiológico, se encuentra formando

su base conjugada (reacción 3), el radical hidroperoxilo, el cual es mucho más reactivo y se dismuta espontáneamente con una  $k = 8.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Fridovich, 1976), para dar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y oxígeno molecular (reacción 4).



La adición de un segundo electrón al oxígeno da lugar a la formación del anión peróxido ( $\text{O}_2^{2-}$ ) (Figura 3), el cual en medio acuoso forma el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La adición de un tercer electrón da lugar a la formación del anión  $\text{O}_2^{3-}$  (Figura 3), el que se disocia espontáneamente para dar H<sub>2</sub>O y radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>).

### 1.3. Radicales libres.

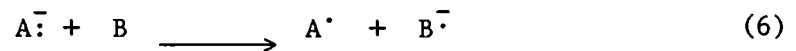
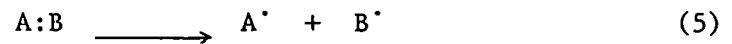
Son radicales libres o radicales, todas aquellas especies (moléculas, fragmentos moleculares, átomos) que contienen un número impar de electrones (Pryor, 1976). El electrón desapareado le confiere a estas especies alta reactividad y propiedades paramagnéticas.

Los radicales libres pueden dar reacciones en cadena, distinguiéndose tres etapas principales en este tipo de reacciones: iniciación, propagación y terminación.

#### 1.3.1. Etapas de iniciación.

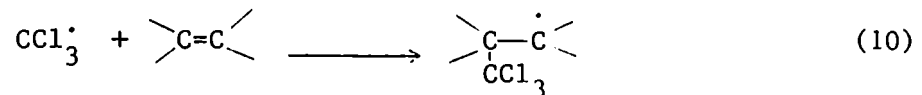
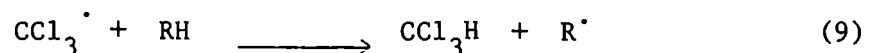
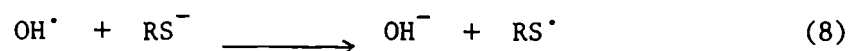
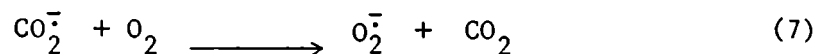
En esta etapa se forman radicales libres a partir de

especies con un número par de electrones. Los radicales pueden formarse por 2 procesos: ruptura homolítica de una unión química (reacción 5) o transferencia electrónica (reacción 6).



### 1.3.2. Etapa de propagación.

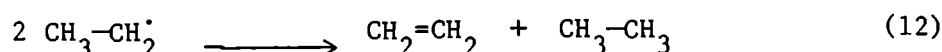
En esta etapa los radicales formados en la de iniciación, reaccionan con otras especies sin incrementar el número neto de radicales, es decir conservando el número de centros de reacción, pero propagando la cadena de reacciones. Las reacciones involucradas en esta etapa pueden ser de donación o aceptación electrónica (reacciones 7 y 8), de abstracción de un átomo de hidrógeno (reacción 9) o de adición a dobles enlaces (reacción 10).



La formación de un radical menos reactivo, da lugar a una disminución de la velocidad de propagación, pudiendo llegar a la inhibición casi total de la velocidad de reacción.

### 1.3.3. Etapa de terminación.

En esta etapa se produce una disminución del número neto de radicales, ya sea por dimerización (reacción 11) o por dismutación (reacción 12) de dos radicales.

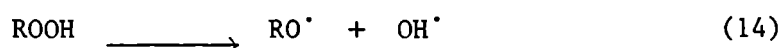
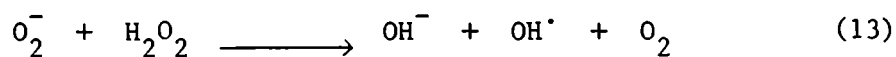


### 1.4. Radicales libres en sistemas biológicos.

Con el advenimiento de técnicas de alta resolución (resonancia de spin electrónico (RSE), espectroscopía de masa y quimioluminiscencia, entre otras), ha sido demostrado, que la producción de radicales libres en sistemas biológicos, es un hecho fisiológico. La mayor parte de los radicales se generaría a partir de especies formadas durante la reducción del oxígeno. Aproximadamente el 5 % del oxígeno consumido por los organismos aeróbicos, no se reduce a H<sub>2</sub>O en las mitocondrias, sino que es parcialmente reducido a anión superóxido y peróxido de hidrógeno en distintos sitios dentro de la célula (Chance y col., 1979). En los tejidos de los mamíferos la producción primaria de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se localiza en las membranas mitocondrial y del retículo endoplásmico, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se genera principalmente en los peroxisomas (Chance y col., 1979). En las mitocondrias los principales sitios de producción de anión superóxido son la ubisemiquinona (Boveris y col., 1976) y la NADH-deshidrogenasa (Turrens y Boveris, 1980). En las células

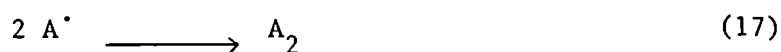
hepáticas, las enzimas microsomales NADPH-citocromo c reductasa y el citocromo P450, parecen ser las proteínas responsables de la producción de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno en el retículo endoplásmico (Estabrook y Werringloer, 1977).

El  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$ , así generados, parecen reaccionar de acuerdo con la reacción 13, (Haber y Weiss, 1934), para dar el radical hidroxilo. En sistemas biológicos esta reacción debe ser catalizada por hierro quelado (Bors y col., 1979) ya que es muy lenta para competir con la velocidad de dismutación del anión superóxido, en ausencia de catalizador (Witting, 1980). El radical hidroxilo también puede ser generado intracelularmente por ruptura homolítica de hidroperóxidos orgánicos, catalizada por metales de transición (reacción 14) o por una reacción tipo Fenton (Mac Cord y Day, 1978) (reacción 15).



El radical hidroxilo generado, es una especie de muy alta reactividad y puede atacar indiscriminadamente a distintos tipos de moléculas: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otras sustancias de importancia biológica, iniciando cadenas de reacciones de radicales libres (Slater, 1984). La acción de este radical sobre los ácidos nucleicos, puede producir

mutaciones que causen lesiones irreversibles en las células; sobre una proteína, se localiza principalmente sobre los residuos sulfidrilo oxidándolos y modificando su estructura, esencial para su actividad biológica; si el blanco de la reacción es un ácido graso de una membrana, se pueden conjugar sus dobles ligaduras, restándole movilidad y llevando a la consecuente pérdida de la fluidez y de la permeabilidad selectiva. El radical hidroxilo puede reaccionar también con moléculas que por su estructura química no propagan la cadena de reacciones de radicales libres (reacción 16), sino que estabilizan el radical formado ( $A^{\cdot}$ ), por resonancia, y se dimerizan (reacción 17). Dentro de este tipo de sustancias, denominadas antioxidantes, se encuentran la vitamina E, la vitamina A, la vitamina C, el glutati6n reducido (GSH), entre las más importantes en los tejidos animales. Otras moléculas, de estructura química apropiada, pueden reaccionar con radicales hidroxilo o con otros radicales libres, inhibiendo su potencialidad de reacción (polifenoles, quinonas, etc.) (Wilson, 1983).

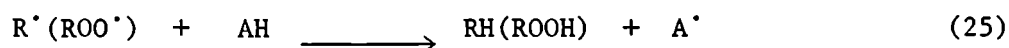
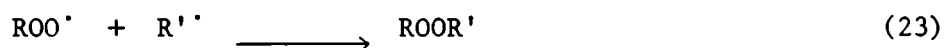
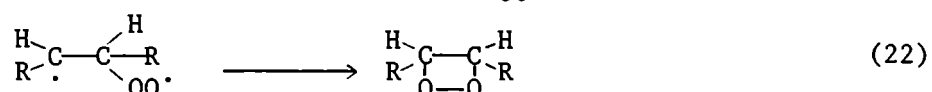
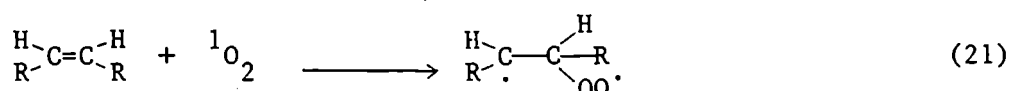
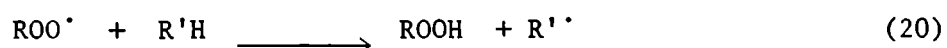
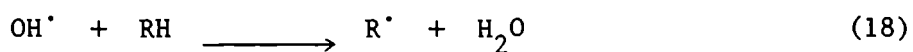


### 1.5. Peroxidación lipídica.

Uno de los más importantes procesos intracelulares iniciados por acción de radicales libres, es la peroxidación de

los lípidos de membrana.

El radical hidroxilo, generado de acuerdo con las reacciones 13-15, reacciona con un ácido poliinsaturado (RH) sustrayéndole un hidrógeno alílico, para formar un radical alquilo (R') del ácido graso (reacción 18). Ya que los ácidos linolénico (C20:4) y araquidónico (C22:6), son los ácidos grasos insaturados, más abundantes en las membranas biológicas, son los que reaccionan en la mayoría de los casos y lo hacen en su forma esterificada (Porter, 1980).



El radical alquilo, reacciona con oxígeno molecular para dar un radical hidropéroxido (ROO<sup>·</sup>) (reacción 19), con una  $k = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Estos radicales hidropéroxido pueden reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados (R'H) para dar un hidropéroxido del ácido (ROOH) y un radical alquilo (reacción



20), propagándose de esta manera la cadena de reacciones de radicales libres. La velocidad de esta reacción (20) depende tanto de la estructura química de los peróxidos, como de la del ácido graso reaccionante (Ingold, 1969). La lipoperoxidación puede también ser iniciada por adición de oxígeno singulete a los ácidos grasos (reacción 21) (Foote, 1976), con posible formación de un birradical (reacción 21) y de un dioxetano intermediario (reacción 22) (Hasting y Wilson, 1976; Cilento 1980). Dos radicales (hidroperóxido o alquilo) pueden reaccionar entre sí (reacciones 23 y 24), terminando la cadena de reacciones. También puede terminarse la cadena, por reacción entre un radical y una sustancia AH (antioxidante), cuyo radical ( $A^{\cdot}$ ) sea tan estable como para no seguir reaccionando (reacción 25). Si la cadena se desarrolla, el resultado final será la producción de hidroperóxidos orgánicos, especies excitadas y otras sustancias (aldehidos, cetonas, etc.) que pueden ser tóxicas para el organismo, al generar la pérdida de permeabilidad selectiva de las membranas. La formación de un radical de un ácido graso insaturado, hace que se produzca la conjugación de sus dobles enlaces, lo que resta movilidad y por lo tanto fluidez a la zona de la membrana donde se está produciendo la lipoperoxidación (Figura 4); si la producción de radicales libres es alta (lesiones agudas) u ocurre durante un prolongado período de tiempo (lesiones crónicas), se destruirán zonas importantes de la membrana con la consecuente irreversibilidad de la lesión.

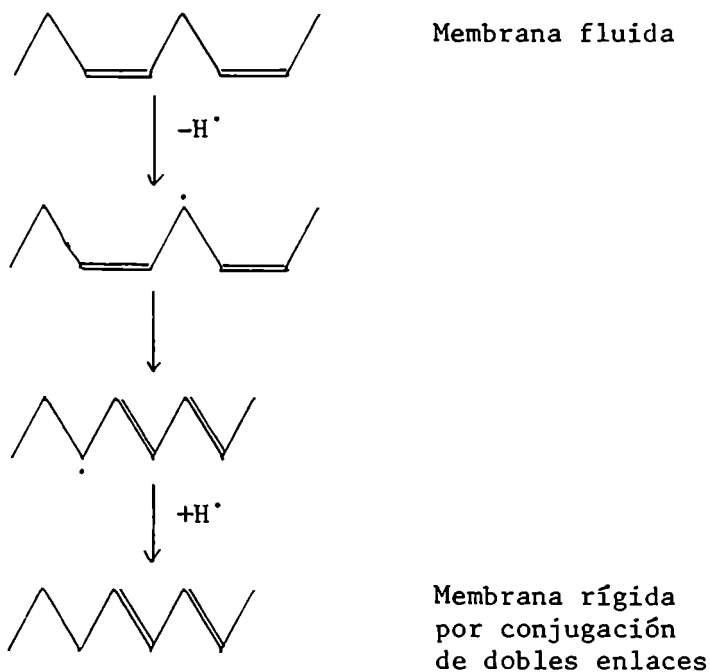


FIGURA 4. Esquema del mecanismo de conjugación de los dobles enlaces de un ácido graso poliinsaturado por acción de radicales libres (tomado de Mead, 1976).

#### 1.5.1. Evaluación de la peroxidación lipídica in vitro:

Para demostrar que la peroxidación de lípidos está ocurriendo en sistemas biológicos, es necesario medir productos formados a partir de este proceso. Hasta mediados de la década de 1970, todas las medidas de peroxidación de lípidos se llevaban a cabo in vitro, y eran pasibles de dos críticas: que es imposible realizar un fraccionamiento subcelular, en condiciones tales, que no se produzca lipoperoxidación endógena y que la alta velocidad de biotransformación de los productos

de la lipoperoxidación, hace difícil su medición. Los principales métodos de medida de peroxidación lipídica in vitro son: determinación de la formación de malondialdehído, medida de la producción de dienos conjugados y medida del consumo de oxígeno.

#### 1.5.1.1. Formación de malondialdehído.

La peroxidación de los ácidos grasos con dos o más dobles enlaces (sobre todo el ácido araquídónico), es la mayor fuente de producción de malondialdehído, compuesto que se usa como indicador de existencia de lipoperoxidación. Para su detección se emplean distintos métodos: espectrofotometría, fluorometría, cromatografía de alta presión (Bird y Drapper, 1984).

#### 1.5.1.2. Consumo de oxígeno.

La medida de consumo de oxígeno, debe hacerse en condiciones de ausencia de respiración. El oxígeno consumido es una medida del que reacciona con un radical alquilo (reacción 19), limitando la velocidad de las reacciones de peroxidación lipídica.

#### 1.5.1.3. Formación de dienos conjugados.

La conjugación de los dobles enlaces, de los ácidos grasos poliinsaturados (Figura 4), es proporcional a la velocidad de lipoperoxidación, y puede seguirse espectrofotométricamente a 236 nm (Recknagel y Glende, 1984)

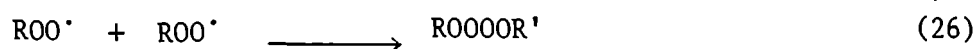
### 1.5.2. Evaluación de la peroxidación lipídica in vivo.

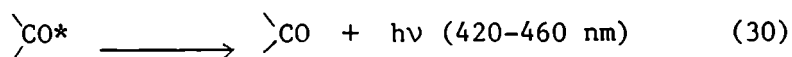
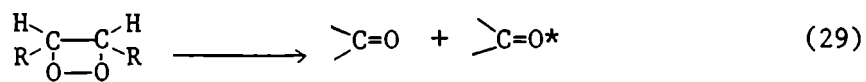
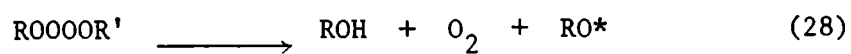
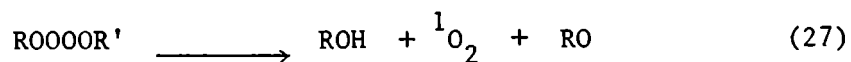
Durante la década del setenta, se desarrollaron otros métodos, no invasivos, que permitieron evaluar lipoperoxidación en sistemas biológicos intactos. Estos métodos son: la quimioluminiscencia de baja intensidad, la determinación de la exhalación de alcanos y la medida de glutatión oxidado en la bilis.

#### 1.5.2.1. Quimioluminiscencia de baja intensidad de sistemas biológicos.

La emisión de fotones producida a partir de sistemas celulares, se denomina de baja intensidad para diferenciarla de la fotoemisión de reacciones enzimáticas del sistema luciferina-luciferasa, la que es entre  $10^3$  y  $10^5$  veces mayor.

La lipoperoxidación de las membranas celulares, es uno de los procesos a partir de los cuales se forman especies excitadas, generadoras de fotones, en sistemas biológicos. Los radicales hidroperoxilo formados (reacciones 19 y 22), pueden reaccionar entre sí para dar un compuesto tetraoxigenado (reacción 26), que se descompone espontáneamente generando oxígeno singlete (reacción 27) y grupos carbonilo en sus estados excitados (reacción 28), (Rusell, 1957). El dioxetano intermediario formado en la reacción 22, se escinde formando carbonilos excitados (reacción 29) (Cilento, 1980).





Las distintas reacciones que llevan a la producción e interconversión de estas especies ( ${}^1\text{O}_2$  y grupos  $\text{CO}^*$ ) se esquematizan en la figura 5.

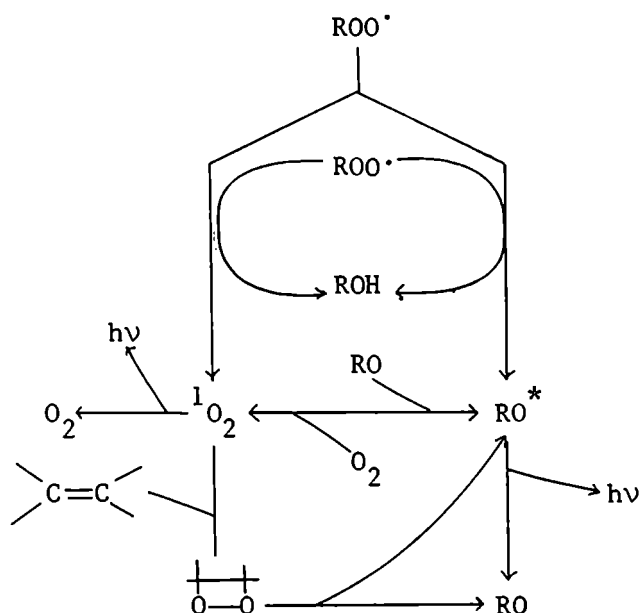


FIGURA 5. Reacciones de formación de especies excitadas.

El oxígeno singlete pasa a su estado fundamental emitiendo radiación, principalmente, de 634, 703 y 1270 nm (reacciones 1 y 2). Los grupos carbonilo excitados (triplete y singlete), lo hacen emitiendo a longitudes de onda entre 420 y 460 nm

(reacción 30).

Como la intensidad de estas emisiones es muy baja (1000 veces menor que la sensibilidad del ojo humano adaptado a la oscuridad) (Pirenne y Denton, 1952), su detección requiere instrumentos de alta sensibilidad, que puedan ser adaptados para medidas de quimioluminiscencia en distintos sistemas (Boveris y col. 1981; Boveris y col., 1980; Cadenas y Sies, 1984).

El método de medida de quimioluminiscencia fue desarrollado durante los años 60, y aplicado a diversos tejidos animales y vegetales, a nivel celular y subcelular (Stauff y col., 1963; Tarusov y col., 1962; Vassilev y Vichutinskii, 1962); pero recién en 1980 se midió la quimioluminiscencia de órgano de mamíferos in situ (Boveris y col., 1980).

#### 1.5.2.2. Exhalación de alcanos.

Los radicales alquilo formados en las reacciones 18 y 20, se rompen, dando moléculas de hidrocarburos mas pequeños (etano, butano, pentano) que se volatilizan y difunden al medio interno, siendo exhalados por el animal. El contenido de estos hidrocarburos en el aliento es evaluado por cromatografía gaseosa (Rieley y col., 1974; Kappus y col., 1978; Tappel y Dillard, 1981).

#### 1.5.2.3. Liberación de glutatión.

La liberación de glutatión oxidado en la bilis, es un

Índice del grado de lipoperoxidación del hígado. Puede ser medido tanto in situ, con el animal anestesiado, por canalización del conducto biliar, como en órgano perfundido (Sies y Summer, 1975; Chance y col., 1978; Bartoli y Sies, 1978; Sies y Akerboom, 1984).

#### 1.6. Defensas antioxidantes.

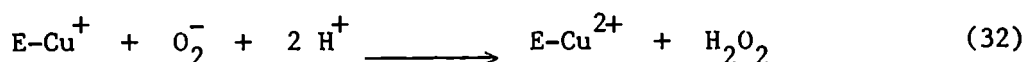
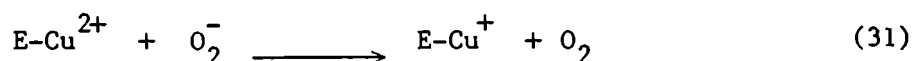
Los organismos aerobios han desarrollado un eficaz sistema de defensa contra la toxicidad del oxígeno. Este sistema puede ser racionalizado en tres niveles, de acuerdo con el lugar en el proceso de lipoperoxidación, en el que se produzca (Chance y col., 1979). Un primer nivel es el constituido por las enzimas con actividad sobre los productos de la reducción parcial del oxígeno: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. El segundo nivel lo constituye la enzima glutatión peroxidasa que metaboliza los hidroperóxidos orgánicos formados durante la lipoperoxidación (reacción 18). Cuando los sistemas enzimáticos son superados, la producción de radicales libres y de especies excitadas aumenta y el potencial estrés oxidativo debe ser prevenido por acción de sustancias antioxidantes (tercer nivel de protección), las que reaccionan dando lugar a la formación de especies menos reactivas, que no propagan las reacciones de radicales libres.

##### 1.6.1. Enzimas antioxidantes.

###### 1.6.1.1. Superóxido dismutasa.

La actividad de esta enzima fue informada por primera vez en 1969 por Mc Cord y Fridovich. Es una enzima de características especiales, ya que al catalizar una reacción entre dos moléculas de sustrato idénticas (anión superóxido), no es saturable y por consiguiente su actividad depende linealmente de la concentración de anión superóxido y de la cantidad de enzima presente (Rotilio y col., 1972). Es la enzima más rápida que se conoce, ya que cataliza la dismutación del superóxido con una constante de velocidad  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Klug y col., 1972), valor cercano al límite de difusión.

En las células eucariotas existen dos isoenzimas, una dependiente de Zn y Cu, de localización citosólica y otra dependiente de Mn localizada en la matriz mitocondrial. La actividad en citosol es inhibible con cianuro, mientras que la mitocondrial es insensible a esta inhibición. Las reacciones 31 y 32 esquematizan el mecanismo de acción de la enzima.

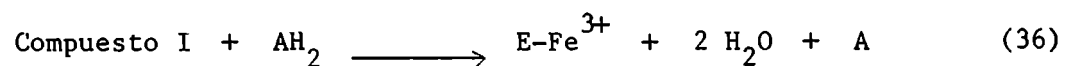
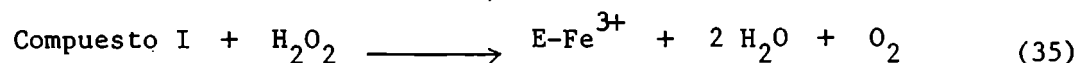
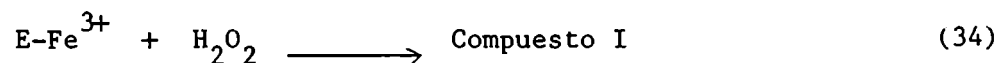
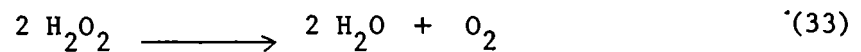


#### 1.6.1.2. Catalasa.

Es una enzima que está presente en la mayor parte de las células de mamíferos, en concentraciones variables. La mayor parte de la catalasa se encuentra dentro de los peroxisomas (De Duve y Baudhin, 1966), pero también se informó actividad citosólica de esta enzima (Chance y col., 1979).



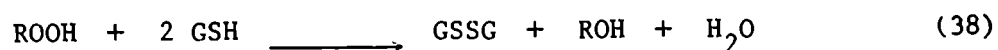
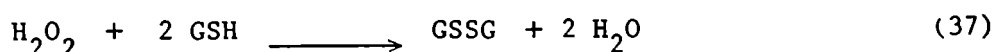
La catalasa, cataliza la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno (reacción 33), por el mecanismo planteado en las reacciones 34 a 36. Se puede observar que si bien el único sustrato de la reacción 34 es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reacción catalítica), la actividad peroxidática de la enzima (reacciones 35 y 36) puede tener otros sustratos (etanol, metanol y otros alcoholes alifáticos con mayor número de carbonos), (Chance y col., 1979).



La importancia fisiológica de esta enzima, se basa en su capacidad de utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de alta toxicidad para la célula, y adquiere importancia al actuar acoplada con la superóxido dismutasa que reduce el O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 1.6.1.3. Glutación peroxidasa.

En 1957 Mills informó la presencia en hepatocitos, de una enzima con actividad sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que en presencia de glutación reducido prevenía la hemólisis de los eritrocitos, provocada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta enzima fue llamada glutación peroxidasa y cataliza la reacción entre peróxidos y glutación de acuerdo con las reacciones 37 y 38.



El glutati3n, una de las principales sustancias responsables de mantener el estado redox intracelular, es oxidado en las reacciones 37 y 38, por lo que es necesaria su posterior reducci3n. Como muestra la reacci3n 39, el glutati3n oxidado reacciona con NADPH en una reacci3n catalizada por la enzima glutati3n reductasa, para recomponer el GSH y dar  $\text{NADP}^+$ , el cual es reducido en la v1a de las pentosas. Las enzimas glutati3n peroxidasa y glutati3n reductasa, tienen la misma localizaci3n subcelular por lo que act1an en forma acoplada.

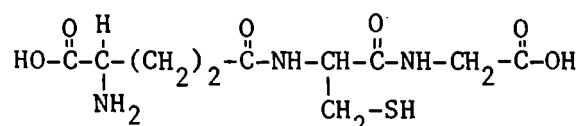
En 1973, Rotbruck y col., descubrieron que el selenio forma parte del centro activo de la enzima y que cantidades catal1ticas de este metal son necesarias para su actividad. Tambien se inform3 la actividad de una glutati3n peroxidasa que no depende de selenio (glutati3n transferasa), pero su actividad representa s3lo un 20 % de la actividad total y usa como sustrato solo hidroper3xidos org1nicos (no  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Tappel, 1980). La actividad de la glutati3n peroxidasa dependiente de selenio es alta en hepatocitos y eritrocitos (Mills, 1960) y se ha postulado que su localizaci3n celular, 70 % en el citosol y 30 % en las mitocondrias, es complementaria a la de la catalasa (Chance y col., 1979).

### 1.6.2. Sustancias antioxidantes.

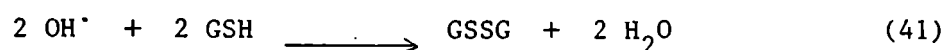
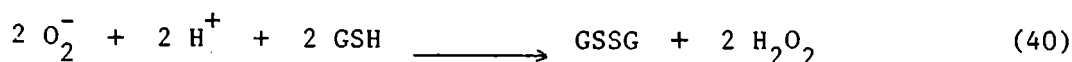
De acuerdo con lo explicado en los puntos anteriores, las sustancias antioxidantes juegan un importante papel en la desactivación de radicales libres oxidativos y especies excitadas. Entre estas sustancias cabe destacar la acción del GSH, de las vitaminas E, A y C y de los carotenos.

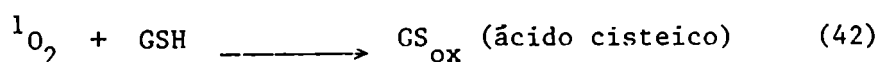
#### 1.6.2.1. Glutati3n.

El glutati3n es un compuesto que se encuentra ampliamente distribuido en distintos sistemas biol3gicos. Es un trip3ptido de 3cido  $\gamma$ -glut3mico, ciste3na y glicina:

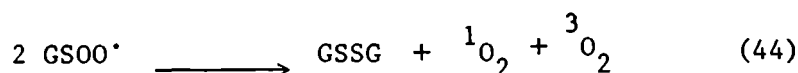
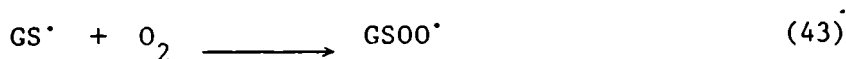


En la c3lula el glutati3n se mantiene reducido (GSH), siendo la mayor fuente de poder reductor. El glutati3n reacciona enzimaticamente con per3xidos (reacciones 37 y 38), pero tambi3n puede reaccionar en forma no enzim3tica con el an3n super3xido (reacci3n 40), con el radical hidroxilo (reacci3n 41) y con ox3geno singulete (reacci3n 42), (Kosow3r y Kosower, 1976), o con otros radicales de acuerdo con la reacci3n 25.



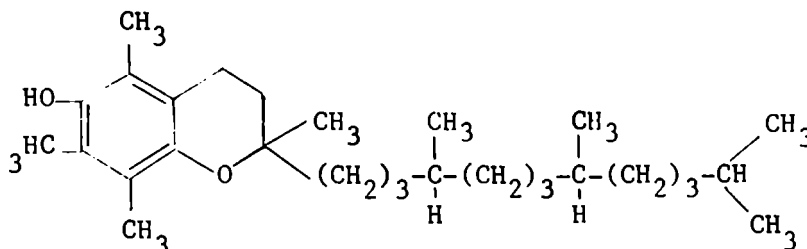


La química de estas reacciones, probablemente involucre la formación del radical tioilo ( $\text{GS}^\bullet$ ) como intermediario (Cadenas, 1985). Este radical, que es potencialmente tóxico por su capacidad de generar  ${}^1\text{O}_2$  (reacciones 43 y 44), (Wefers y Sies, 1983), hace que estas reacciones no tengan sólo un efecto protector.



#### 1.6.2.2. Vitamina E.

La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, tiene la siguiente estructura:



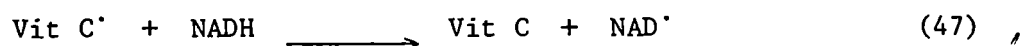
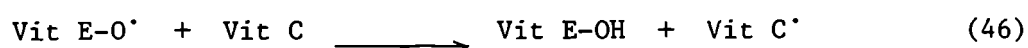
En 1920 se informó por primera vez que los tocoferoles son esenciales en la dieta de los mamíferos (Evans, 1962). A partir de ese momento, numerosos estudios mostraron que la deficiencia en vitamina E era la causa de una serie de patologías, en su mayoría de carácter degenerativo: muerte y reabsorción del feto en hembras, distrofia muscular, necrosis testicular y hepática y hemólisis de eritrocitos entre otras (Mason, 1954; Hoekstra,

1975). Posteriormente, la teoría antioxidante (Green, 1972) intentó explicar, usando un único concepto teórico, la función de la vitamina E, aún cuando el poder antioxidante de esta vitamina y de los tocoferoles había sido ampliamente estudiado y ya en 1947 informado por Mattill.

La vitamina E reacciona con radicales libres para dar un radical cromanoxilo (reacción 45). La velocidad de esta reacción depende del radical reaccionante (Wilson, 1983). El radical cromanoxilo, muy estable, puede dimerizarse de acuerdo con la reacción 17.



Packer y col. (1979), propusieron un mecanismo de regeneración de la vitamina E por reacción con la vitamina C, (reacción 46), la que sería luego reducida por un sistema enzimático dependiente de NADH (reacción 47).



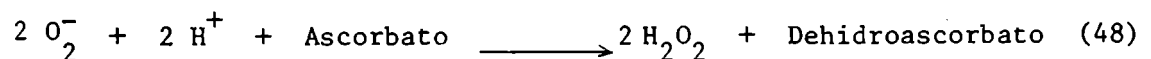
Otros estudios intentaron explicar el poder antioxidante de la vitamina E por su capacidad de reaccionar con especies excitadas (Foote, 1976).

El efecto de la vitamina E sobre el proceso de peroxidación lipídica fue extensamente estudiado tanto in vitro (Diplock y

Lucy, 1973; Combs y col., 1973; Burton y col., 1983; Diplock, 1983; Cadenas y col., 1984) como in vivo (Sagai y Tappel, 1978; Tappel y Dillard, 1981; Mc Cay y col., 1982; Burton y col., 1983).

#### 1.6.2.3. Vitamina C.

La vitamina C (ácido ascórbico) está presente en la mayor parte de los tejidos animales y vegetales. Su acción antioxidante parece ejercerla a dos niveles: reduciendo el anión superóxido (reacción 48) o reaccionando con el radical cromanoxilo de la vitamina E, reduciéndolo (Packer y col., 1979) (reacciones 46 y 47).

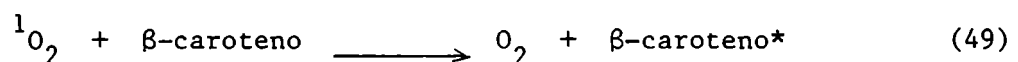


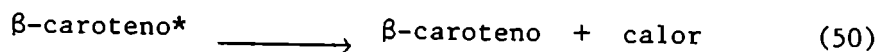
#### 1.6.2.4. Vitamina A.

La vitamina A (retinol), reacciona con  $^1\text{O}_2$ , desactivándolo (Smith, 1983). También es posible que la vitamina A reaccione directamente con radicales libres.

#### 1.6.2.5. $\beta$ -caroteno.

Es una sustancia que reacciona con oxígeno singulete llevándolo a su estado fundamental (reacciones 49 y 50), (Gerschman, 1964; Foote, 1976; Krinsky y Deneke, 1982).

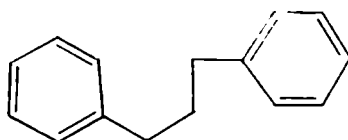




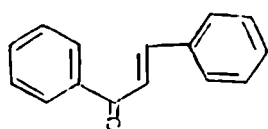
#### 1.6.2.6. Polifenoles vegetales.

Los flavonoides y los ácidos cafeoilquínicos, son polifenoles que por su estructura química (grupos carbonilo, hidroxilo, dobles enlaces), pueden reaccionar con radicales libres, formando un radical polifenol (A'), el cual al poder estabilizarse por resonancia se dimeriza (reacción 17).

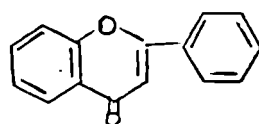
Los flavonoides tienen una estructura general del tipo:



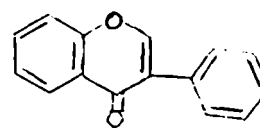
El grado de oxidación del puente C que une los dos anillos bencénicos da origen a los diferentes grupos de flavonoides.



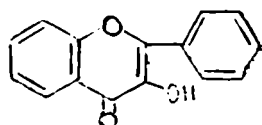
Chalcona



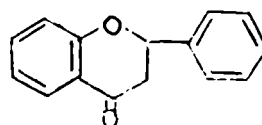
Flavona



Isoflavona



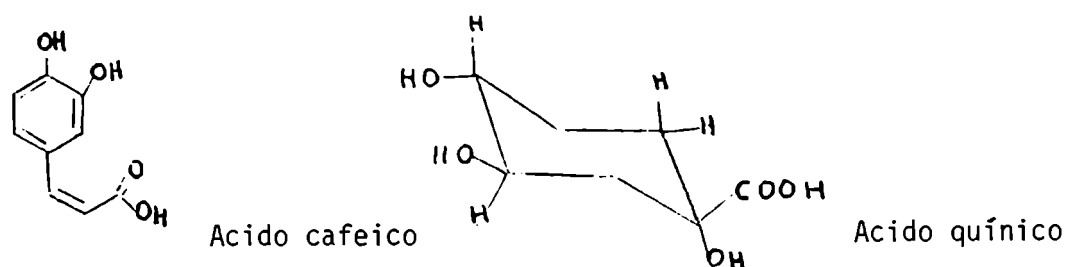
Flavonol



Flavanona

Los ácidos cafeoilquínicos constituyen una clase de compuestos derivados de la condensación de una molécula de

ácido quínico con una, dos o tres moléculas de ácido cafeico.



### 1.7. Estrés oxidativo.

De lo explicado hasta este punto, se deduce que en condiciones fisiológicas se están produciendo cantidades no despreciables de radicales oxidativos. La producción de estas especies, es controlada eficientemente por una complicada organización antioxidante desarrollada por los organismos aerobios. Si la producción de radicales aumenta sin que se produzca un incremento paralelo de las defensas antioxidantes, éstas son superadas y comienzan a aparecer patologías relacionadas con los radicales libres. Una disminución de las defensas antioxidantes, lleva también a una situación equivalente. Cualquiera de estas dos situaciones, se conoce, como un estrés oxidativo.

La administración de sustancias extrañas al organismo (xenobióticos), puede iniciar el proceso de lipoperoxidación, generando un estrés oxidativo. Muchas de estas sustancias no son tóxicas por sí mismas, sino que se transforman en tóxicas al ser metabolizadas. El  $CCl_4$  y el etanol, pertenecen a este



tipo de sustancias, y se usaron como productores experimentales de estrés oxidativo en el hígado de ratas y ratones.

Otras sustancias que ejercen efectos similares son entre otras: hidrazina, hidrocarburos halogenados, nitrocompuestos, aminas aromáticas y hidrocarburos policíclicos.

#### 1.7.1. Hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono.

Aun cuando la intoxicación con  $CCl_4$  no constituye un hecho de importancia por su incidencia sobre la salud, ha sido ampliamente usada como modelo de hepatotoxicidad y peroxidación lipídica en hígado (Recknagel, 1967; Di Luzio y Stege, 1977; Kappus, 1981; Recknagel y col., 1977; Tappel, 1980; Reynolds y Moslen, 1980; Toranzo y col. 1981; Agarwal y Mehendale, 1984). Durante mucho tiempo se pensó que el  $CCl_4$  ejercía su acción tóxica actuando como un solvente o sea cambiando las propiedades del medio de reacción; estudios posteriores demostraron la invalidez de esta hipótesis (Recknagel y col., 1977). Otros grupos de trabajo postularon la unión covalente del  $CCl_4$  con distintos componentes celulares (Castro y col., 1974; Toranzo y col., 1981). Actualmente se acepta que el  $CCl_4$  no es tóxico por sí mismo, sino que ejercería su acción tóxica luego de interaccionar con sistemas enzimáticos en el hígado (Recknagel, 1977). Reynolds y Moslen (1980) mostraron evidencias directas (microscopía electrónica) de la destrucción de retículo endoplásmico por acción del  $CCl_4$ .

La interacción del  $CCl_4$  con los sistemas enzimáticos del

retículo endoplásmico llevaría a la producción del radical triclorometilo (Packer y col., 1978; Mason, 1982), el que desencadenaría las reacciones de peroxidación lipídica y sería responsable de la posterior lesión y muerte celular (Chance y col., 1979).

El retículo endoplásmico, aislado en la fracción microsomal, contiene un sistema de transporte de electrones compuesto de hemo y flavoproteínas, que actúan en la biotransformación de gran cantidad de xenobióticos, en reacciones dependientes de oxígeno. Un grupo de estas proteínas detoxificantes se agrupa bajo el nombre de citocromo P450, y actúan hidroxilando xenobióticos, facilitando su excreción. Son inducibles diferencialmente por la administración de distintas drogas; así los barbituratos (pentobarbital, hexobarbital, barbital, etc.) inducen la formación de un citocromo que complejado con monóxido de carbono absorbe a 450 nm; el metilcolantreno induce una proteína que en presencia de CO absorbe a 448 nm (Cooper y col., 1975).

La figura 6 muestra un esquema de los principales caminos a través de los cuales se transportan los electrones involucrados en las reacciones de estos citocromos. En ella puede observarse que el citocromo P450 está involucrado en la producción de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y oxígeno singulete.

Recknagel y col. (1977), mostraron dos fuertes evidencias de la participación del citocromo P450 en el metabolismo del CCl<sub>4</sub>: ratas recién nacidas, con muy bajo nivel de citocromo

P450, no son sensibles a los efectos de la droga; y la eliminación de citocromo P450 por acción de drogas (SKF-525-A), previno los efectos tóxicos del  $\text{CCl}_4$ .

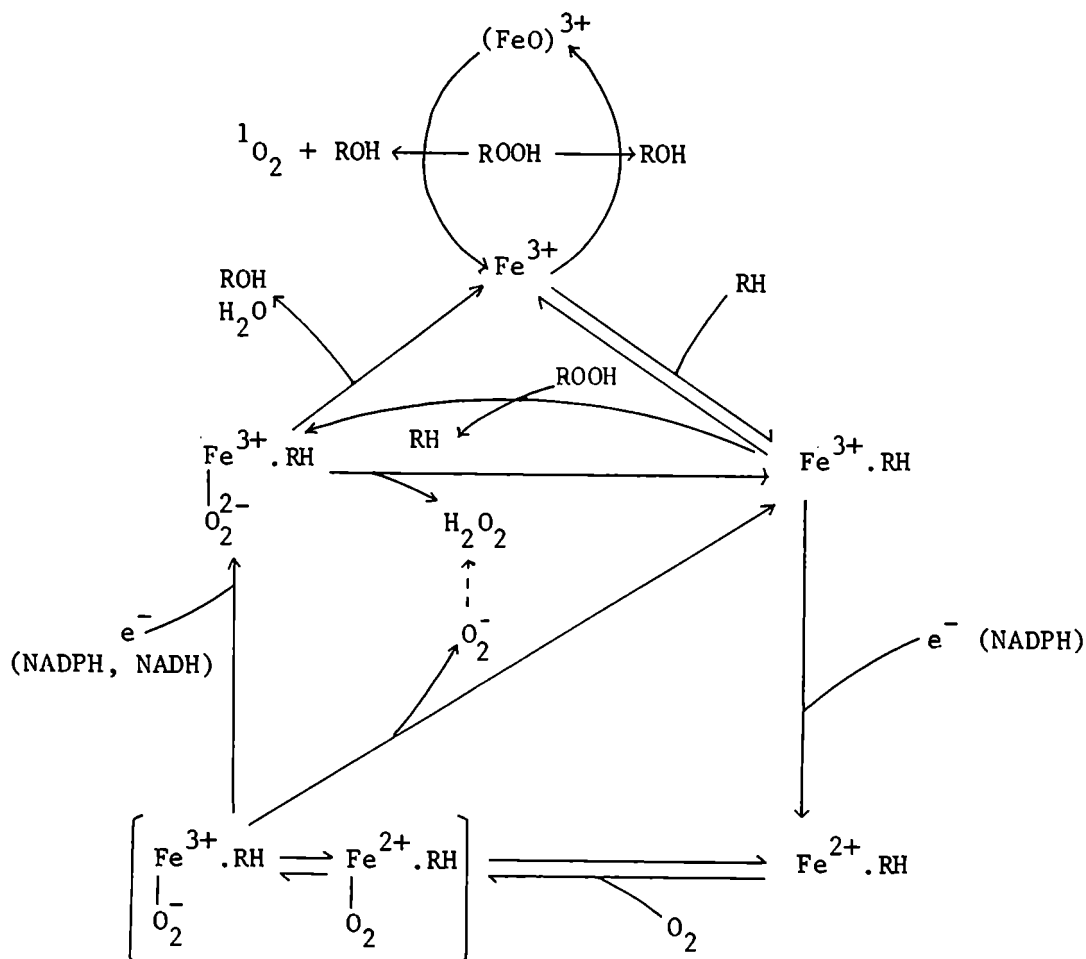


FIGURA 6. Mecanismos de reacción involucrados en la metabolización de xenobióticos ( $\text{RH}$ ,  $\text{ROOH}$ ), catalizados por el hierro hemínico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) del citocromo P450.

### 1.7.2. Intoxicación con etanol.

Las bases moleculares de la pérdida de viabilidad de los hepatocitos (cirrosis) causada por el etanol, es base de controversias y no ha sido explicada satisfactoriamente hasta el momento. Desde un punto de vista bioquímico el estudio de los efectos tóxicos del etanol, ha sido focalizado en el estudio de la actividad de dos enzimas encargadas de su biotransformación: la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa (Theorell, 1974). Es así que hasta mediados de la década del 60, se aceptaba que el etanol era totalmente metabolizado en el hígado por acción de las dos enzimas. En ese momento se postuló un mecanismo común para la intoxicación con etanol y la intoxicación con  $\text{CCl}_4$ , que incluía, por primera vez, radicales libres del oxígeno. Este postulado se basaba en el efecto que tenían las sustancias antioxidantes, sobre ambas intoxicaciones (Di Luzio, 1966; Di Luzio, 1968). Durante la década del 70, fueron postulados distintos sistemas metabolizantes con actividad sobre el etanol en el hígado, que no incluían a las deshidrogenasas (Lieber y De Carli, 1970; Thurman y col., 1972; Thurman, 1973). Di Luzio, en 1973, mostró interesantes paralelismos entre los mecanismos de metabolización del etanol (en mitocondrias) y del  $\text{CCl}_4$  (en microsomas) y propuso como mecanismo común la peroxidación lipídica. Cederbaum y col. (1975) relacionaron la disminución de los ácidos grasos libres en mitocondrias con la formación de hígado graso en alcoholismo crónico. Casi simultáneamente Koch

y col., (1976) informaron la presencia de megamitocondrias en ratas tratadas crónicamente, pero que no habían desarrollado hígado graso. Cohen en 1977, postuló una nueva vía de metabolización que incluía el radical hidroxilo. En 1980, Cederbaum y col., informaron un incremento en la producción de radicales hidroxilo, en microsomas al oxidar alcoholes. La participación del citocromo P450 (Miwa y col., 1977; Onhishi y Lieber, 1977), explicaría esta producción de radicales libres y justificaría la participación de la catalasa en el metabolismo del etanol, reduciendo el peróxido de hidrógeno generado por el citocromo. A partir de 1980, aparecieron trabajos que relacionan directamente la producción de radicales libres y la lipoperoxidación en el alcoholismo. Se informaron aumentos de lipoperoxidación en hígado de alcoholistas crónicos (Matsumura y col., 1980) y aumentos en la liberación de glutatión oxidado en ratas (Koch y col., 1980). Videla y Valenzuela (1982), informaron una disminución del contenido de glutatión reducido en el hígado de ratas tratadas crónica y agudamente con etanol. Muller y Sies (1982), midieron incrementos en la liberación de alcanos en hígado perfundido de ratas bajo intoxicación aguda. La figura 7 resume los principales mecanismos postulados para la metabolización del etanol en el hígado de ratas.

#### 1.8. Trabajo desarrollado durante esta Tesis.

En el presente trabajo de Tesis se estudia la quimioluminiscencia de hígado de ratas y ratones, medida in

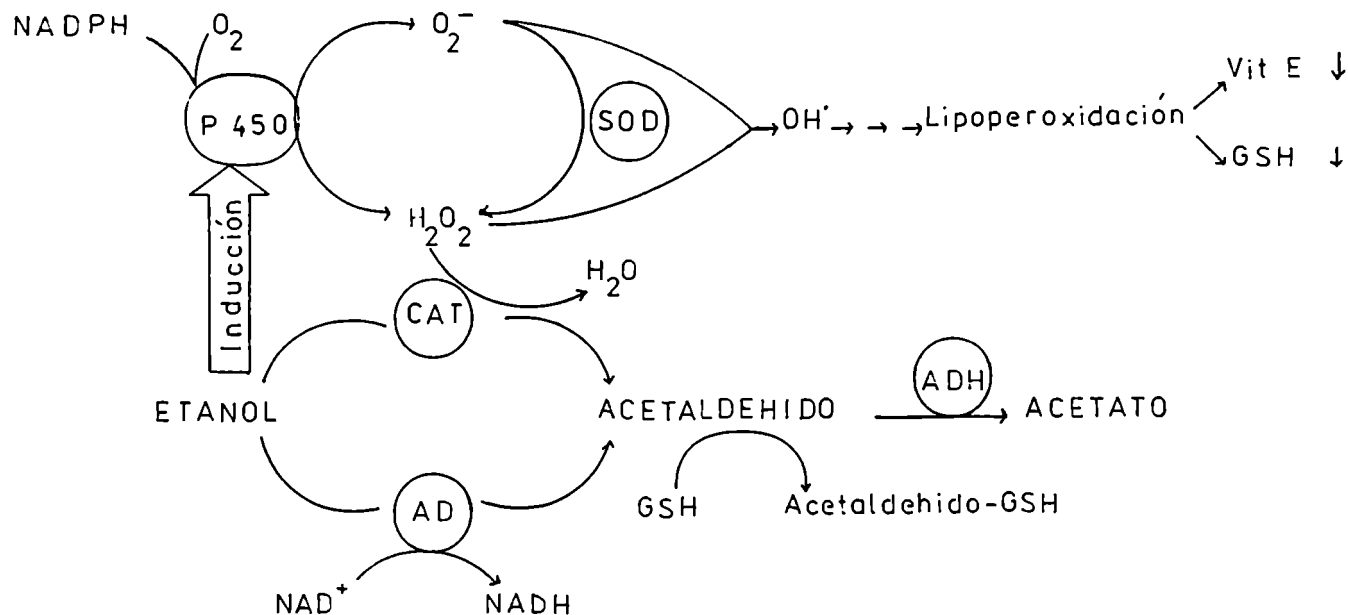


FIGURA 7. Principales vías enzimáticas de biotransformación del etanol en el hígado de rata y su relación con la producción de radicales del oxígeno y el estrés oxidativo. Catalasa (CAT); superóxido dismutasa (SOD); acetaldehído deshidrogenasa (ADH); alcohol deshidrogenasa (AD); citocromo P450 (P450).

situ, como un índice de lipoperoxidación en ese órgano, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés oxidativo.

Las situaciones de estrés estudiadas son: a) intoxicación aguda con tetracloruro de carbono (modelo clásico de lipoperoxidación hepática); b) administración crónica y aguda con etanol; y c) deficiencia en vitamina E y selenio (modelo clásico de producción de lesiones irreversibles en hígado).

Las medidas de quimioluminiscencia se hacen paralelamente

con: a) la determinación de la quimioluminiscencia de fracciones subcelulares (homogeneizados, mitocondrias y microsomas), iniciada por adición de hidróperóxido de t-butilo; b) evaluación de las actividades de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa); y c) otros ensayos necesarios para caracterizar los mecanismos involucrados en cada situación de estrés estudiada (contenido de glutatión, formación de malondialdehído, formación de dienos conjugados).

Finalmente, se ensaya el poder antioxidante de polifenoles de origen vegetal, por su capacidad de disminuir la quimioluminiscencia de hígado de ratas intoxicadas con etanol y de ratones intoxicados con CCl<sub>4</sub>.

A partir de los resultados obtenidos, se discuten las diferentes alteraciones estructurales y metabólicas, que en cada una de las situaciones de estrés consideradas, llevan a modificaciones de la quimioluminiscencia de hígado.

# **Materiales y Métodos**



## 2.1. Contador de fotones.

La figura 8 muestra un esquema de módulos de un contador de fotones adaptado para medidas de emisiones generadas por órganos de mamíferos *in vivo* e *in situ* (Boveris y col. 1980). Cada uno de los módulos que forman parte del contador de fotones son descritos a continuación.

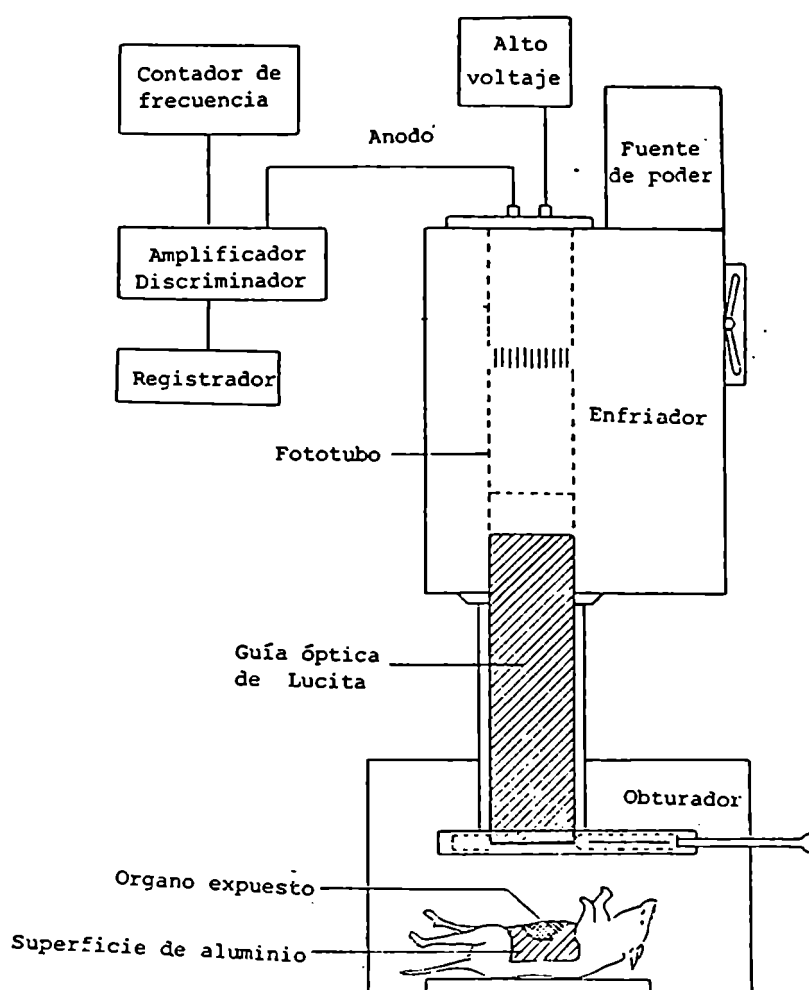


FIGURA 8. Esquema de un contador de fotones adaptado para medidas de quimioluminiscencia de órgano de in situ. Tomado de Boveris y col., 1980.

### 2.1.1. Fotomultiplicador.

El fotomultiplicador o fototubo es el instrumento que permite la detección de los fotones, transformando su energía electromagnética en una señal eléctrica.

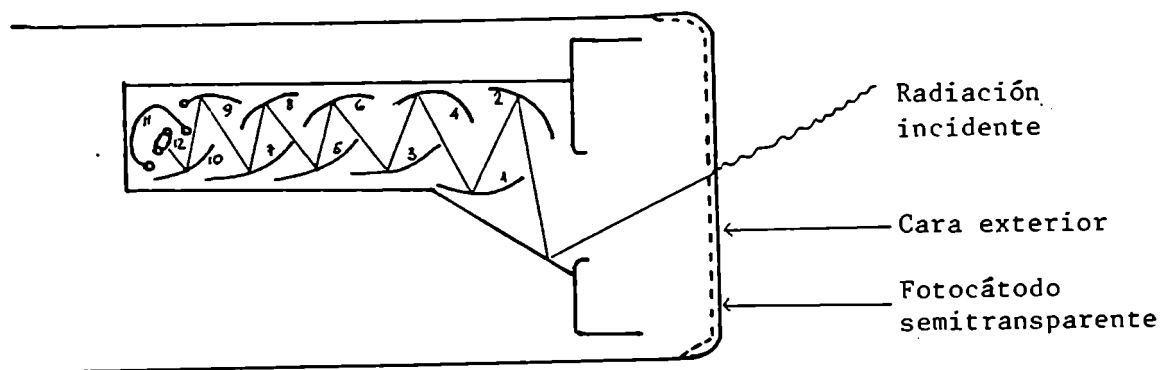


FIGURA 9. Estructura de un fototubo lineal. Los números indican la posición de los dínodos (1-11) y del ánodo (12).

La figura 9 esquematiza un fototubo, y en ella se aprecia que consta de dos secciones: un fotocátodo, donde inciden los fotones, y del que se arranca un fotoelectrón, y una serie de dínodos, en los cuales el fotoelectrón desencadena una cascada de electrones que se transforman en una señal eléctrica. La cantidad de electrones generados es proporcional al número de fotones incidentes y al potencial eléctrico aplicado entre el fotocátodo y los dínodos. La carga de los  $n$  electrones que llegan al dínodo será  $Q$ , y para detectar esta carga se mide entonces la caída de potencial ( $V$ ) producida entre las placas de un condensador  $C$  ( $V = Q/C$ ). Este potencial se genera por períodos muy cortos de tiempo por lo que se denomina impulso.

En nuestros experimentos, se usó un contador de fotones que consta de un fotomultiplicador marca EMI modelo 9658-B tipo S-20. Este fotomultiplicador usa como material fotosensible (fotocátodo) una aleación de cesio y rubidio, lo que lo hace sensible en un rango de longitudes de onda entre 300 y 900 nm. Dicha sensibilidad es función de la longitud de onda incidente y varía con ella (Figura 10). De acuerdo con esto, sólo se registra una parte de la emisión, por lo que se debió calcular la eficiencia de conteo ( $q$ ) usando la ecuación:

$$q = 123.95 \times s \times 100$$

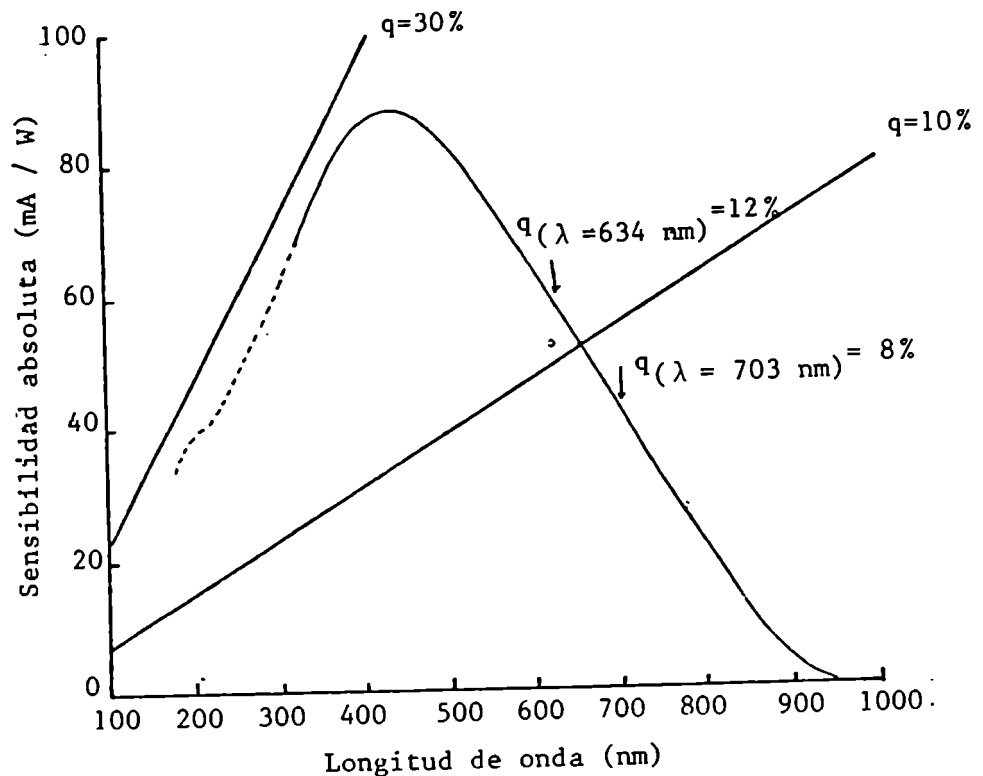


FIGURA 10. Curva de sensibilidad de un fototubo EMI-9658 B. Tomado del Manual de uso del fototubo, EMI Corp., U.S.A.

El valor de sensibilidad absoluta (s) se obtiene del gráfico de la figura 10.

En esa figura se puede observar que con el fototubo usado se obtenían rendimientos cuánticos menores que el 30 % a todas las longitudes de onda; la detección a 634 y 703 nm era del 12 % y del 8 % respectivamente.

Todo fotomultiplicador presenta una señal intrínseca aún cuando no reciba radiación externa. Esta corriente oscura, es proporcional al voltaje aplicado al fototubo y debió ser calibrada de manera de obtener la mejor relación señal:ruido para una emisión dada.

#### 2.1.2. Fuente de alto voltaje.

El fototubo estaba conectado a una fuente de alto voltaje, marca Ortec, modelo 426 (0 - 3.0 kV). La determinación del voltaje óptimo a aplicar se realizó durante la calibración del fototubo, manteniendo constantes las otras condiciones electrónicas.

#### 2.1.3. Amplificador-discriminador.

La señal eléctrica que salía del fototubo era muy pequeña por lo tanto debió ser amplificada. Para ello se usó un amplificador-discriminador marca Princeton Applied Research, modelo 1121. El impulso generado en el fotomultiplicador era recibido por el amplificador el que lo transformaba en una señal detectable para el discriminador, cuya función era la de

seleccionar los impulsos que reunían las características necesarias para ser contados como un fotón. Esta discriminación se hizo teniendo en cuenta el rango de energía (altura del impulso) y el ancho (tiempo) del impulso.

En la figura 11 se observa el trazado de la respuesta de un osciloscopio ante la señal enviada por un fototubo al recibir un fotón y su discriminación.

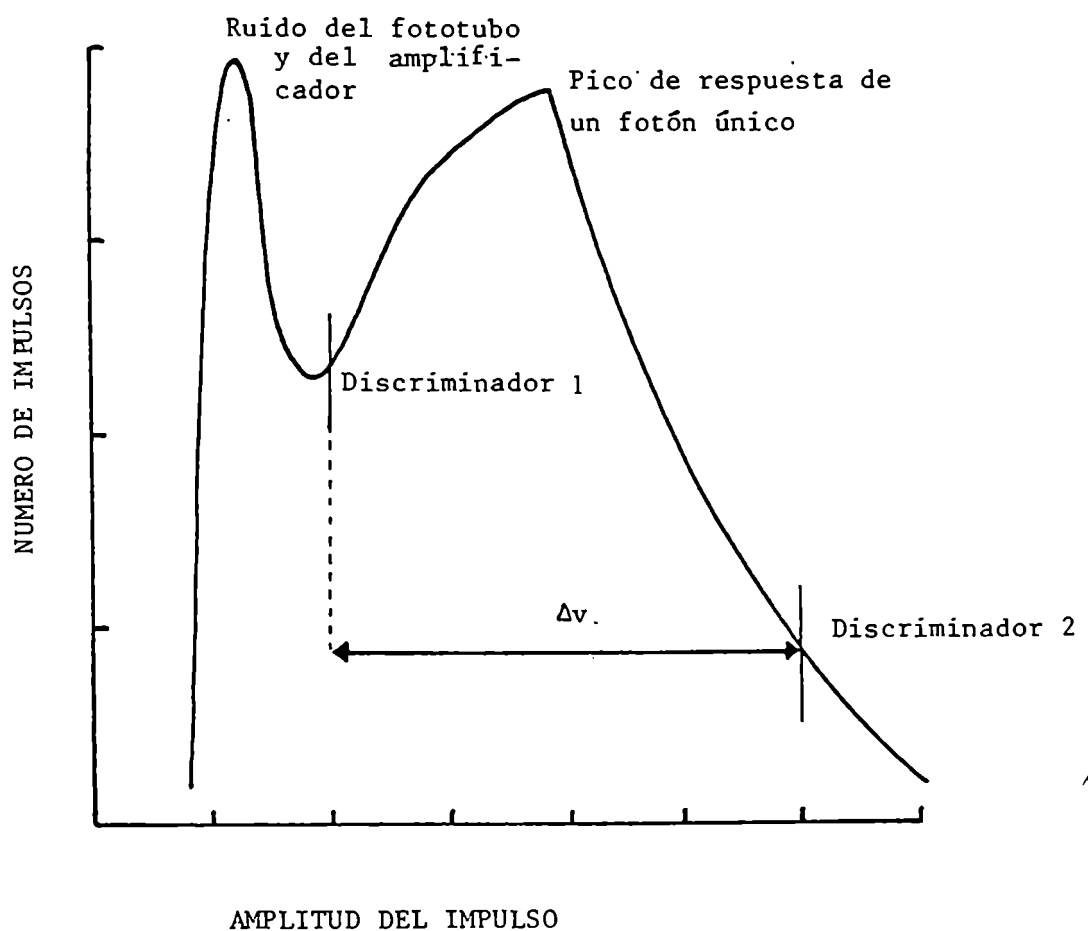


FIGURA 11. Respuesta de un fototubo al incidir un fotón. Tomado del Manual de uso del amplificador-discriminador, Princeton Applied Research, U. S. A.

El discriminador tiene dos umbrales cuya calibración permitió discriminar la señal recibida y determinar la mejor relación señal:ruido. Esta relación debe ser lo más alta posible para llevar a cabo un buen conteo de fotones. Procediendo de esta manera sólo fueron contados aquellos impulsos que tenían energía comprendida entre los niveles de discriminación elegidos.

Para el conteo de fotones únicos fue necesario que el sistema amplificador-discriminador midiera una cuenta por fotón incidente.

#### 2.1.4. Enfriador.

La corriente oscura o ruido del fototubo es dependiente de su temperatura (Figura 12). Por lo tanto para medir adecuadamente pequeñas emisiones fue conveniente mantener el fototubo a baja temperatura, por lo que se le colocó dentro de un enfriador electromagnético, marca EMI-Gencom, modelo FACT 50, MK III, capaz de alcanzar temperaturas de hasta  $48^{\circ}\text{C}$  debajo de la temperatura ambiente. Por lo general se trabajó con el fototubo a una temperatura entre  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.1.5. Contador de frecuencias y registrador.

La señal eléctrica salida del amplificador-discriminador fue recogida por un contador digital de frecuencias, que permitió visualizar instantáneamente los valores medidos. Al mismo tiempo un registrador gráfico recogía la señal e iba

confeccionando un registro continuo de la emisión a lo largo del tiempo.

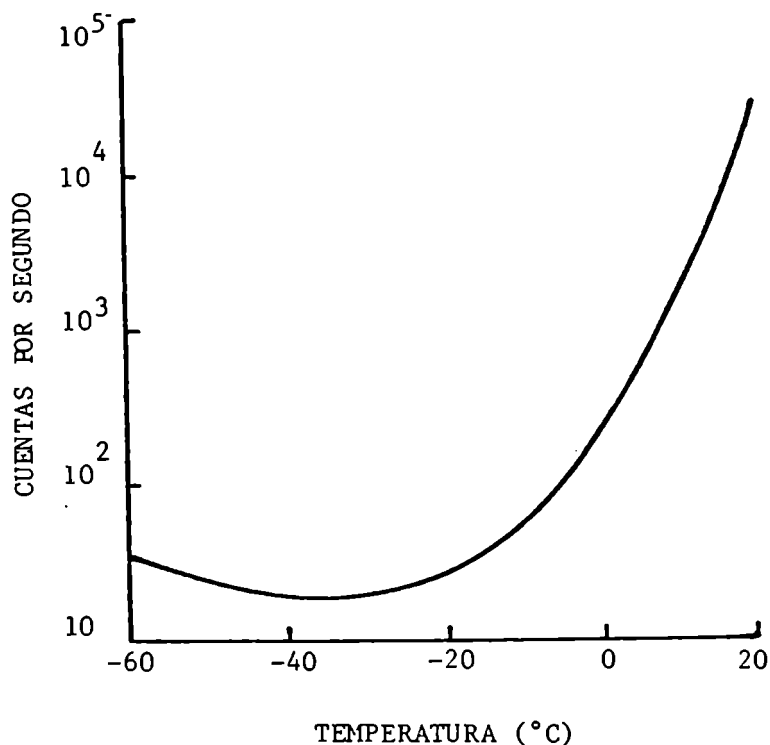


FIGURA 12. Corriente oscura de un fotomultiplicador en función de su temperatura.

#### 2.1.6. Caja hermética.

Las emisiones a medir eran bajas ( $10^2$ - $10^3$  cps) y esto hizo imposible la operación de conteo en condiciones de iluminación normales, por lo tanto se trabajó con la entidad emisora (órgano *in situ*, órgano perfundido, suspensión de células, fracción subcelular, etc.) colocada dentro de una caja que no permitía la entrada de fotones desde el exterior.

Para trabajar con animales vivos, la caja fue

termostaticada (normalmente a 30°C). La conexión entre la caja hermética (a 30°C) y el fototubo (a -20°C), se hizo usando una barra de metilmetacrilato que actuaba como guía óptica y como aislante térmico, salvando la gran diferencia de temperaturas (50°C). La barra de metilmetacrilato finaliza dentro de la caja oscura en un obturador mecánico, que se manejaba desde el exterior.

Los animales bajo estudio, recibían desde el exterior sustancias por medio de una cánula, sin que se perturbe la cinética de la medida.

## 2.2. Medida de quimioluminiscencia.

### 2.2.1. Medida de quimioluminiscencia de hígado in situ.

A los animales anestesiados (ratas o ratones) se les expuso el hígado mediante una laparatomía y se cubrió el resto de la cavidad abdominal con papel de aluminio (no emisor), de manera que sólo el tejido hepático (o cualquier otro órgano por medir) quedó expuesto. Para medir la emisión de hígado de ratón sin anestesiarse se procedió de la siguiente manera: se afeitó la zona abdominal (la piel es traslúcida y permite localizar visualmente el hígado) y se midió la quimioluminiscencia a través de la piel. Las medidas a través del músculo abdominal se hicieron con el ratón anestesiado, quitando la capa dérmica. Una vez preparado el animal, se colocó dentro de la caja hermética y se acercó el hígado (u órgano a medir) lo más posible al obturador mediante el uso de un soporte regulable



manual. El próximo paso consistió en cerrar la caja y conectar el alto voltaje sobre el fototubo (este paso se realizó con el obturador cerrado). La señal recibida en el contador de frecuencias y en el registrador corresponde a la corriente oscura del fototubo, y determinó la línea de base de las medidas (Figura 13).

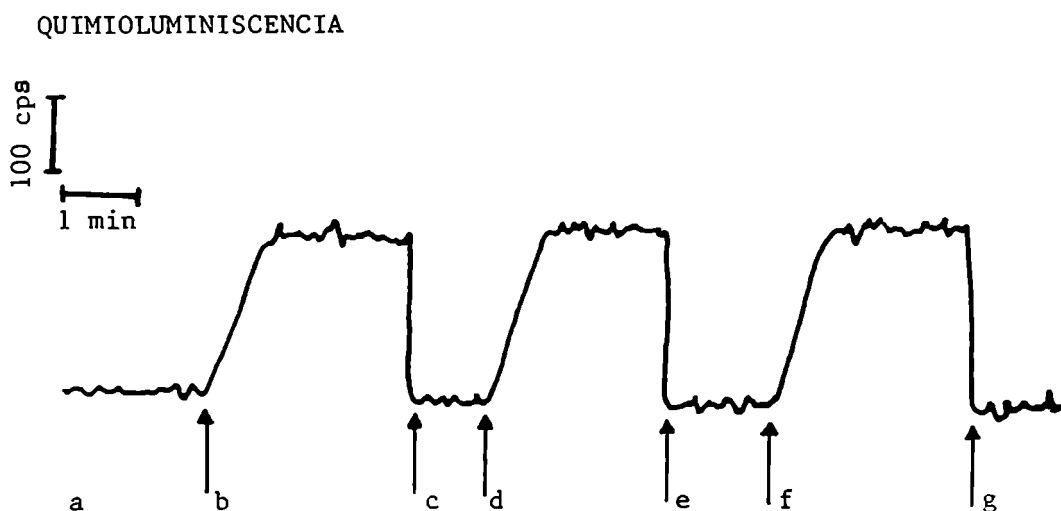


FIGURA 13. Quimioluminiscencia espontánea de hígado de rata. Las letras indican la apertura (b, d, f) y el cierre (c, e, g) del obturador.

Una vez obtenido un valor constante para esta corriente oscura (Figura 13, a-b), se abrió el obturador y quedó la especie emisora directamente expuesta al fototubo (Figura 13, b-c, d-e, f-g). La operación de apertura y cierre del obturador se repitió varias veces para corroborar la constancia de la línea de base y de la emisión. El agregado de sustancias desde el exterior puede modificar, tanto aumentando como

disminuyendo, los valores de emisión. En todos los casos se midió el número de fotones (1 cuenta = 1 fotón) generado en el hígado u órgano bajo estudio. Los resultados se expresaron por unidad de área de órgano, para ello se midió la superficie expuesta. El registrador graficó la señal recibida a lo largo del tiempo de medida.

### 2.2.2. Medida de quimioluminiscencia de fracciones subcelulares.

Si bien pueden hacerse medidas de quimioluminiscencia de fracciones subcelulares (homogeneizados, suspensiones mitocondriales y microsomales) utilizando un contador de fotones, en nuestros experimentos la emisión de estas fracciones se midió en un contador de centelleo, con el circuito de coincidencia desconectado. Se usó un contador de centelleo líquido marca Packard, modelo 3320. Las características de cada uno de los sistemas de medida de quimioluminiscencia se muestran en la tabla 1.

Las muestras líquidas (suspensiones) se colocaron en viales de centelleo de 12,5 mm de radio por 58 mm de altura. Para aumentar los niveles de emisión las suspensiones fueron adicionadas con peróxidos orgánicos agregados inmediatamente antes de la medida. Los resultados obtenidos se expresaron como cuentas por segundo por mg de proteína (el contenido proteico de las fracciones se determinó previamente) o por g de tejido.

TABLA 1. CARACTERISTICAS DE LAS MEDIDAS DE QUIMIOLUMINISCENCIA REALIZADAS CON UN CONTADOR DE FOTONES Y CON UN CONTADOR DE CENTELLEO.

Característica	Contador de fotones	Contador de centelleo
Rango de sensibilidad del fotomultiplicador	300-900 nm	300-650 nm
Sensibilidad	10 cps (50-100 fotones/s)	100 cpm (250-1000 fotones/s)
Termostatación	termostatizable (0-50°C)	temperatura ambiente
Operatividad	permite leer una muestra por vez	permite leer varias muestras por vez
Condiciones de trabajo	oscuridad total	ambiente iluminado

### 2.3. Fraccionamiento subcelular.

Para la obtención de las distintas fracciones subcelulares, los hígados fueron sometidos a una centrifugación diferencial, de acuerdo con los procesos esquematizados en la figura 14.

El hígado se separó del animal (muerto previamente por dislocación cervical) y se colocó en un medio que contenía: potasio cloruro 140 mM, Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2, en una proporción aproximada de 1 g de tejido por 9 ml de solución.

La centrifugación (a) (Figura 14), sirvió para descartar núcleos y detritos celulares; el sobrenadante (fracción E), se

usó como "homogeneizado". Esta fracción E, se sometió a otra centrifugación (b) y se obtuvo un precipitado (fracción M o mitocondrias pesadas) y un sobrenadante (LPS) que fue centrifugado (c) para precipitar la fracción L (mitocondrias livianas); en esta fracción precipitan también peroxisomas y lisosomas. Las fracciones M y L se usaron como "mitocondrias" en nuestros experimentos. El sobrenadante (PS) se centrifugó (d) para precipitar la fracción microsomal (P). El sobrenadante de esta última centrifugación (S), se usó como "citosol", y era la fracción que contenía las enzimas solubles. Todas las operaciones se llevaron a cabo conservando la temperatura entre 0° y 2°C.

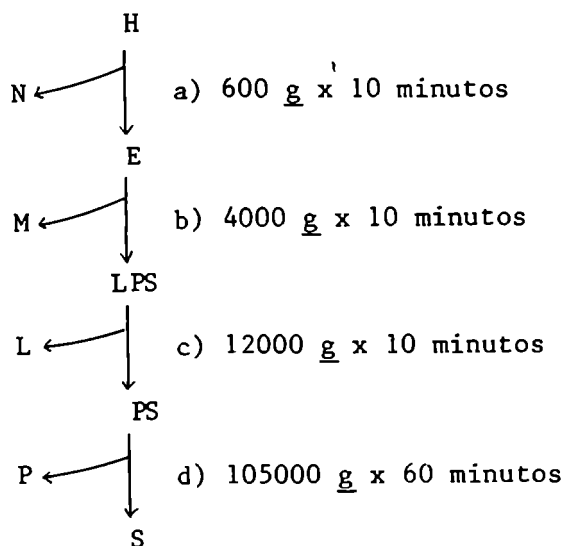


FIGURA 14. Esquema de un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.

#### 2.4. Animales y tratamientos.

En todos los casos se usaron animales de laboratorio, que fueron sometidos a distintos tratamientos, de acuerdo con los experimentos a realizar.

##### 2.4.1. Intoxicación con tetracloruro de carbono.

Se usaron ratones cepa Swiss, hembras, cuyo peso corporal varió entre los 20 y 25 g, y que fueron alimentados con una dieta sólida convencional. Los ratones fueron anestesiados con uretano 12 % P/V con una dosis de 1 ml/100 g de peso, inyectado intraperitonealmente. El CCl<sub>4</sub>, en solución 50 % P/V, se administró por la misma vía, a través de una canula, 30 minutos después de la anestesia.

##### 2.4.2. Tratamiento con barbital.

A un grupo de los ratones descritos en Sección anterior, se les reemplazó el agua de bebida por una solución acuosa de barbital sódico 1 % P/V. Este cambio no modificó la ingesta de los animales.

##### 2.4.3. Intoxicación con etanol.

Se estudiaron 2 tipos de intoxicación alcohólica, aguda y crónica.

##### 2.4.3.1. Intoxicación aguda.

Se usaron ratas Long Evans y Wistar cuyo peso osciló entre

200 y 220 g, ayunadas de 16 a 18 horas antes de los experimentos. El etanol fue administrado 6 horas antes de los experimentos por vía intraperitoneal en dosis de 5 g/kg de peso (etanol 30 % V/V en solución salina). Las ratas control recibieron cantidades isovolumétricas de solución salina. Durante las 6 horas de espera luego de la administración de etanol los animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura templada (28-30°C) para prevenir hipotermias. Las ratas fueron anestesiadas por administración intraperitoneal de Nembutal, 50 mg/kg de peso para los animales control y 15 mg/kg de peso para los tratados con etanol.

#### 2.4.3.2. Intoxicación crónica.

Se usaron ratas Wistar (cuyo peso inicial varió entre 115 y 125 g), a las que se dió a beber una solución de etanol 32 % y sacarosa 25 % durante 12 ± 1 semanas. A las ratas control se les suministraron cantidades isocalóricas de sacarosa. Las ratas tratadas fueron privadas de etanol 18 horas antes de los experimentos.

La dieta sólida de los animales tratados consistió en alimento de laboratorio 93 %, cloruro de colina 1 %, aceite de maíz 4 %, mezcla de sales (Hegsted) 1 % y mezcla de vitaminas 1 %. La composición del alimento de laboratorio fue: carbohidratos 54 %, lípidos 19 % y proteínas 17 % (Boveris y col., 1983). El contenido energético total del régimen final fue: etanol 31 %, carbohidratos 50 %, lípidos 8 % y proteínas

11 %. La dieta de los animales control tuvo una composición semejante, pero la energía suministrada por el etanol se reemplazó por la suministrada por sacarosa. Las ratas fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal de Nembutal, 50 mg/kg de peso.

#### 2.4.4. Deficiencias en vitamina E y selenio.

Se usaron ratas Wistar, recién destetadas, cuyo peso inicial varió entre 35 y 45 g. La composición de las dietas deficientes en vitamina E y selenio se muestra en la tabla 2.

#### 2.4.5. Efecto antioxidante de los polifenoles vegetales.

Se usaron ratones cepa Swiss cuyo peso osciló entre 25 y 30 g. Fueron mantenidos con alimento de laboratorio comercial y los polifenoles se les administraron por inyección intraperitoneal antes de los experimentos. Se usó como anestesia Uretano 12 % P/V en dosis de 1 ml/100 g de peso).

Tabla 2. Composición de las dietas deficientes en vitamina E y selenio

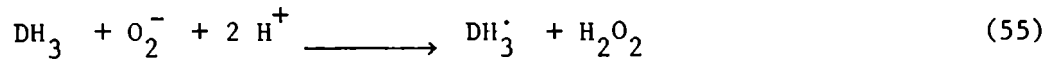
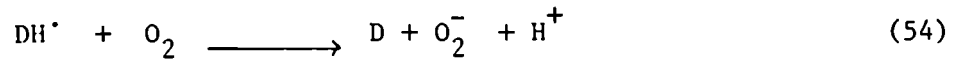
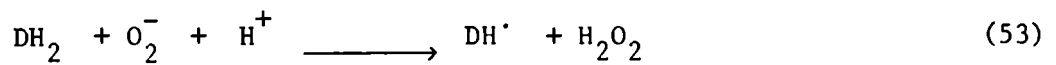
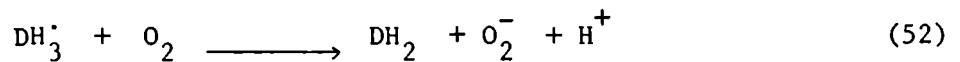
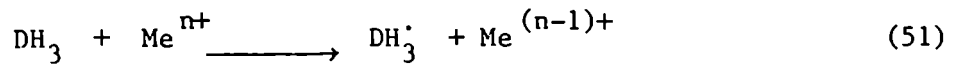
Rata	Dieta (g / 100 g de peso)
Deficiente en vitamina E y selenio	básica:-levadura de torula 30.0
	-aceite de hígado de bacalao 5.0
	-mezcla de sales (H.M.W.) 5.0
	-mezcla de vitaminas (sin E ni A) 1.0
	-sacarosa 59.0
Deficiente en vitamina E	básica + 0.36 mg de selenio
Deficiente en selenio	+ 3.0 mg de vitamina E
Control	básica + 0.36 mg de selenio + 3.0 mg de vitamina E

## 2.5. Actividades enzimáticas.

### 2.5.1. Superóxido dismutasa.

Para determinar la actividad de esta enzima se midió espectrofotométricamente a 485 nm la inhibición de la formación de adrenocromo, por autooxidación de epinefrina (adrenalina), que ocurre de acuerdo con la siguiente serie de reacciones (Misra y Fridovich, 1972) (DH<sub>3</sub> es adrenalina, D es adrenocromo y Me es metal):





El método de medida usado se basa en la capacidad de la superóxido dismutasa de catalizar la dismutación del anión superóxido, inhibiendo la autooxidación de la epinefrina (reacciones 51-55).

Dadas las especiales características de la reacción de dismutación, se definió una unidad de superóxido dismutasa como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la velocidad de formación de adrenocromo a partir de epinefrina 1 mM (Boveris y col. 1983), calculada a partir de los datos obtenidos de un gráfico como el que se muestra en la figura 15, a y b. Se usó un medio de reacción que contenía epinefrina 1 mM, glicina-NaOH 50 mM, pH 10. Es importante considerar, que se usó pH alcalino, para que la reacción ocurra a velocidad medible y que a ese pH, la enzima conserva la mayor parte de su actividad (Misra y Fridovich, 1972). La unidad enzimática definida en esas condiciones experimentales, es equivalente a la llamada unidad Fridovich (Mac Cord y Fridovich, 1969), que se define a partir de la reducción de citocromo C 10  $\mu\text{M}$ . La adición de cianuro 1 mM al medio de reacción permitió evaluar diferencialmente la actividad de la superóxido dismutasa

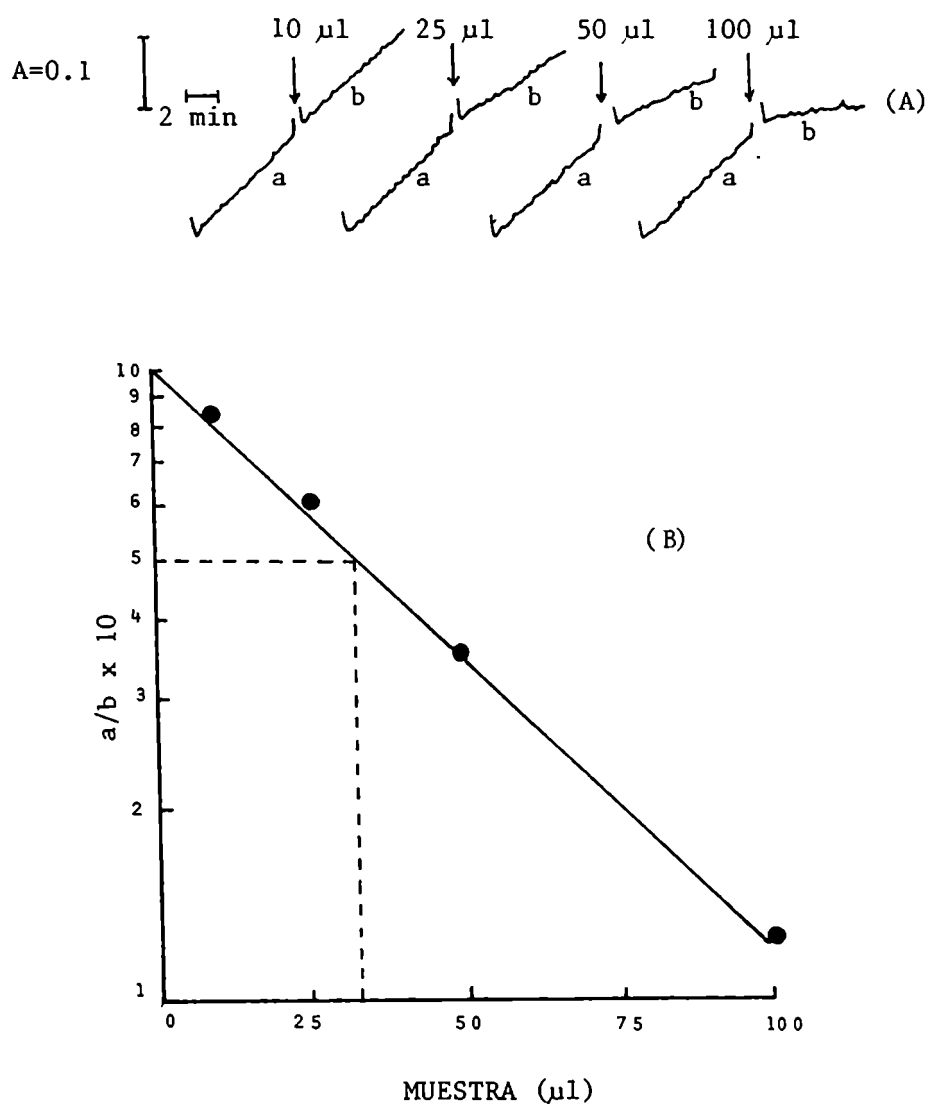


FIGURA 15. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa. (A) Los trazados muestran la variación de la velocidad de formación de adrenocromo por efecto de la adición de alícuotas de muestra. (B) Representación gráfica de los valores obtenidos de A. La línea punteada indica el volumen de muestra que contiene una unidad de enzima.

dependiente de Cu-Zn de la dependiente de Mn.

### 2.5.2. Catalasa.

La actividad de la catalasa se midió espectrofotométricamente a 240 nm por la desaparición de peróxido de hidrógeno del medio de reacción. La enzima actúa catalizando la reacción 33, (Chance y col., 1979). La velocidad total de la reacción está determinada por la velocidad de la reacción 34, y su expresión es la siguiente:

$$-d(H_2O_2)/dt = k \times (H_2O_2) \times (\text{catalasa})$$

Como el peróxido de hidrógeno se adicionó en exceso, la expresión de la velocidad total se reduce a la de una reacción de seudoprimer orden:

$$-d(H_2O_2)/dt = k' \times (\text{catalasa})$$

Experimentalmente se determinó la constante de seudoprimer orden,  $k'$ , midiendo la desaparición de peróxido de hidrógeno a 240 nm ( $E = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Chance, 1954). El valor de  $k = 4,6 \times 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , (Sies y col., 1973), se usó para determinar la concentración de catalasa en la fracción en estudio. La concentración de catalasa se expresó como nmoles de hemo o nmoles de catalasa (cada unidad de catalasa esta compuesta por cuatro unidades de hemo) por g de tejido.

El medio de reacción usado consistió en sodio-potasio fosfato 50 mM, pH 7.2, peróxido de hidrógeno 2 mM, Triton-X100 1 % y proteína en una concentración entre 0.1 y 0.3 mg/ml.

### 2.5.3. Glutación peroxidasa.

La actividad de esta enzima se midió espectrofotométricamente siguiendo la desaparición de NADPH a 340 nm. Las reacciones 37-39 fundamentan el método de medida (Flohe y Gunzler, 1984). Las reacciones 37 y 38 son catalizadas por la glutación peroxidasa, mientras que la reacción 39 es catalizada por la enzima glutación reductasa. Acoplando la reacción 39 a las reacciones 37 o 38, se consigue que la glutación peroxidasa trabaje a saturación de sustrato, por lo que de acuerdo con la estequiometría de las reacciones la cantidad de NADPH que se está oxidando es equivalente al peróxido que se oxida. Como hay 2 enzimas con actividad de glutación peroxidasa, una que contiene selenio y que utiliza peróxido de hidrogeno y peróxidos orgánicos como sustrato y otra que no contiene selenio y usa sólo peróxidos orgánicos (glutación transferasa), el uso diferencial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o de peróxidos orgánicos, permitió evaluar la actividad de cada una de estas enzimas. Así usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato se midió la actividad de la enzima dependiente de selenio, mientras que usando hidróperóxido de t-butilo (BOOH) se midió la actividad de ambas enzimas, el valor de la actividad de la enzima no dependiente de selenio se determinó por sustracción. Se usó un medio de reacción que estaba compuesto por: glutación 0.17 mM, 2 U/ml de glutación reductasa y 0.5 mM de peróxido (BOOH o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La actividad se expresó en unidades de enzima por g de tejido, definiendo como unidad de glutación peroxidasa la

cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto.

#### 2.5.4. Enzimas marcadoras de daño hepático.

La actividad de estas enzimas se determinó en suero, obtenido a partir de sangre extraída por punción cardíaca y centrifugada para precipitar eritrocitos. Se midieron las enzimas láctico deshidrogenasa (LDH), glutámico-oxalácetico transferasa (GOT) y glutámico-piruvato transferasa (GPT). Las actividades se expresan como unidades de actividad enzimática por litro de sangre.

#### 2.6. Otras determinaciones.

##### 2.6.1. Medida de la producción de anión superóxido.

La medida de la velocidad de producción de anión superóxido se llevó a cabo teniendo en cuenta los mismos principios teóricos que para la medida de superóxido dismutasa, pero modificando las condiciones experimentales. La oxidación de la epinefrina se realizó en un medio que contenía potasio cloruro 120 mM, potasio fosfato 30 mM, EDTA 1 mM, epinefrina 1 mM, pH 7.2. En estas condiciones se disminuyó a un mínimo la velocidad de autooxidación de la epinefrina, siendo sólo oxidada por el anión superóxido que era producido por el sistema bajo estudio (Figura 16). El agregado de superóxido dismutasa 0.5  $\mu\text{M}$ , redujo la velocidad de formación de adrenocromo a cero (Figura 16), corroborándose de esta manera la participación del anión superóxido oxidando a la epinefrina.

La velocidad de producción de anión superóxido se expresó en nmoles por minuto por g de tejido o mg de proteína.

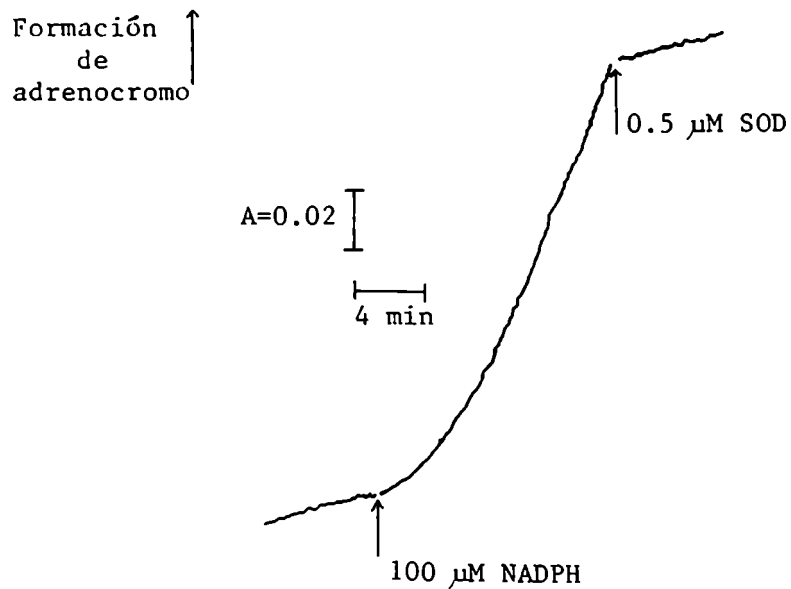
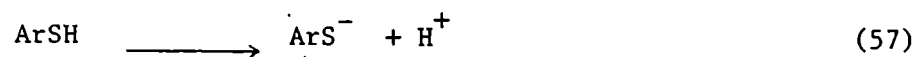
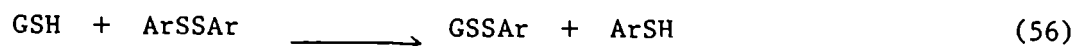


FIGURA 16. Producción de anión superóxido medida como formación de adrenocromo. SOD= superóxido dismutasa.

### 2.6.2. Medida del contenido de glutatión.

El contenido de glutatión total (GSH + 2 GSSG) se determinó siguiendo el método propuesto por Tietze (1969), cuyo fundamento teórico se expone en las siguientes reacciones (Owens y Belcher, 1965):



En las reacciones anteriores el ArSSAr representa al ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) y ArS- es su ión coloreado.

El método usado comenzó con la precipitación de las proteínas del homogeneizado con ácido perclórico 1%. Al sobrenadante se le adicionó glutatión reductasa (12 U/ml) y DTNB (0.15 mM). Se midió espectrofotométricamente la aparición de color a 412 nm. La concentración de glutatión se expresó como  $\mu$ moles por gramo de tejido.

### 2.6.3. Medida de la formación de malondialdehído.

El malondialdehído, reacciona con ácido tiobarbitúrico para dar un compuesto coloreado, cuyo máximo de absorbancia se localiza entre 525 y 535 nm (Bird y Drapper, 1984; Ernster y Nordenbrand, 1967). El homogeneizado de hígado, se preparó en un medio que contenía potasio cloruro 140 mM, potasio fosfato 20 mM, pH 7.3. Se ajustó la concentración de proteínas 1 mg/ml. Se incubó el homogeneizado a 37°C durante 2 horas, se tomó una alícuota de 0.3 ml, se la diluyó a 1.5 ml con agua destilada y se le agregó 1.5 ml de ácido tricloroacético 10 % V/V, a 0°C. Al cabo de 1 hora se centrifugó a 500 g durante 10 minutos y se tomaron 2 ml del sobrenadante, a los que se agregó 2 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico 0.67 % P/V y se incubó durante 10 minutos a 100°C. Se enfrió la solución y se determinó, dentro de los 15 minutos, la absorbancia a 535 nm ( $E = 156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La cantidad de malondialdehído presente se expresó en

nmoles por mg de proteína.

#### 2.6.4. Medida de la formación de dienos conjugados.

La formación de dienos conjugados en homogeneizados de hígado, fue seguida espectrofotométricamente entre 230 y 235 nm (Di Luzio, 1973). A estas longitudes de onda los peróxidos lipídicos presentan un máximo de absorción (Recknagel y Glende, 1984). La cantidad de dienos se expresó como nmoles de hidroperóxido por mg de proteína.

#### 2.6.5. Determinación de proteínas.

La cantidad de proteínas presentes en cada fracción se evaluó usando el reactivo de Folin-Cicalteau (Lowry y col., 1951) y albúmina de suero bovino como testigo.

### 2.7. Drogas y reactivos.

#### 2.7.1. Polifenoles vegetales.

Se usaron polifenoles vegetales aislados y caracterizados en el IQUIMEFA (Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires). Las referencias bibliográficas acerca de su aislamiento y caracterización pueden ser consultadas en Fraga y col., (1984). Los polifenoles usados pertenecen a 2 grupos: flavonoides y ácidos cafeoilquínicos. Los flavonoides estudiados se agrupan de acuerdo con su estructura química, en:

a) flavonas: pedalitina, apigenina, roifolina, genkwanina,



5,6,3-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.

b) flavanonas: eriodictiol, 7,4'-dihidroxi-5-metoxiflavanona.

c) flavonoles (aglucones y sus glucósidos): rutina, ombuósido, galangina-3-metil-eter, quercetina, quercetina-3-metil-eter, canferol, quercitrina.

d) chalconas: 4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona.

e) catequinas: (+)-catequina.

Los ácidos cafeoilquínicos empleados fueron: cafeico, clorogénico (monocafeoilquínico), isoclorogénico y 3,4-dicafeoilquínico.

Las estructuras químicas de algunos de estos compuestos (los que fueron ensayados *in vivo*) se muestran en la figura 17.

### 2.7.2. Drogas y reactivos comerciales.

Vitamina E (D- $\alpha$ -tocoferol), Tris, epinefrina bitartrato, citocromo c, Triton X-100, NADPH, glutatión reductasa de levadura, glutatión reducido, superóxido dismutasa, ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico, albúmina de suero bovino, vitamina A (retinol palmitato-tipo IV), (+)-cianidanol-3 ((+)-catequina), eran marca Sigma (Sigma Chemical Co., Saint Louis, U.S.A.). Barbital sódico (5,5'-dietilbarbiturato de sodio), reactivo de Foiln-Cicalteau, eran marca Merck (Merck, Darmstadt, Alemania). Hidroperóxido de t-butilo era marca Aldrich (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, U.S.A.). Dimetilsulfóxido era marca Fluka (Suiza). Uretano era marca BDH (Londres, Inglaterra). Glicina era marca Mallinckrodt

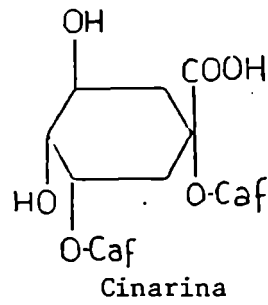
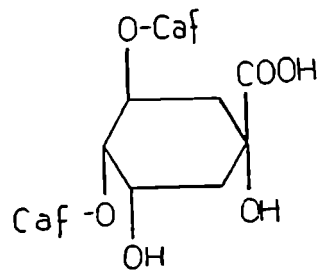
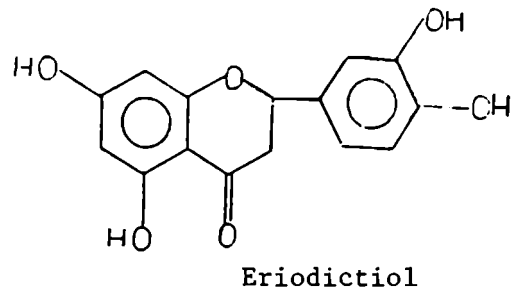
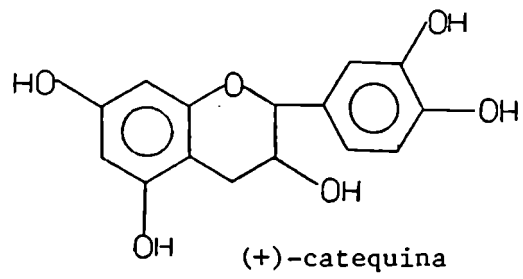


FIGURA 17. Estructura química de polifenoles vegetales.

(Argentina). Peróxido de hidrógeno era marca Baker (Baker Chemical Co. Phillisburg. U.S.A.). Nembutal era marca Abbot (Abbot Laboratories, North Chicago, U.S.A.). EDTA era marca Carlo Erba (Argentina). Las vitaminas y las sales para la dieta de las ratas alcohólicas eran marca ICN (Life Science Group, Cleveland, U.S.A.).

Las actividades de las enzimas LDH, GOT y GPT se determinaron usando un equipo de determinaciones comercial de Laboratorios Boehringer (Argentina). Los demás reactivos y drogas usados fueron de grado analítico.

#### 2.8. Estadística y expresión de los resultados.

Los resultados se expresaron como media más error standard de la media ( $\bar{x} \pm \text{ESM}$ ). En algunos casos se expresaron resultados como media más desviación standard, en esos casos se especificó su uso. El análisis estadístico de los resultados se hizo usando el test "t" de Student para comparar 2 muestras y el análisis de la varianza (ANOVA-Test, Texas Instruments) para comparar más de 2 muestras.

## **Resultados**

### 3. QUIMIO-LUMINISCENCIA DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

1. DETERMINACIONES DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FUNCIONAMIENTO DEL CONTADOR DE FOTONES
2. QUIMIO-LUMINISCENCIA DE HIGADO

### 3. Quimioluminiscencia de sistemas biológicos.

#### 3.1. Determinación de las condiciones óptimas de funcionamiento del contador de fotones.

Para la puesta en funcionamiento del contador de fotones se llevaron a cabo una serie de operaciones a fin de establecer los valores adecuados de voltaje aplicado, umbrales de discriminación y eficiencia de conteo, utilizando sistemas de emisión conocida.

##### 3.1.1. Voltaje aplicado.

El voltaje máximo que puede aplicarse sobre el fototubo usado es de -2200 V. Aplicando distintos voltajes, se obtuvieron los valores de quimioluminiscencia que se muestran en la figura 18. Estos valores fueron obtenidos a partir de una fuente emisora de fotones de intensidad constante (Hastings y Weber, 1963). Es de hacer notar que si bien esta fuente produce emisiones altas ( $10^4 - 10^5$  cps), los resultados obtenidos no fueron significativamente distintos que cuando se trabajó con fuentes de baja emisión ( $10^2 - 10^3$  cps), como fue el caso de los sistemas biológicos estudiados. Luego se midió el nivel de corriente oscura (ruido), determinándose el valor de voltaje óptimo para el cual se obtiene la mejor relación señal:ruido. En la figura 18 se muestran los valores obtenidos para esta relación, resultando -1300 V el potencial al cual se obtiene la mejor.

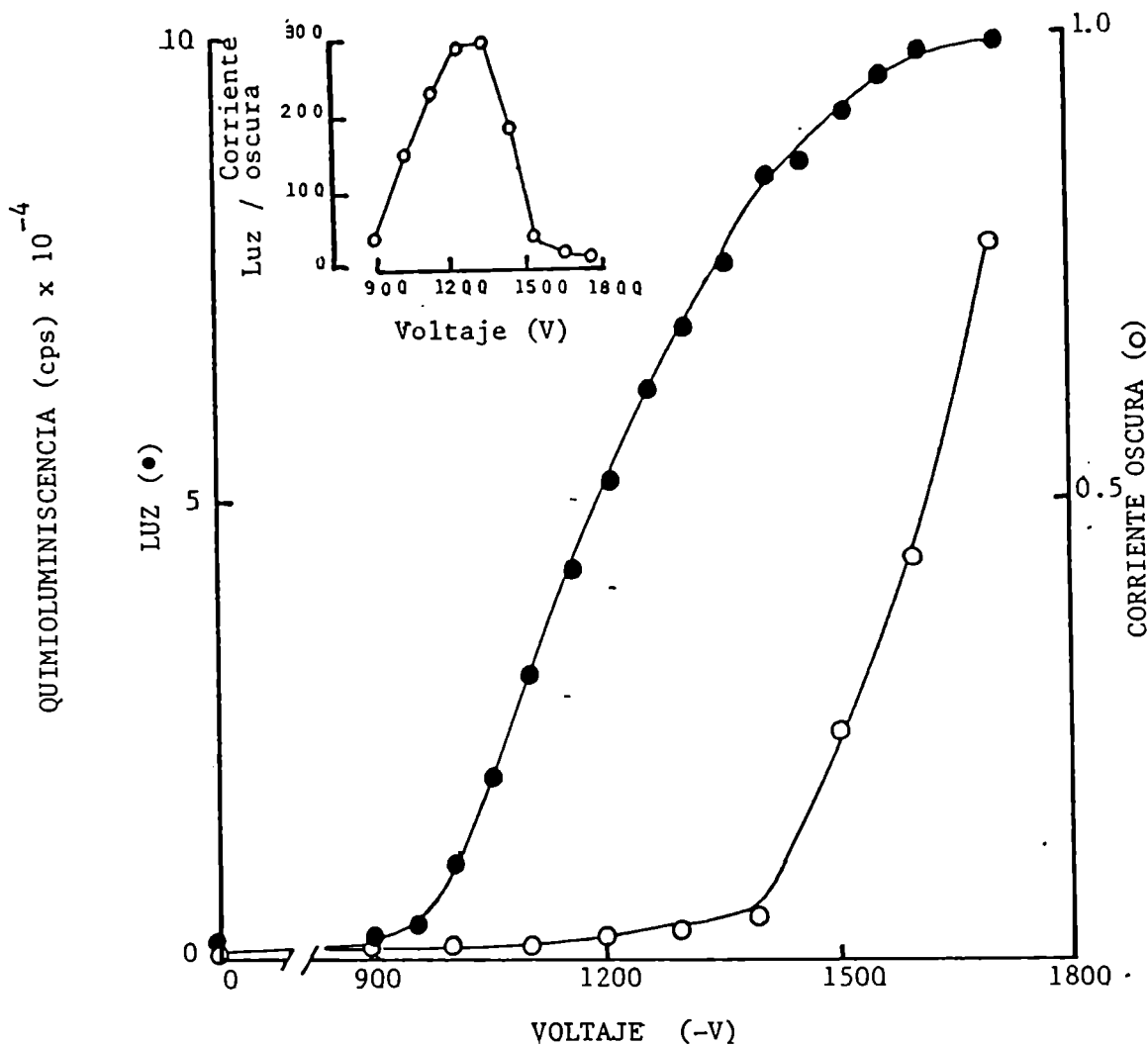


FIGURA 18. Quimioluminiscencia en función del voltaje aplicado. Se midió la emisión de una fuente constante (●) y la corriente oscura (○). Los umbrales de discriminación se fijaron en 2 y 6, el inferior y el superior respectivamente

### 3.1.2. Rango de discriminación.

De acuerdo con lo explicado en la sección 2.1.3. y usando un voltaje de -1300 V, se determinó la posición de los umbrales de discriminación que producían la mejor señal (umbral 1, valor 2 y umbral 2, valor 6). En la figura 19 se pueden observar los resultados obtenidos para la medida de la emisión de una fuente

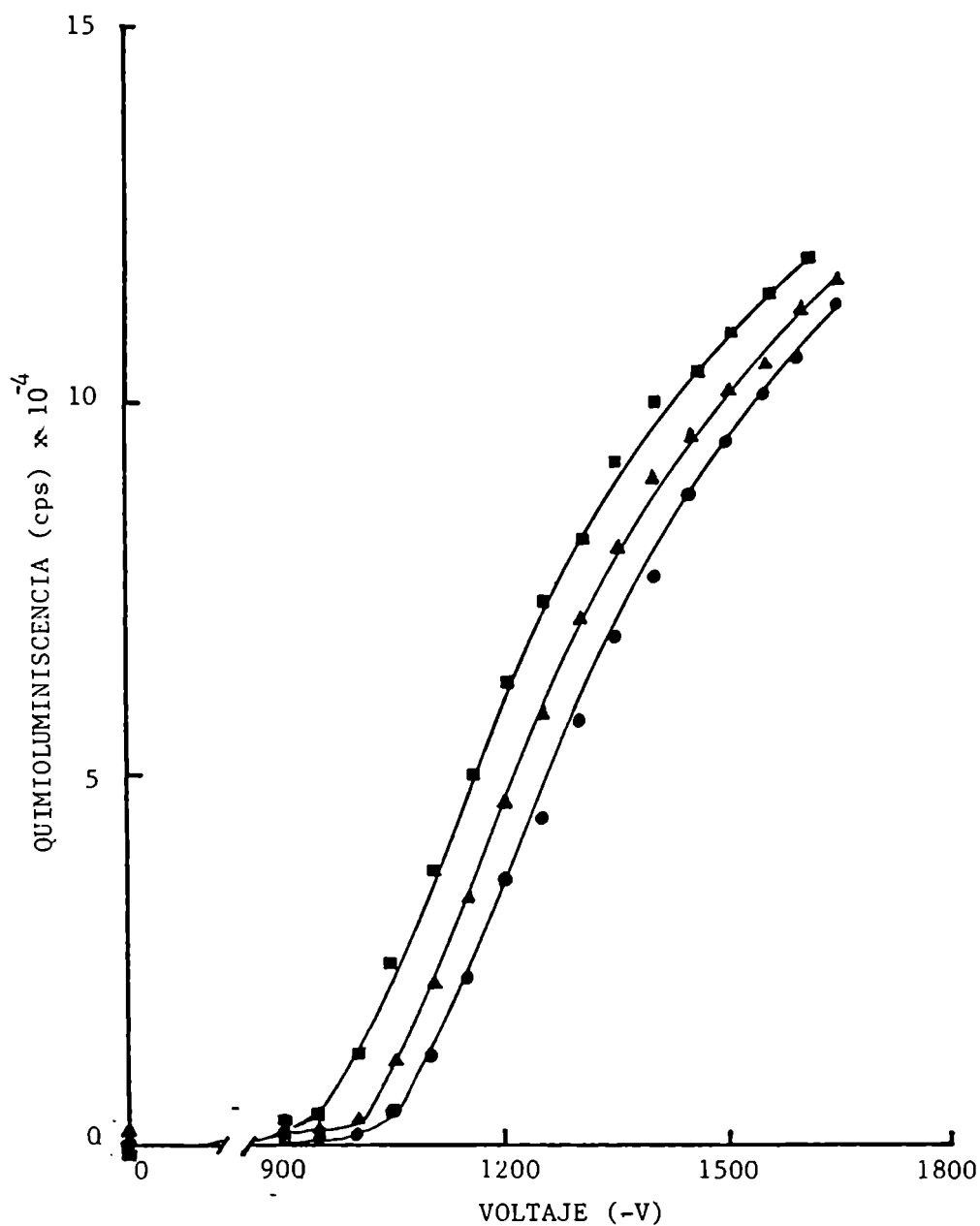


FIGURA 19. Quimioluminiscencia de una fuente constante en función del voltaje aplicado a diferentes umbrales de discriminación: 2 (■), 3 (▲) y 4 (●).



de intensidad constante, variando la posición del umbral de discriminación 1 entre los valores 2 y 4, y aplicando sobre el fototubo diferencias de potencial entre -900 y -1700 V. Se observó que si bien no existían diferencias significativas entre las tres curvas (Figura 19), es con el valor 2, con el que se obtuvo mayor sensibilidad. La posición del segundo umbral de discriminación no cambió significativamente los valores de emisión registrados.

### 3.1.3. Eficiencia del contador de fotones.

Para determinar la eficiencia del contador de fotones se utilizaron dos sistemas de emisión conocida: la emisión de semillas de soja y la emisión de la reacción entre citocromo c y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.1.3.1. Quimioluminiscencia de semillas de soja.

Se midió la emisión de semillas de soja secas y humedecidas. Se registró una emisión de 90 cps para las semillas secas y de 480 cps para las humedecidas con agua (Figura 20).

#### 3.1.3.2. Quimioluminiscencia del sistema citocromo c-peróxido de hidrógeno.

La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un sistema conteniendo citocromo c, produce una emisión de fotones que es dependiente de la concentración de los reactivos (Cadenás y col., 1980).

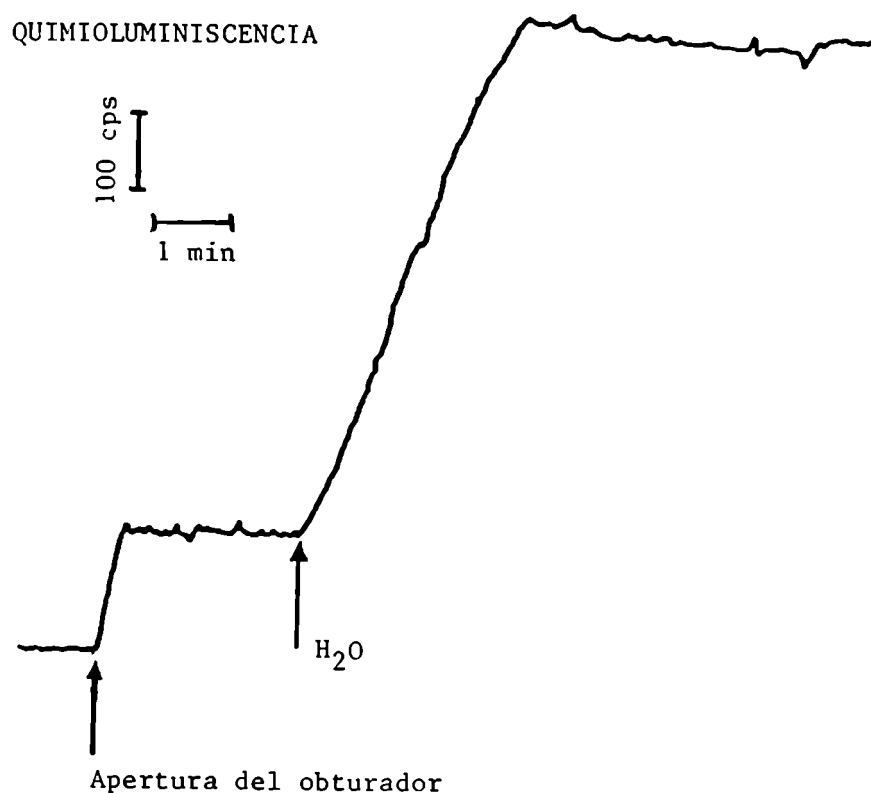


FIGURA 20. Quimioluminiscencia de semillas de soja secas y humedecidas con  $H_2O$ .

En la figura 21A se observa un trazado de la quimioluminiscencia obtenida cuando se mezcló citocromo c  $7 \mu M$  y  $H_2O_2$  5 mM. En la figura 21B, se observa que la quimioluminiscencia aumentó linealmente con la concentración de citocromo.

### 3.2. Quimioluminiscencia de hígado.

#### 3.2.1. Quimioluminiscencia de hígado medida in situ.

##### 3.2.1.1. Emisión espontánea de hígado de rata y ratón.

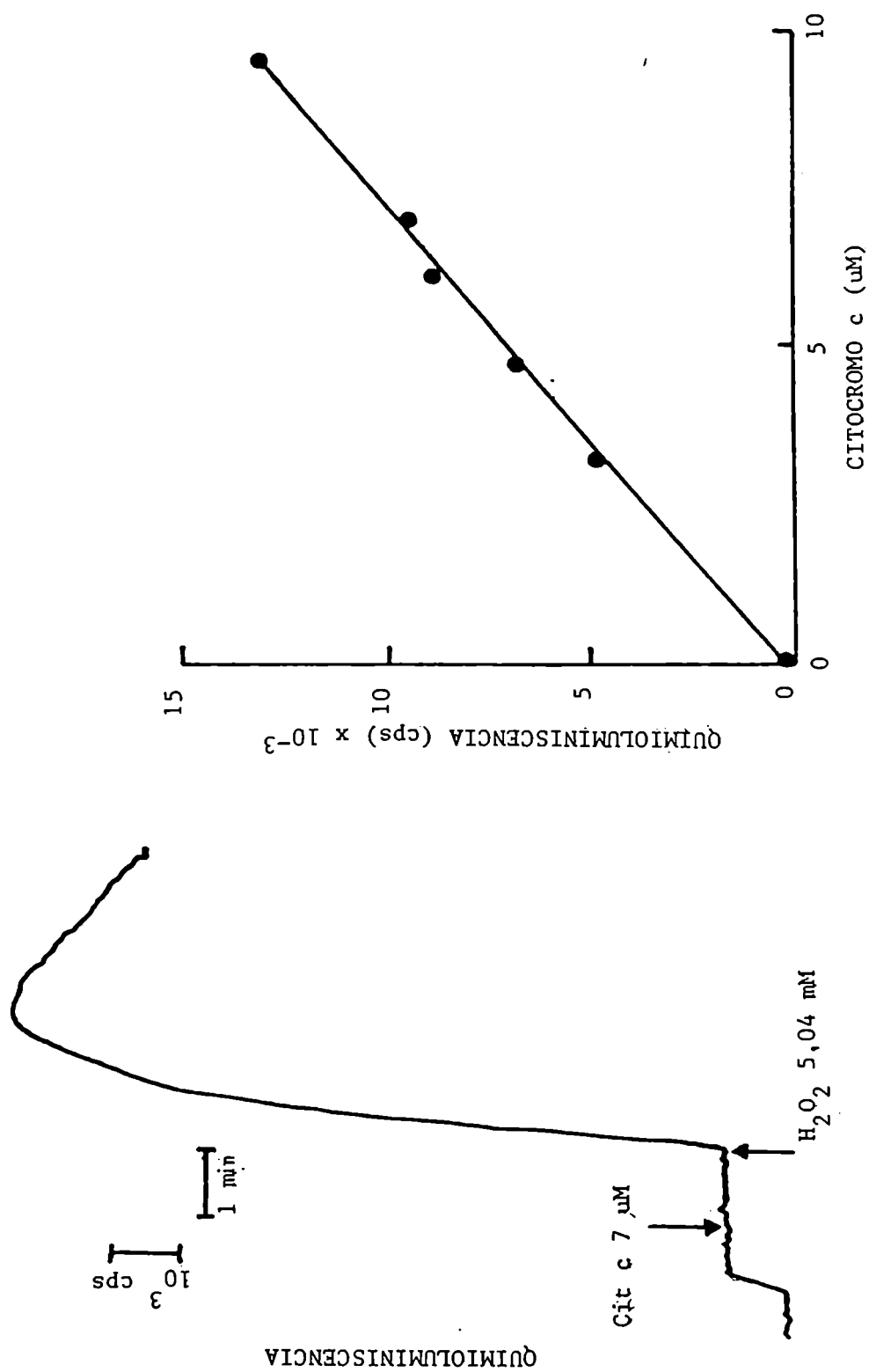


FIGURA 21. Quimioluminiscencia de citocromo c iniciada por peróxido de hidrógeno. A) trazado de quimioluminiscencia iniciada por la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a un medio de reacción conteniendo citocromo c; B) efecto de la concentración de citocromo c sobre la emisión iniciada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM.

En condiciones fisiológicas los tejidos aeróbicos emiten fotones. La emisión espontánea del hígado de ratas o ratones pudo ser medida in situ e in vivo. De esta medida se obtuvo un valor de emisión de  $24 \pm 2$  cps/cm<sup>2</sup> para el hígado de rata. Estos valores de fotoemisión son dependientes de la edad del animal (Varsavsky, 1983) y de la disponibilidad de oxígeno en el tejido (los hígados de animales muertos no emiten).

La superficie hepática a partir de la cual se midió esta emisión era del orden de 5 cm<sup>2</sup> y el peso de las ratas usadas de  $220 \pm 5$  g. Los hígados de ratones presentaron una emisión de  $109 \pm 6$  cps/cm<sup>2</sup>. En este caso la superficie de emisión fue del orden de 1 cm<sup>2</sup> y el peso de los animales de  $25 \pm 1$  g.

#### 3.2.1.2. Espesor activo de la emisión.

El hecho que la quimioluminiscencia de superficie mida fotones generados en las capas externas del órgano, hizo necesario conocer el espesor de tejido a partir del cual se generan los fotones detectados. Para ello se midió espectrofotométricamente la absorbancia de cortes de tejido de distinto espesor a diferentes longitudes de onda: 500, 550 y 650 nm. Estas longitudes de onda se eligieron, como veremos en la sección 3.2.1.3., ya que la mayor parte de la emisión medida tiene esa energía. Los resultados obtenidos están presentados en la figura 22. La absorbancia del tejido no es significativamente diferente a las tres longitudes de onda estudiadas, pudiéndose por lo tanto considerar una única recta

( $p < 0.05$ ).

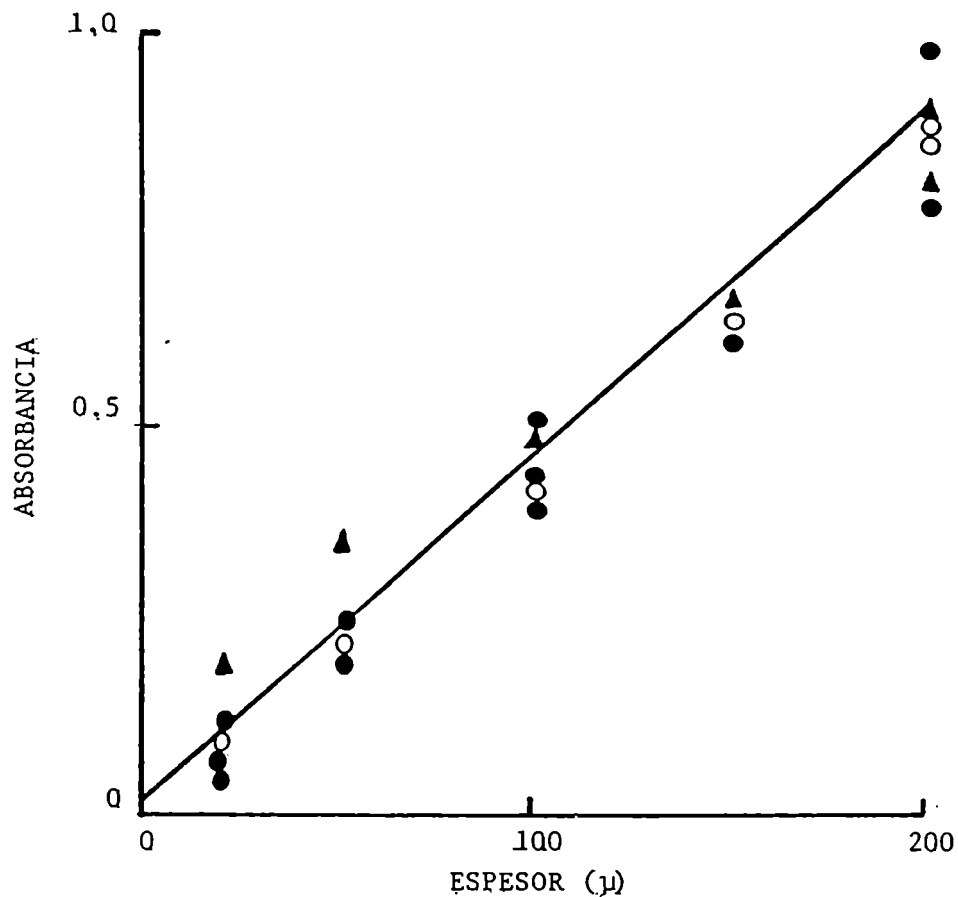


FIGURA 22. Absorbancia de cortes de hígado de diferente espesor, medida a distintas longitudes de onda: 500 nm (o), 600 nm (●) y 650 nm (▲).

En la figura 23 se pueden observar estos mismos resultados expresados en transmitancia. De la integral bajo la curva, se obtuvo un valor del espesor activo, o sea del espesor del cual procede la emisión, de 90  $\mu$ m. Considerando que un hepatocito tiene un diámetro de 25  $\mu$ m, la emisión registrada provendría de hasta 4 capas de células.

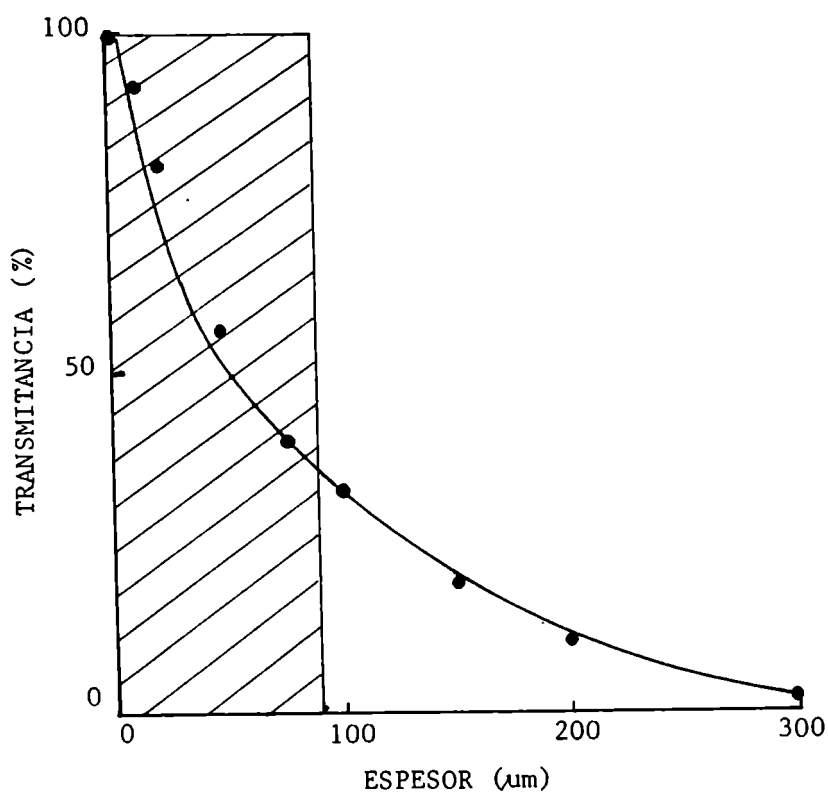


FIGURA 23. Transmitancia de cortes de hígado. El área rayada representa la integral bajo la curva.

### 3.2.1.3. Análisis espectral de la quimioluminiscencia espontánea.

La identificación de las especies emisoras es un requisito esencial para el conocimiento de las reacciones involucradas en esa emisión.

Las posibles especies excitadas que se forman en sistemas biológicos son el oxígeno singlete, cuyas principales bandas de emisión se localizan a 634, 703 y 1268 nm, y los grupos

carbonilo excitados con bandas de emisión a 420-460 nm. Para la identificación de estas especies, se estudió el espectro de la quimioluminiscencia medida. Se usaron filtros de corte que absorben a 560, 600 y 715 nm, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 24.

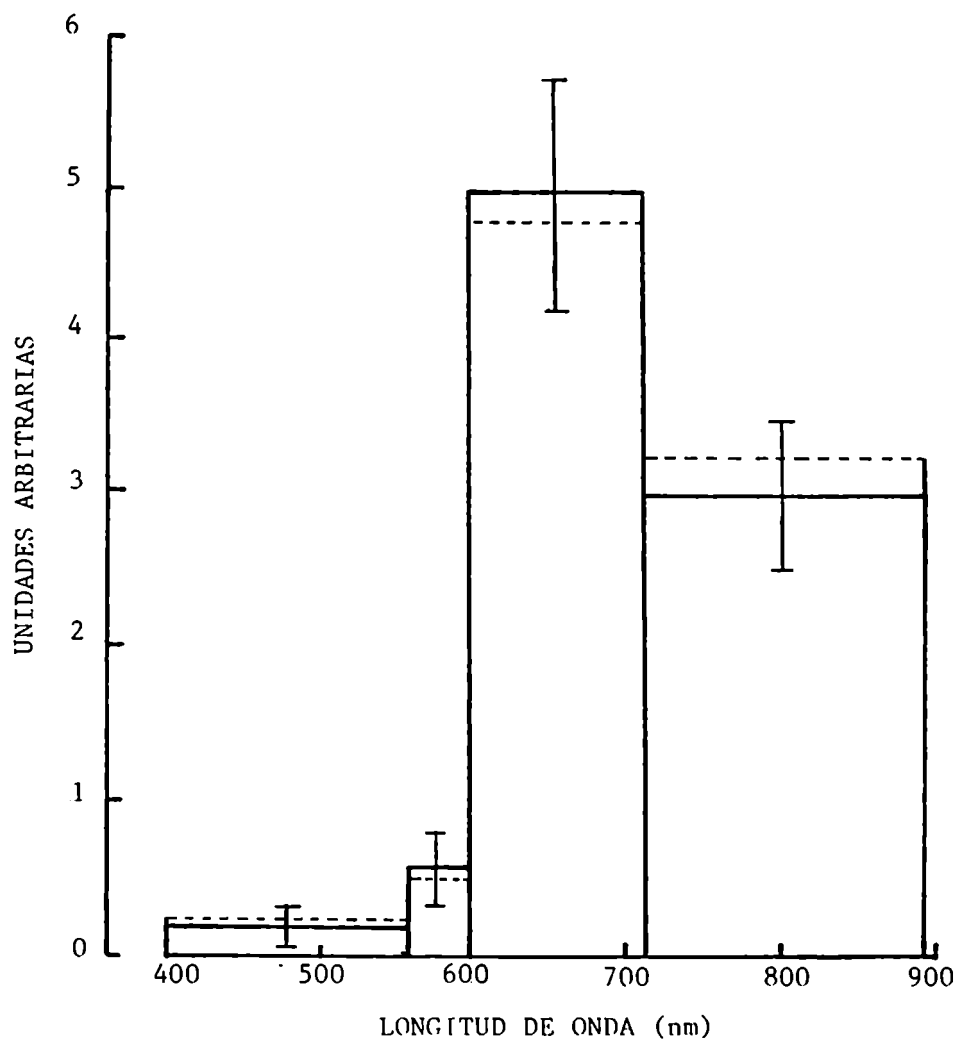


FIGURA 24. Distribución espectral de la quimioluminiscencia espontánea y estimulada por  $\text{CCl}_4$  de hígado de ratón. Quimioluminiscencia espontánea (—); estimulada por  $\text{CCl}_4$  (----).

De estos resultados se infiere que el 95 % de la emisión se

midió a longitudes de onda mayores que 600 nm. De este 95 %, el 50 % (48 % de la emisión total) se debería a la producción de fotones generados en la desexcitación dimol del oxígeno singulete (bandas a longitudes de onda entre 600 y 715 nm). El resto de la emisión medida, debajo de los 600 nm, se debería a la desexcitación de carbonilos excitados. La emisión monomol del oxígeno singulete (1268 nm) no puede ser detectada con el fototubo empleado, que es sensible hasta 900 nm.

### 3.2.2. Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares de hígado.

Se midió la quimioluminiscencia de fracciones subcelulares iniciada por BOOH de acuerdo con el esquema experimental detallado en la sección 2.2.2. Los niveles de emisión fueron dependientes de la fracción utilizada, de la concentración de proteínas de la fracción y de la concentración de hidróperóxido adicionada.

En la figura 25 se pueden observar trazados de quimioluminiscencia de homogeneizados, mitocondrias y microsomas de hígado de rata, luego de la adición de BOOH. La emisión se modificó variando la concentración de proteínas en la fracción y la cantidad de hidróperóxido adicionado (Figura 26). No se observaron diferencias cualitativas cuando se trabajó con hígado de ratón.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en todos los experimentos se usó BOOH 3 mM y concentraciones de proteínas de



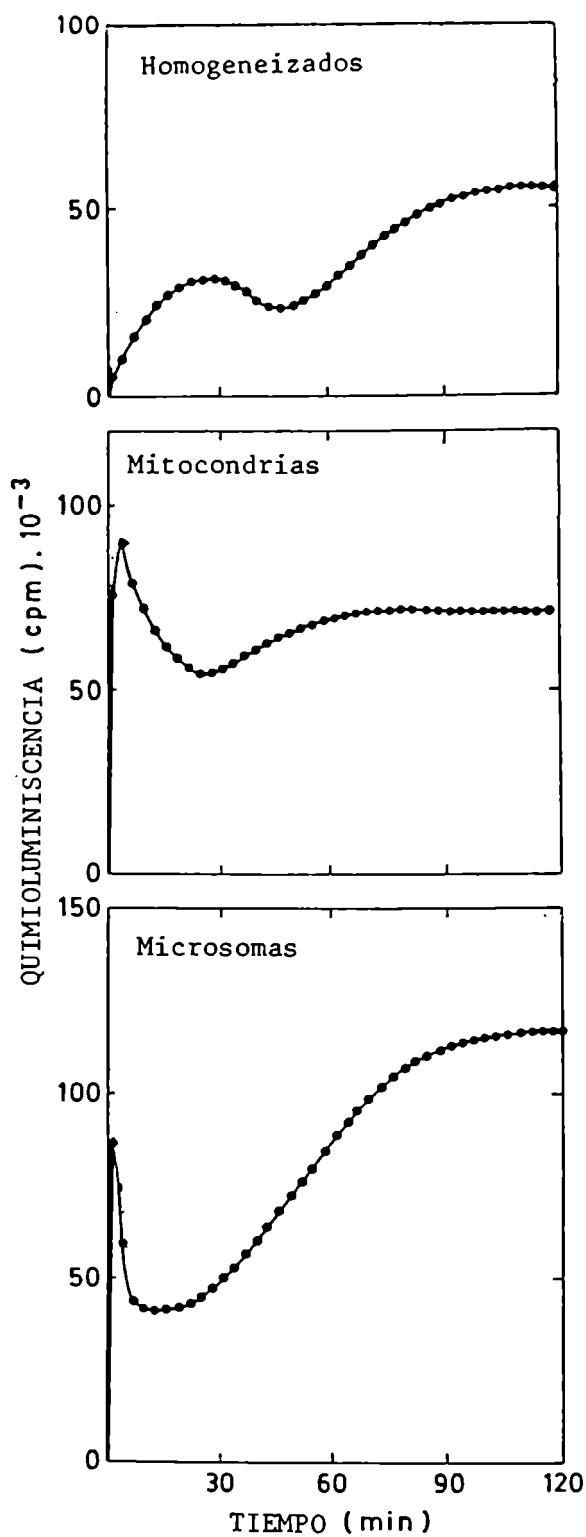


FIGURA 25. Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares de hígado de rata, iniciada por hidroperóxido de t-butilo,

1 mg/ml en homogeneizados y mitocondrias y 0.25 mg/ml en microsomas. Las concentraciones de proteína usadas si bien no produjeron la emisión más alta, trabajando con ellas se evitó la precipitación durante el tiempo de medida y se pudieron obtener buenas medidas luego de la adición del hidropéroxido. Es importante considerar la temperatura a la cual se llevan a cabo los experimentos, que en este caso fue de 25°C. A temperaturas menores la emisión disminuyó significativamente.

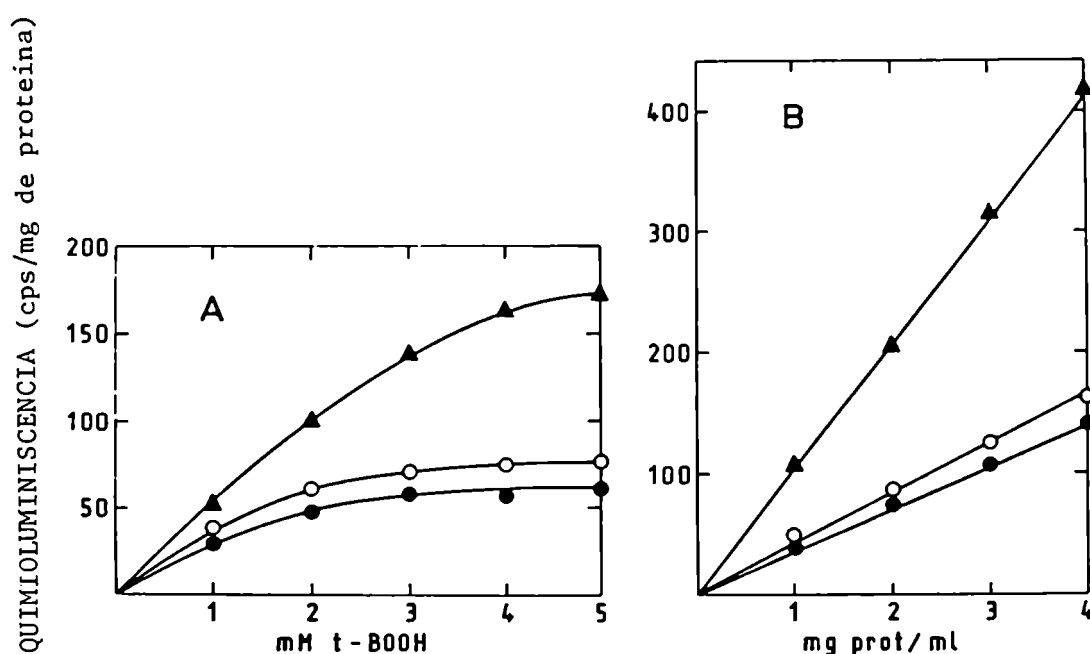


FIGURA 26. Dependencia de la quimioluminiscencia iniciada por hidropéroxido de t-butilo con la concentración de proteínas (A) y con la concentración de hidropéroxido (B), en homogeneizados (o), mitocondrias (●) y microsomas (▲) de hígado de rata.

#### 4. INTOXICACION CON TETRACLORURO DE CARBONO

#### 4. Intoxicación con tetracloruro de carbono.

##### 4.1. Quimioluminiscencia de hígado de ratón.

##### 4.1.1. Emisión espontánea del hígado.

Se midió la quimioluminiscencia de hígado de ratón de acuerdo con el procedimiento explicado en la sección 2.2.1. La emisión espontánea del hígado de los ratones fue de  $109 \pm 6$  cps/cm<sup>2</sup> de superficie hepática expuesta.

La inyección intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> produjo un aumento de la emisión, entre los 30 y 80 s, posteriores a la administración de la droga (Figura 27).

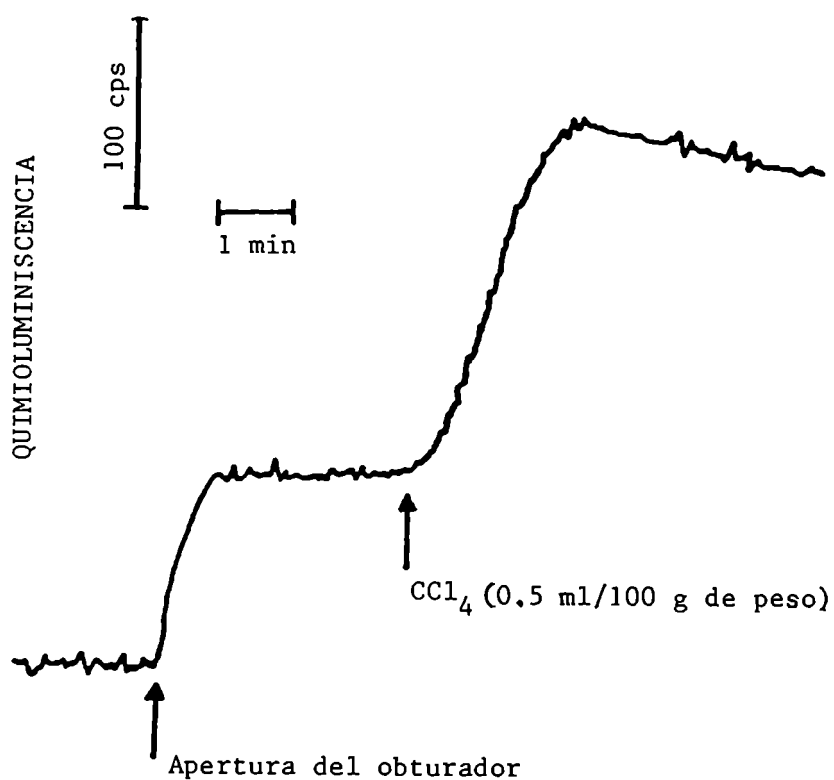


FIGURA 27. Quimioluminiscencia espontánea y estimulada por tetracloruro de carbono de hígado de ratón medida in situ.

Los aumentos de emisión fueron proporcionales a la dosis de  $\text{CCl}_4$  inyectada (Figura 28).

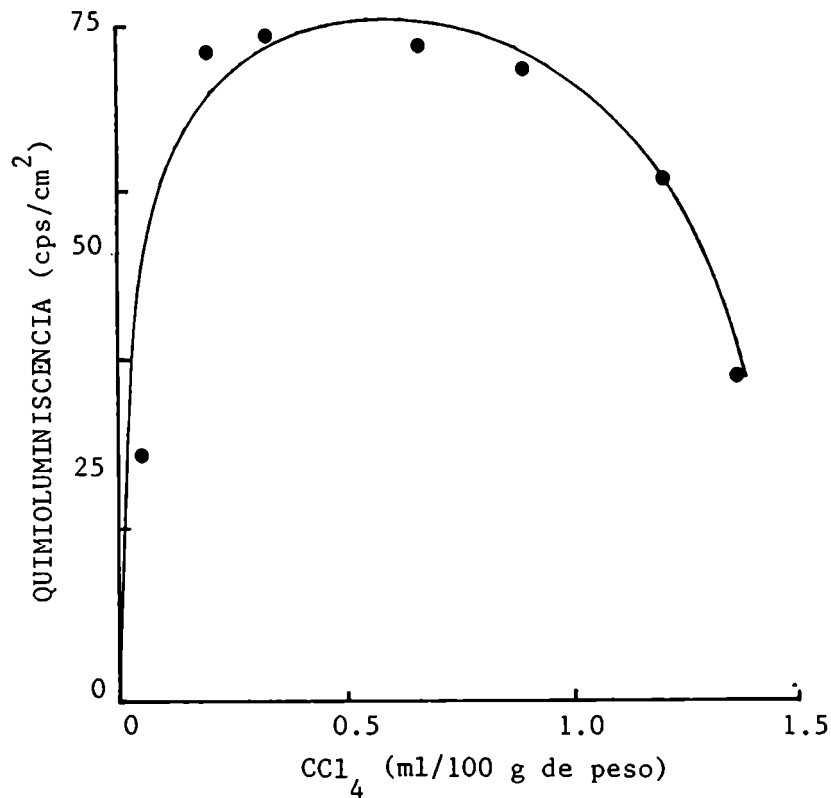


FIGURA 28. Efecto del  $\text{CCl}_4$  sobre la quimioluminiscencia de hígado de ratón, medida in situ.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se usó como dosis de experimentación, en las distintas situaciones a estudiar, 0.5 ml de  $\text{CCl}_4$ /100 g de peso corporal. Esta dosis produce un aumento de la emisión fisiológica de hígado de ratón del 64 %, sobre los valores control, tomando el punto de máxima

quimioluminiscencia (Figuras 27 y 28).

4.1.2. Emisión espontánea de hígado de ratón determinada en forma transcutánea.

Se midió la quimioluminiscencia del hígado de ratones sin anestésicar de acuerdo con lo explicado en la sección 2.2.1. Los valores obtenidos en estas determinaciones se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. QUIMIOLUMINISCENCIA DE HIGADO Y DE INTESTINO

Organo Expuesto	Quimioluminiscencia	
	Zona Héptica	Zona Intestinal
	(cps / cm <sup>2</sup> )	
Esponánea	109 ± 6 (20)	73 ± 11 (4)
+ CCl <sub>4</sub>	179 ± 19 (20)	83 ± 11 (4)
A través del músculo abdominal		
Esponánea	100 ± 7 (5)	71 ± 8 (5)
+ CCl <sub>4</sub>	167 ± 18 (5)	85 ± 17 (5)
A través de la piel		
Esponánea	87 ± 4 (6)	60 ± 8 (4)
+ CCl <sub>4</sub>	132 ± 20 (5)	72 ± 4 (4)

Los números entre paréntesis indican número de animales experimentales.

La emisión espontánea, medida a través de la piel,

disminuyó un 20 % y medida a través del músculo abdominal lo hizo en un 10 %, con respecto a los valores obtenidos para el mismo animal con el órgano expuesto. Ya que la anestesia era administrada antes de las medidas hechas a través del músculo abdominal, se puede inferir que no hubo efecto de la anestesia sobre los valores de emisión. Similares resultados se obtuvieron al medir quimioluminiscencia espontánea y estimulada por  $CCl_4$  (Tabla 3).

Asimismo fue posible indagar sobre la especificidad del hígado en la biotransformación del  $CCl_4$ . Para ello se midió la emisión en las zonas hepática e intestinal. Los resultados obtenidos muestran que en el hígado se registraron aumentos de la emisión del 64 % mientras que en intestino estos aumentos fueron mucho menores (14 %) (Tabla 3).

#### 4.1.3. Análisis espectral de la emisión estimulada por tetracloruro de carbono.

Los espectros de la quimioluminiscencia estimulada por la adición de  $CCl_4$ , no fueron significativamente diferentes de los obtenidos a partir de la emisión espontánea (Figura 24).

#### 4.2. Efecto del barbital sódico sobre el hígado de ratón.

##### 4.2.1. Masa hepática y microsomal.

La administración de barbituratos a mamíferos produce una inducción de la síntesis de proteína microsomal y del citocromo P450 (Remmer y col., 1967).

En nuestros experimentos se trataron ratones con barbital sódico de acuerdo con el procedimiento explicado en la sección 2.4.2. En los animales tratados durante 15 días se observó un aumento de la masa hepática del 37 %, que no fue acompañado por un incremento en el contenido proteico de los homogeneizados (Tabla 4) expresado por g de hígado. La proteína microsomal estaba incrementada en un 19 %.

TABLA 4. EFECTO DEL BARBITAL SOBRE LA MASA DE RETICULO ENDOPLAS-  
MICO DE HIGADO DE RATON.

Duración del tratamiento  (días)	Peso del hígado  (g)	Contenido de proteínas	
		Homogeneizados  (mg/g de hígado)	Microsomos
0	1.38 ± 0.1	110 ± 3	13.4 ± 0.9
3	1.55 ± 0.1	109 ± 8	14.0 ± 0.8
7	1.78 ± 0.1	110 ± 4	15.5 ± 0.9
15	1.89 ± 0.1	110 ± 3	16.0 ± 1.0

Se usaron 34, 10, 16 y 10 animales en los días 0, 3, 7 y 15 respectivamente

#### 4.2.2. Quimioluminiscencia de hígado de ratón.

En la figura 29 se muestra un trazado de quimioluminiscencia espontánea y estimulada por CCl<sub>4</sub> de hígado



de ratones tratados con barbital durante distintos intervalos de tiempo. El análisis estadístico de los valores de emisión espontánea del hígado de ratones tratados con barbital y ratones control ( $109 \pm 6$  cps/cm<sup>2</sup>) no muestra diferencias entre los grupos de animales estudiados a lo largo del tiempo de tratamiento (Tabla 5, Figura 30).

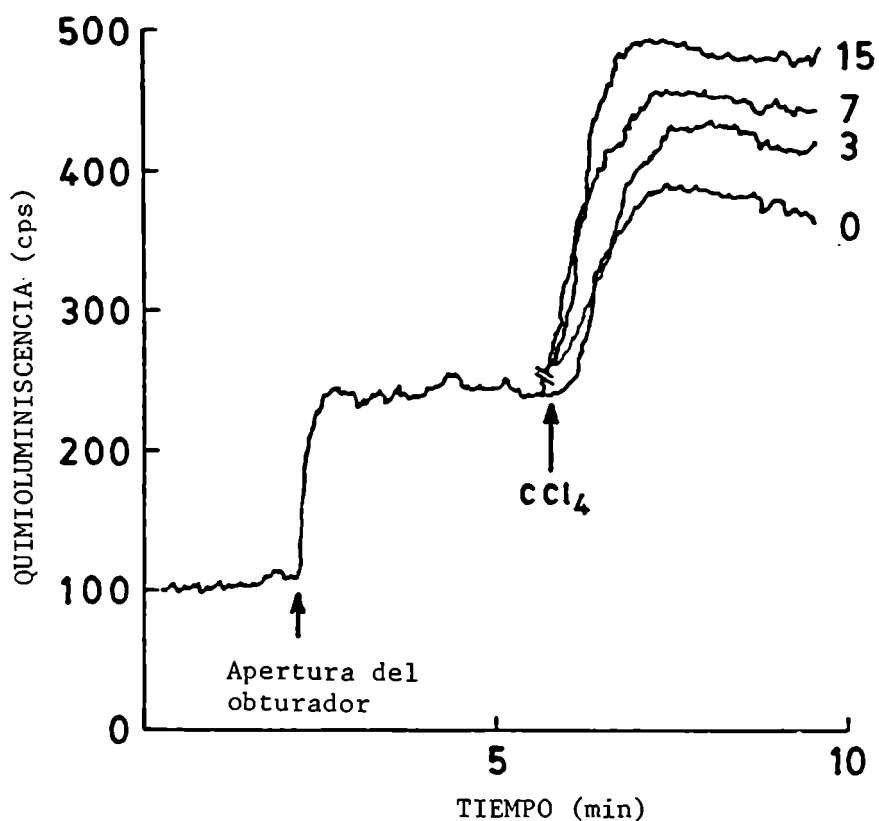


FIGURA 29. Trazado de quimioluminiscencia espontánea y estimulada por CCl<sub>4</sub> de hígado de ratón medida *in situ*. Los números en el trazado indican los días de duración del tratamiento con barbital.

TABLA 5. QUIMIOLUMINISCENCIA ESPONTANEA Y ESTIMULADA POR  $\text{CCl}_4$  DE HIGADO DE RATONES. QUIMIOLUMINISCENCIA INICIADA POR BOOH DE HOMOGENEIZADOS Y MICROSOMAS AISLADOS A PARTIR DE HIGADOS DE RATONES TRATADOS DURANTE DISTINTOS PERIODOS DE TIEMPO CON BARBITAL.

Quimioluminiscencia	Días de tratamiento				
	0	3	7	15	
Espontánea (cps/cm <sup>2</sup> )	109 ± 6	100 ± 7	106 ± 4	101 ± 16	
+ $\text{CCl}_4$ 2 (cps/cm <sup>2</sup> )	156 ± 6	173 ± 9	207 ± 11	235 ± 33	
Homogeneizados (cps/mg de proteína)	228 ± 25	275 ± 31	329 ± 39	542 ± 22	
(cps/g de hígado)	25100 ± 1600	30000 ± 2500	36200 ± 2900	59600 ± 1400	
Microsomas (cps/mg de proteína)	890 ± 13	1130 ± 10	1680 ± 17	1707 ± 10	
(cps/g de hígado)	11900 ± 670	15600 ± 180	26400 ± 250	27700 ± 160	

Se usaron 34, 10, 16 y 10 animales a los 0, 3, 7 y 15 días, respectivamente.

La emisión estimulada por  $\text{CCl}_4$  se incrementó significativamente en los hígados de los ratones tratados con barbital, siendo dependiente de la duración del tratamiento (Tabla 5, Figura 30).

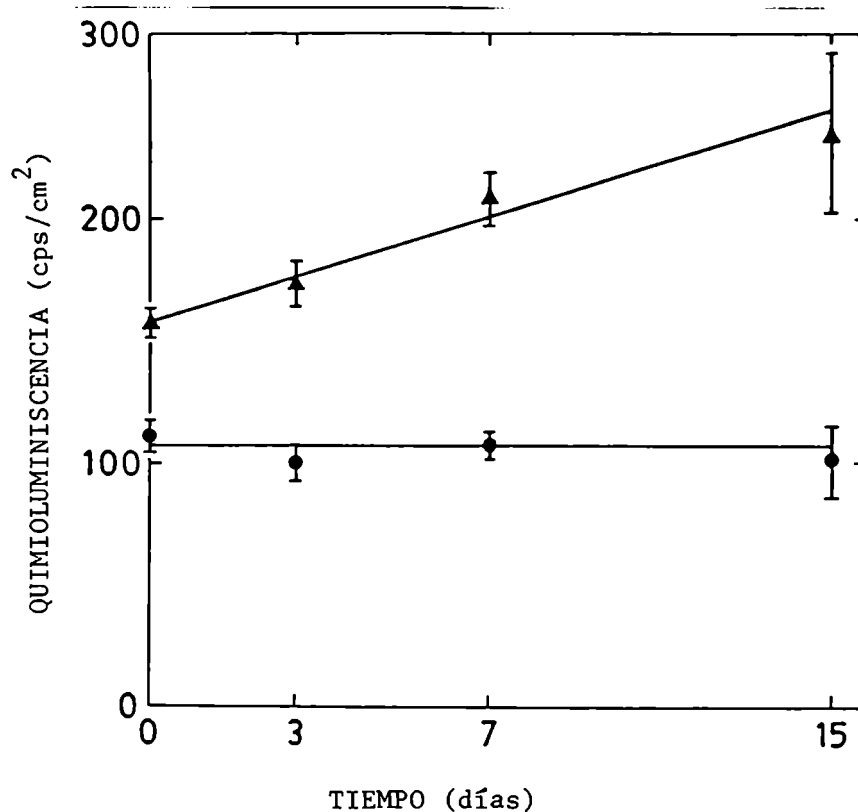
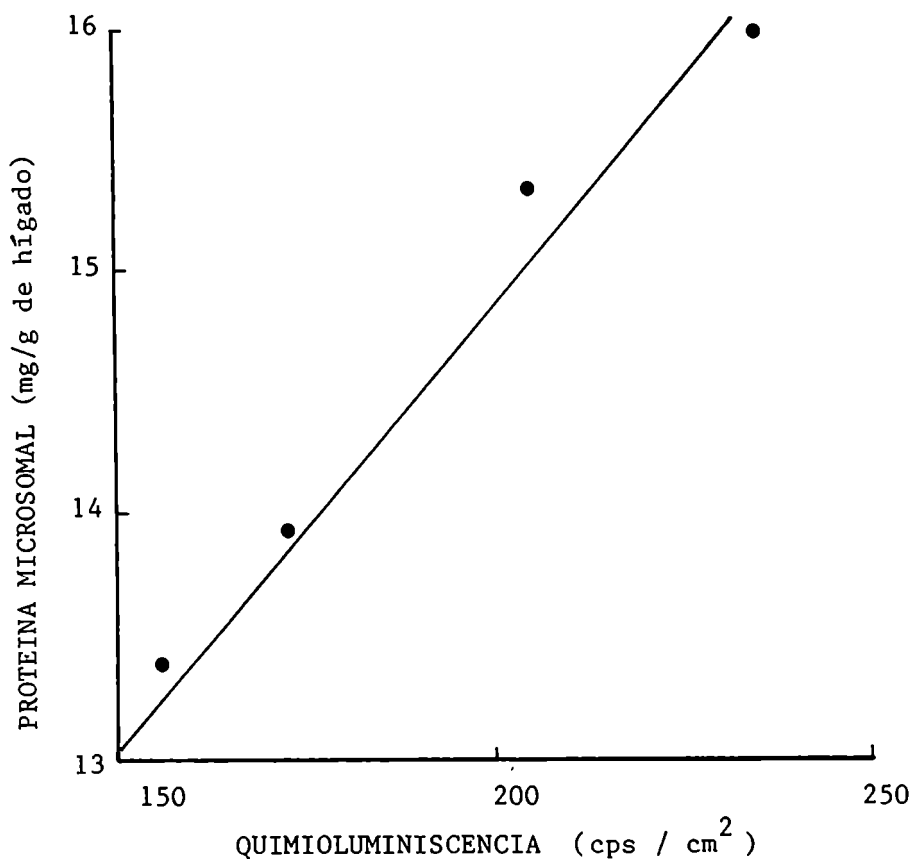


FIGURA 30. Quimioluminiscencia espontánea (●) y estimulada por  $\text{CCl}_4$  (▲) de hígado de ratón a lo largo del tratamiento con barbital.

Este aumento de la emisión se correlacionó con el aumento de citocromo P450, medido como incremento de la masa microsomal (Figura 31). Un análisis estadístico de estos resultados indica que los incrementos en la quimioluminiscencia estimulada por

CCl<sub>4</sub> fueron del 11, 33 y 51 % después de 3, 7 y 15 días de tratamiento, respectivamente.



#### 4.2.3. Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares iniciada por hidroperóxido de t-butilo.

Cuando se adicionó BOOH a fracciones subcelulares (sección 2.2.2.), se registró un aumento de la emisión que variaba a lo largo del tiempo y era diferente según se tratase de homogeneizados o microsomas (Figura 32).

Los homogeneizados de hígado de ratones tratados con

barbital mostraron una cinética de emisión semejante a la de los ratones control (Figura 32) y se registraron aumentos de quimioluminiscencia de 21, 44 y 40 % sobre los controles a los 3, 7 y 15 días de tratamiento respectivamente (Tabla 5).

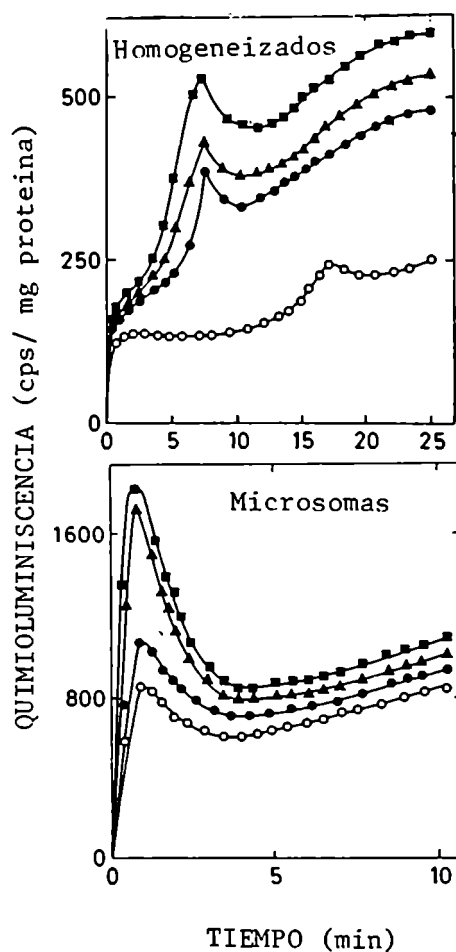


FIGURA 32. Quimioluminiscencia iniciada por hidropéroxido de t-butilo de homogeneizados y microsomas de hígado de ratones control (o) y tratados durante 3 (●), 7 (▲) y 15 (■) días con barbital.

A fin de comparar los valores de emisión de los hígados de los animales tratados y control, se tomó el valor de

quimioluminiscencia del pico de máxima emisión, a los 17 minutos luego de la adición del B<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H en los animales control y a los 7 minutos en los tratados.

Los resultados obtenidos de la quimioluminiscencia de microsomas adicionados con B<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H, mostraron aumentos de la emisión de 24, 89 y 92 % a los 3, 7 y 15 días de tratamiento respectivamente. Los valores de emisión fueron los obtenidos en los primeros minutos luego de la adición del B<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H y no se observaron diferencias, en el tiempo de aparición del pico de emisión, en los homogeneizados provenientes de animales tratados respecto de los control (Figura 32).

#### 4.2.4. Actividad de las enzimas antioxidantes.

Se midió la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa dependiente de selenio, de acuerdo con los procedimientos explicados en la sección 2.5. Las medidas se hicieron en los ratones tratados durante 15 días. Los resultados de estas medidas están sumarizados en la tabla 6.

La actividad de la superóxido dismutasa citosólica se encontró aumentada un 109 % sobre la actividad de la enzima en el hígado de los animales control. La actividad de la catalasa también se incrementó en un 90 % y la glutatión peroxidasa, dependiente de selenio, lo hizo en un 103 %.

El contenido de glutatión total, estaba aumentado en el hígado de los ratones tratados con barbital en un 18 %,.

respecto del contenido del hígado de los ratones control.

TABLA 6. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y CONTENIDO DE GLUTATION EN EL HIGADO DE RATONES TRATADOS CON BARBITAL.

	Días de tratamiento			
	0	3	7	15
Superóxido dismutasa (U/g de hígado)	174 ± 15 (29)	206 ± 33 (9)	259 ± 28 (16)	364 ± 73 (10) <sup>a</sup>
Catalasa (nmoles/ g de hígado)	1.02 ± 0.08 (17)	1.12 ± 0.07(4)	1.31± 0.10 (4)	1.64± 0.10(4) <sup>b</sup>
Glutación peroxidasa (U/g de hígado)	9.3 ± 1.1 (17)	11.4 ± 0.2 (4)	13.5 ± 0.6 (4)	18.9 ± 0.5 (4) <sup>b</sup>
Glutación (µmoles/g de hígado)	7.6 ± 0.2 (22)	8.3 ± 0.3 (8)	9.0 ± 0.6 (8)	8.8 ± 0.3 (8) <sup>c</sup>

Los números entre paréntesis indican el número de animales experimentales.

a:  $p < 0.01$

b:  $p < 0.001$

c:  $p < 0.005$

Las p fueron calculadas comparando los resultados obtenidos para 0 y 15 días.

## 5. INTOXICACION CON ETANOL

1. INTOXICACION CRONICA

2. INTOXICACION AGUDA



## 5. Intoxicación con etanol.

### 5.1. Intoxicación crónica.

#### 5.1.1. Efectos nutricionales de las dietas.

Koch y col., (1976) informaron que en un experimento similar al realizado en esta tesis, al concluir el período de tratamiento, 12 semanas, las ratas tratadas con etanol mostraban disminuciones en la respiración mitocondrial pero no presentaban hígado graso. En nuestros experimentos, al concluir el período de tratamiento, se registró un consumo promedio de etanol de  $1.74 \pm 0.12$  g/día/100 g de peso. El peso de los hígados fue de  $3.8 \pm 0.1$  g y de  $3.7 \pm 0.2$  g para las ratas control y tratadas respectivamente. La velocidad de crecimiento fue similar en los 2 grupos: las ratas alcanzaron, al momento de llevarse a cabo los experimentos, pesos de  $211 \pm 13$  g las tratadas y de  $205 \pm 5$  g las control.

Todos los resultados mostrados en esta sección, se expresan con su desviación standard.

#### 5.1.2. Contenido proteico del hígado.

El contenido proteico de las distintas fracciones subcelulares, se evaluó de acuerdo con los métodos explicados en la sección 2.6.3. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. La proteína microsomal (retículo endoplásmico) aumentó en las ratas tratadas con etanol entre un 27 y un 29 %, según se evaluase a partir de la proteína precipitada a  $105000$  g o a partir de la relación del contenido de citocromo P450 en el

homogeneizado y en la fracción microsomal. El contenido de citocromo P450 presente en la fracción microsomal aumentó en un 35 %.

TABLA 7. CONTENIDO DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL HIGADO DE RATAS TRATADAS CRONICAMENTE CON ETANOL.

	Control <sup>a</sup>	Tratadas con etanol <sup>a</sup>
Retículo endoplásmico (mg de proteína / g de hígado)	19.7 ± 1.2	25.4 ± 1.8 <sup>b,d</sup>
	22.3 ± 0.1	28.3 ± 1.2 <sup>c,d</sup>
Citocromo P450 (nmol / mg de proteína)	0.90 ± 0.02	1.22 ± 0.03 <sup>d</sup>
Mitocondrias (mg de proteína / g de hígado)	30.6 ± 2.1	32.4 ± 2.7
Citosol (mg de proteína / g de hígado)	40.0 ± 2.0	42.6 ± 3.0

a: n = 10

b: medido como la proteína precipitada a 105000 x g a partir del sobrenadante PS

c: medido a partir de citocromo P450 presente en homogeneizados y en la fracción P

d: p < 0.01

El contenido proteico de las fracciones mitocondrial y citosólica no se modificó significativamente por el tratamiento con etanol (Tabla 7).

### 5.1.3. Quimioluminiscencia espontánea de hígado.

La quimioluminiscencia de hígado de ratas tratadas con etanol durante 12 semanas fue de  $37 \pm 2$  cps/cm<sup>2</sup>; este valor representa un aumento del 54 % sobre los valores de emisión de los hígados de ratas control (24 cps/cm<sup>2</sup>), (Tabla 8, Figura 33).

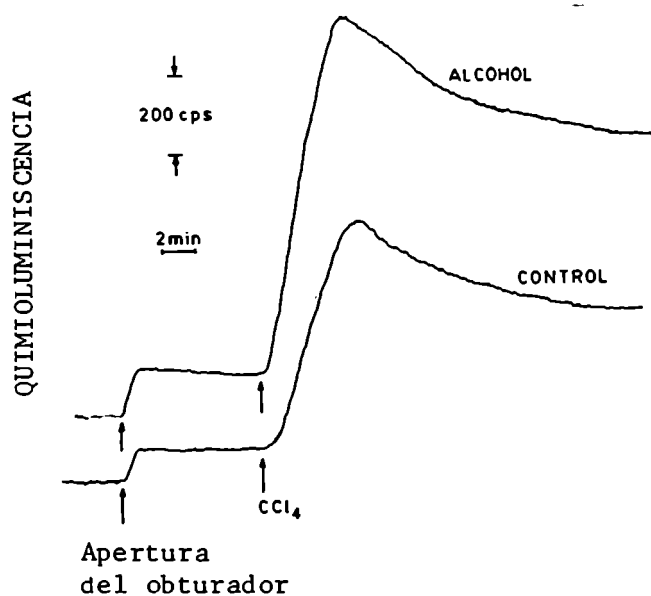


FIGURA 33. Quimioluminiscencia espontánea y estimulada por CCl<sub>4</sub> de hígado de ratas control y tratadas crónicamente con etanol, medida in situ.

La administración intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> incrementó la emisión instantáneamente de acuerdo con lo explicado en la

sección 4.1.1. Cuando las ratas tratadas con etanol fueron intoxicadas con  $\text{CCl}_4$ , el aumento de emisión producido fue un 63 % mayor que en las ratas control (Tabla 8).

TABLA 8. QUIMIOLUMINISCENCIA ESPONTANEA Y ESTIMULADA POR  $\text{CCl}_4$ , DE HIGADO DE RATAS CONTROL Y TRATADAS CRONICAMENTE CON ETANOL.

	Quimioluminiscencia (cps/cm <sup>2</sup> )	
	Control <sup>a</sup>	Tratadas con etanol <sup>a</sup>
Espontánea	24 ± 1	37 ± 2 <sup>b</sup>
+ $\text{CCl}_4$	158 ± 15	257 ± 21 <sup>b</sup>

a: n = 8

b: p < 0.01

#### 5.1.4. Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares.

La adición de BOOH sobre fracciones subcelulares produjo un aumento de su emisión. La figura 34 muestra los trazados de emisión de homogeneizados, mitocondrias y microsomas. No se observaron diferencias en las cinéticas de emisión de las fracciones aisladas a partir de animales tratados y sin tratar. La emisión en cambio estaba aumentada en todas las fracciones preparadas a partir de hígado de animales tratados. Los homogeneizados de los hígados de ratas intoxicadas, mostraron

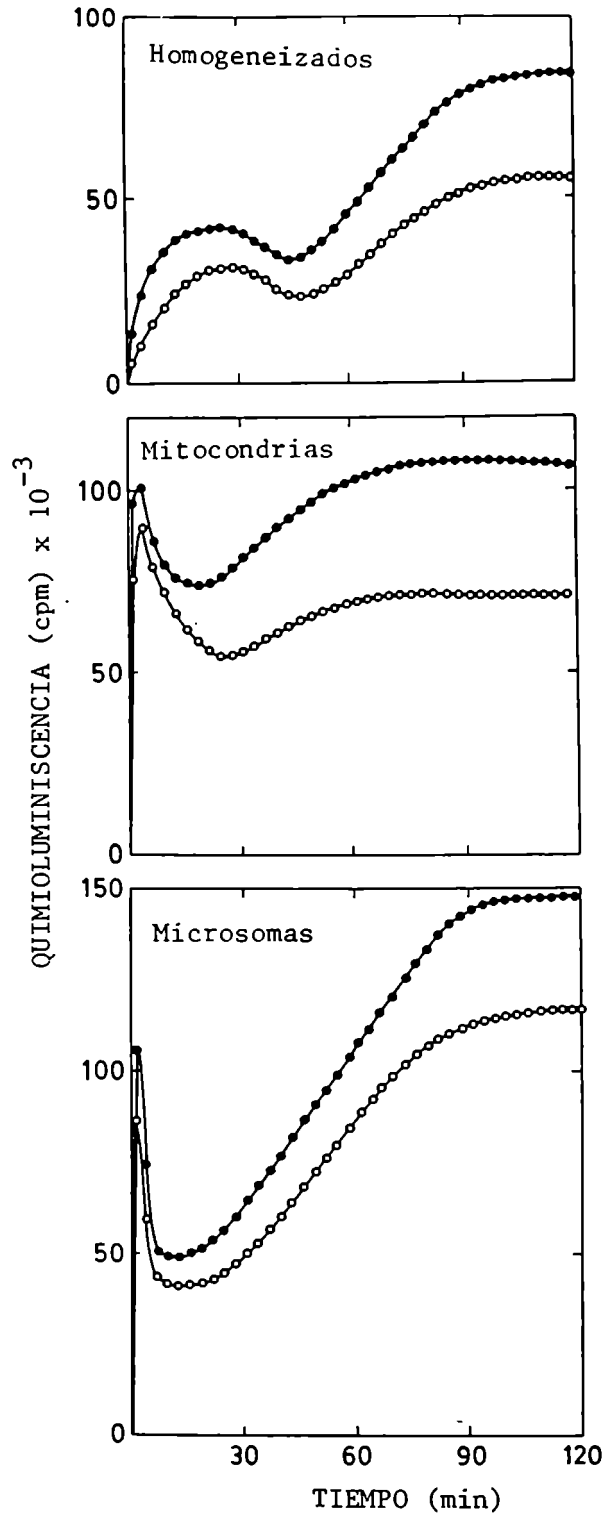


FIGURA 34. Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares iniciada por hidroperóxido de t-butilo. Las fracciones fueron aisladas a partir de hígado de ratas tratadas crónicamente con etanol (●) y de ratas control (○).

una emisión aumentada en un 57 % sobre la emisión de los control; la emisión de las mitocondrias aumentó en un 43 % y la de los microsomas en un 28 % (Tabla 9).

TABLA 9. QUIMIOLUMINISCENCIA INICIADA POR HIDROPEROXIDO DE t-BUTILO DE FRACCIONES SUBCELULARES AISLADAS A PARTIR DE HIGADOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CRONICAMENTE CON ETANOL. EFECTO DE LAS VITAMINAS A Y E.

	Quimioluminiscencia (cpm/mg de proteína) x 10 <sup>-3</sup>	
	Control <sup>a</sup>	Tratadas con etanol <sup>a</sup>
Mitocondrias	36 ± 2	51 ± 5 <sup>b</sup>
Microsomas	103 ± 5	132 ± 8 <sup>b</sup>
Homogeneizados	42 ± 3	66 ± 7 <sup>b</sup>
+ 12 U/ml vitamina A	38 ± 4	53 ± 8
+ 120 U/ml vitamina A	33 ± 4	36 ± 10
+ 0.25 U/ml vitamina E	40 ± 4	46 ± 5
+ 2.5 U/ml vitamina E	34 ± 6	42 ± 4

a: n = 8

b: p < 0.01

Cuando los homogeneizados fueron adicionados con vitaminas A y E se observó una disminución de la emisión que fue mayor en los homogeneizados provenientes de hígado de ratas tratadas con etanol (Tabla 9). La vitamina A adicionada en dosis de 120 U/mg de proteína, disminuyó la emisión en un 21 % en los

homogeneizados control y en un 45 % en los homogeneizados de ratas tratadas con etanol (Figura 35). La vitamina E (2.5 U/mg de proteína), disminuyó la emisión en un 20 % y en un 36 % en los homogeneizados de hígados de ratas control y tratadas respectivamente (Figura 35).

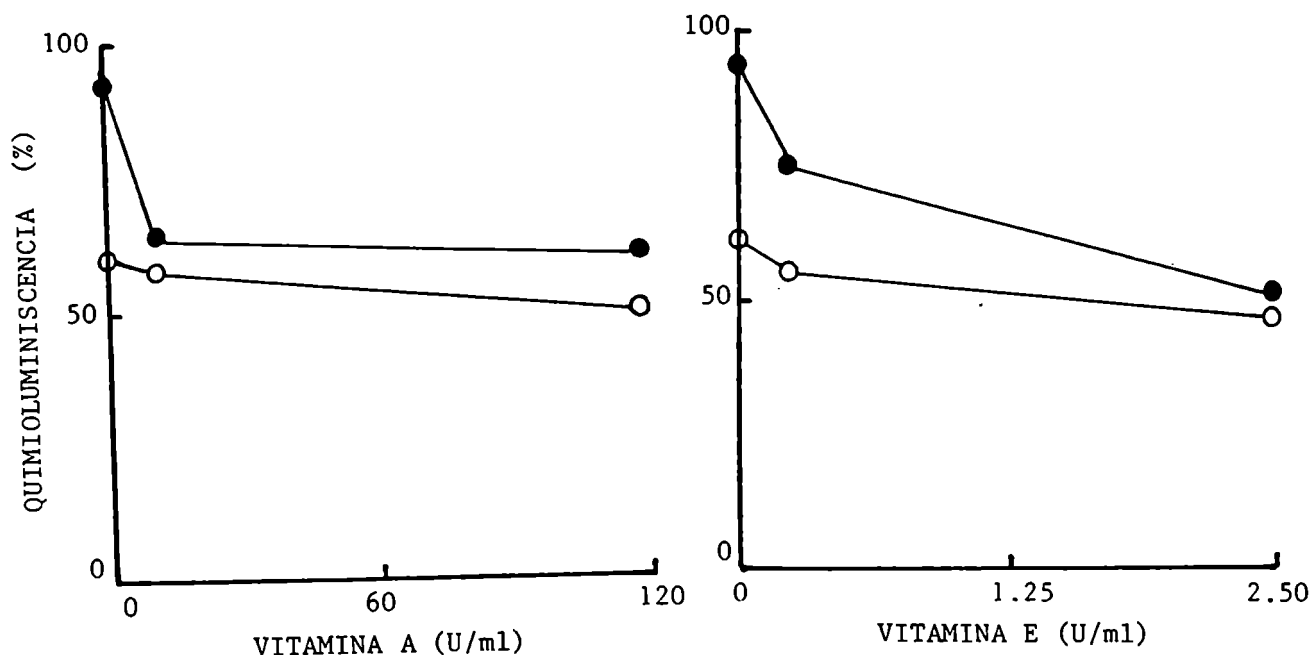


FIGURA 35. Efecto de las vitaminas A y E sobre la quimioluminiscencia iniciada por hidropéroxido de t-butilo, de homogeneizados de hígados de ratas control (o) y de ratas tratadas crónicamente con etanol (●).

#### 5.1.5. Producción microsomal de anión superóxido.

En la figura 36 se observa un trazado de las medidas de producción de  $O_2^-$  por la fracción microsomal de hígado de animales tratados con etanol y control de acuerdo con el método explicado en la sección 2.6.1. La adición de NADPH inicia un proceso autocatalítico que es característico de la producción

de  $O_2^-$  por nucleótidos de piridina (Turrens y Boveris, 1980). Para evitar que este proceso autocatalítico altere el resultado de la medida de producción de  $O_2^-$ , se midió la velocidad de formación de adrenocromo, calculando la pendiente tomada en el primer minuto después de la adición de sustrato; este valor no fue significativamente distinto de los valores obtenidos por extrapolación a tiempo cero de los gráficos de formación de adrenocromo en función del tiempo (Turrens y Boveris, 1980).

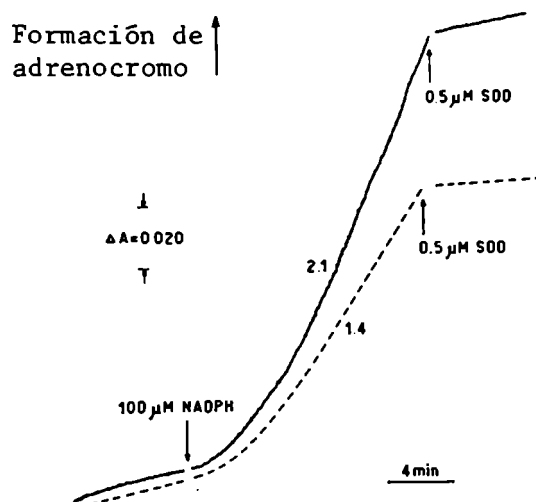


FIGURA 36. Producción de anión superóxido en microsomos de hígado de ratas control (---) y tratadas crónicamente con etanol (—). Los números cerca de los trazados indican la velocidad inicial de producción de anión superóxido en nmoles/min/mg de proteína.

En los microsomos aislados a partir de hígado de ratas tratadas con etanol, se observó un incremento significativo en la velocidad de producción de  $O_2^-$ . El análisis estadístico de



los resultados obtenidos (Tabla 10), muestra que el consumo crónico de etanol produjo un aumento del 45 % de la producción de  $O_2^-$ .

TABLA 10. PRODUCCION MICROSOMAL DE ANION SUPEROXIDO Y ACTIVIDAD CITOSOLICA Y MITOCONDRIAL DE SUPEROXIDO DISMUTASA EN EL HIGADO DE RATAS CONTROL E INTOXICADAS CRONICAMENTE CON ETANOL.

	Control <sup>a</sup>	Tratadas con etanol <sup>a</sup>
Superóxido dismutasa citosólica		
U/mg de proteína	9.4 ± 0.9	9.3 ± 1.0
U/g de hígado	368 ± 32	395 ± 53
Superóxido dismutasa mitocondrial		
U/mg de proteína	0.94 ± 0.16	1.02 ± 0.20
U/g de hígado	29.7 ± 0.6	32.2 ± 2.4
Producción microsomal de $O_2^-$		
nmol/min/mg de proteína	1.54 ± 0.14	2.23 ± 0.14 <sup>b</sup>
nmol/min/g de hígado	32.3 ± 4.0	59.8 ± 9.2 <sup>b</sup>

a: n = 10

b: p < 0.01

Si se considera que hubo una hiperplasia del retículo endoplásmico con un incremento del contenido proteico de un 28 %, se puede estimar, asumiendo saturación de sustrato, que la velocidad fisiológica de producción de  $O_2^-$ , por las membranas del retículo endoplásmico, estaba aumentada en un 86 % después

del tratamiento crónico con etanol.

#### 5.1.6. Actividad de superóxido dismutasa.

Luego de las medidas de quimioluminiscencia de hígado, y de producción de  $O_2^-$ , se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa. En idénticas condiciones experimentales, se había informado que las actividades de la catalasa (Koch y col., 1977) y de la glutatión peroxidasa (Koch y col., 1980) no se modificaban.

La actividad de la enzima se midió de acuerdo con el método explicado en la sección 2.5.1., y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10. Como puede observarse la actividad de la superóxido dismutasa no se modificó por el tratamiento con etanol.

#### 5.2. Alcoholismo agudo.

El segundo modelo de intoxicación con etanol fue el agudo, en el cual, la posible existencia de lipoperoxidación en el hígado de ratas, producida por administración aguda de etanol, se evaluó por estudios in vitro e in vivo.

##### 5.2.1. Quimioluminiscencia espontánea de hígado medida in situ.

Los valores de emisión de hígado obtenidos por medidas in situ, mostraron que las ratas intoxicadas presentaban una emisión 60 % mas alta que las ratas control (Figura 37). Este aumento de quimioluminiscencia se registró en 2 distintas cepas

de ratas (Tabla 11) y se mantuvo constante a lo largo del tiempo de medida.

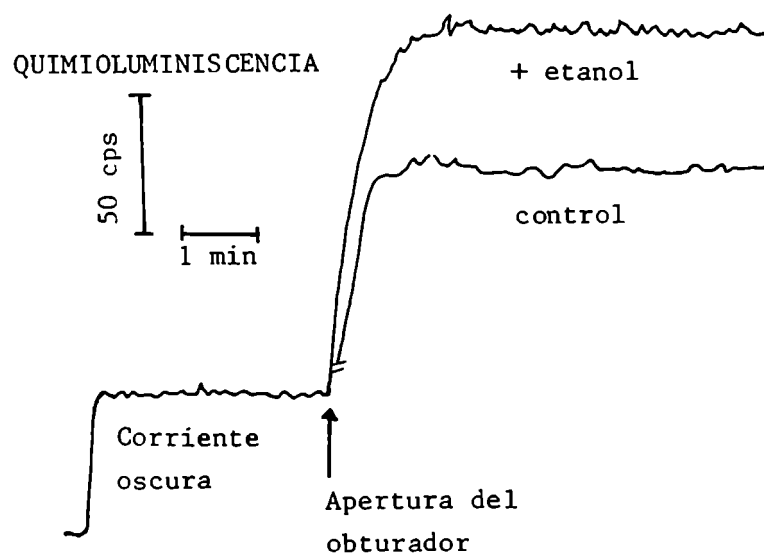


FIGURA 37. Quimioluminiscencia espontánea de hígado de ratas control y de ratas intoxicadas agudamente con etanol.

### 5.2.2. Formación de malondialdehído.

La producción de malondialdehído en los tejidos aerobios es directamente proporcional a la peroxidación de lípidos. Para su medida se procedió de acuerdo con lo explicado en la sección 2.6.3. Los resultados obtenidos mostraron que la formación de

malondialdehído se incrementó en un 48 % en las ratas intoxicadas con etanol (Tabla 11).

TABLA 11. EFECTO DE LA INTOXICACION AGUDA CON ETANOL SOBRE LA QUIMIOLUMINISCENCIA Y LA FORMACION DE MALONDIALDEHIDO Y DIENOS CONJUGADOS EN HIGADO DE RATAS.

Cepa	Ensayo de lipoperoxidación	Control	Tratado con etanol	p
Long Evans	Quimioluminiscencia (cps / cm <sup>2</sup> )	26 ± 1 (8)	40 ± 2 (8)	<0.001
Wistar	Quimioluminiscencia (cps / cm <sup>2</sup> )	24 ± 1 (8)	39 ± 4 (8)	<0.001
	Malondialdehído* (nmol/ mg proteína)	91 ± 5 (6)	135 ± 10 (6)	<0.005
	Dienos conjugados* (nmol hidroperóxido/ mg proteína)	119 ± 11 (6)	196 ± 8 (6)	<0.001

Los números entre paréntesis indican número de animales. (\*) Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Luis A. Videla, División Ciencias Médicas Occidente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

### 5.2.3. Formación de dienos conjugados.

Se midió espectrofotométricamente la formación de dienos conjugados como índice de peroxidación de lípidos (sección 2.6.4). Los resultados obtenidos son presentados en la tabla 11 y muestran que la producción de dienos conjugados en

homogeneizados de hígados de ratas intoxicadas agudamente con etanol, estaba aumentada en un 65 %.

## 6. DEFICIENCIAS EN VITAMINA E Y SELENIO

## 6. Deficiencias en vitamina E y selenio.

En 1957 se descubrió que la deficiencia en selenio era causa de necrosis hepática en ratas (Schwarz y Foltz, 1957) y de la diastesis exudativa en pollos (Patterson y col., 1957). Ambos síntomas son también característicos de la deficiencia en vitamina E. Es por ese motivo que el estudio de estas deficiencias, se encara en forma paralela.

### 6.1. Efecto de las dietas sobre el crecimiento.

La velocidad de crecimiento de las ratas control y de las alimentadas con las distintas dietas no se modificó significativamente a lo largo del tratamiento (Tabla 12).

TABLA 12. CRECIMIENTO DE LAS RATAS MANTENIDAS CON DIETAS DEFICIENTES EN VITAMINA E Y SELENIO Y CONTROLES.

	Incremento del peso corporal ( g / día)
Dieta básica (16)	1.23 $\pm$ 0.10
+ vitamina E + selenio (16)	1.33 $\pm$ 0.08
+ vitamina E (6)	1.29 $\pm$ 0.11
+ selenio (9)	1.28 $\pm$ 0.08

Los números entre paréntesis indican número de animales experimentales.

Tampoco se observaron diferencias significativas en el peso de los hígados de las ratas mantenidas con las distintas dietas (Tabla 13).

TABLA 13. PESO DEL HIGADO DE RATAS TRATADAS CON DIETAS DEFICIENTES EN VITAMINA E Y SELENIO

Tratamiento	Peso del hígado (g)
Dieta básica (16)	3.0 ± 0.2
+ vitamina E + selenio (16)	3.5 ± 0.2
+ vitamina E (6)	3.2 ± 0.3
+ selenio (9)	3.5 ± 0.3

El peso de los hígados corresponde al alcanzado a los 18-20 días de tratamiento. Los números entre paréntesis indican número de animales.

#### 6.2. Sobrevida y necrosis.

La figura 38 muestra la curva de sobrevida de las ratas mantenidas con la dieta deficiente en vitamina E y selenio. La aparición de necrosis en el hígado de estos animales precedió en no más de 24 horas a la muerte del animal.

Las ratas mantenidas con las dietas deficientes en vitamina E o en selenio, no desarrollaron necrosis hepática a lo largo del tratamiento.



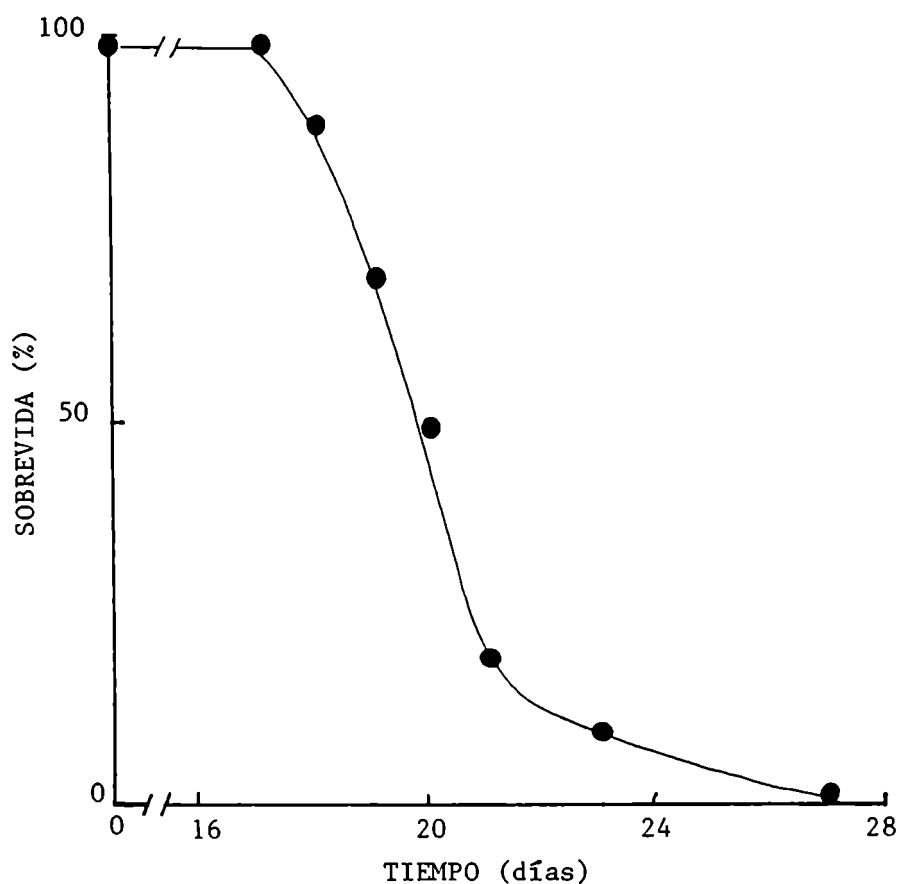


FIGURA 38. Curva de sobrevivencia de ratas deficientes en vitamina E y selenio. En la abcisa se indica el tiempo de duración del tratamiento.

#### 6.2.1. Actividad de las enzimas marcadoras de lesión hepática.

Las enzimas láctico deshidrogenasa, glutámico-oxalácetico transaminasa y glutámico-piruvato transaminasa, son liberadas en sangre cuando se produce la destrucción de los hepatocitos, por lo tanto su presencia en el plasma revela la existencia de necrosis hepática.

Los niveles de estas enzimas en sangre, no se modificaron a lo largo de los días de tratamiento. En cambio, cuando se desarrollaba necrosis, los niveles de las enzimas se incrementaban significativamente.

### 6.3. Quimioluminiscencia espontánea de hígado.

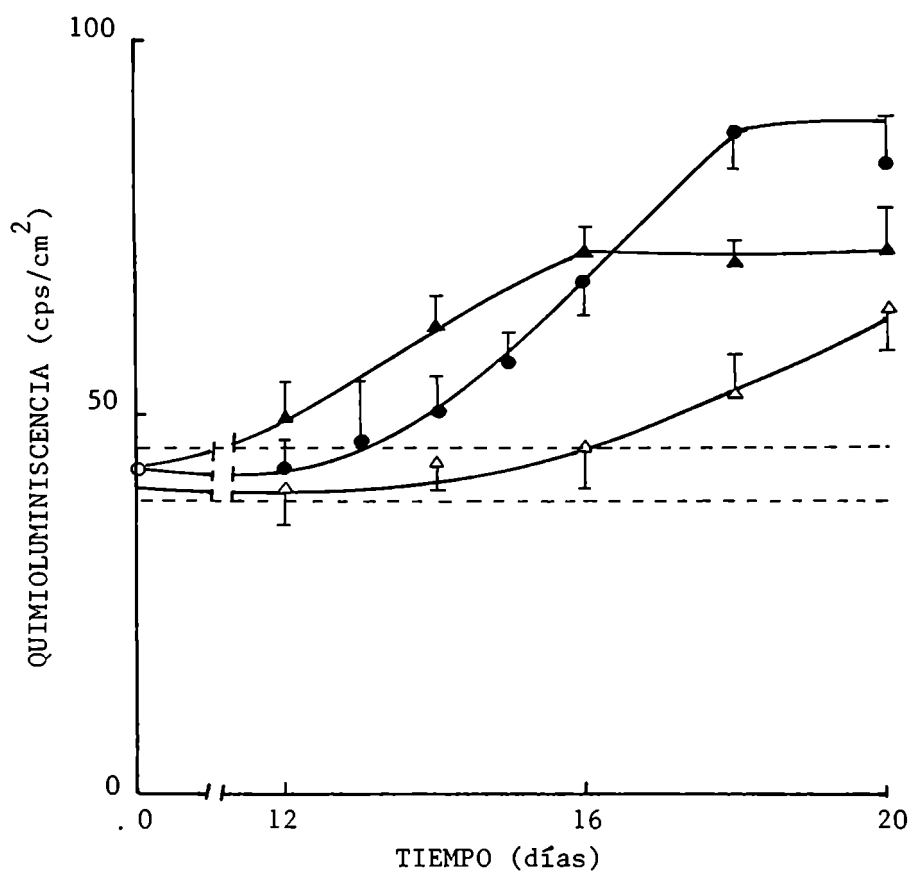


FIGURA 39. Quimioluminiscencia espontánea de hígado de ratas control (o), y ratas mantenidas con dietas deficientes en vitamina E y selenio (●), en vitamina E (△) y en selenio (▲). Las líneas punteadas representan los límites superior e inferior del E. S. M del valor de emisión de las ratas control. En las abcisas se indica la duración del tratamiento.

Los hígados de las ratas control (alimentadas con la dieta suplementada con vitamina E y selenio), mostraron una emisión espontánea de  $43 \pm 3$  cps/cm<sup>2</sup>, que no se modificó significativamente a lo largo de los días de tratamiento (Figura 39).

Los hígados de las ratas alimentadas con dieta deficiente en vitamina E y selenio mostraron aumentos de la emisión a partir del día 12 de tratamiento; este aumento fue del 50 % sobre los valores control al cabo de 15 días y del 100 % en el día 18 (Figura 39). Las ratas alimentadas con la dieta deficiente en vitamina E, no modificaron su emisión hasta el día 16, alcanzando el día 18 un 23 % de aumento. Finalmente, los animales alimentados con la dieta deficiente en selenio, mostraron incrementos en la emisión a partir del día 12, y al cabo de 18 días mostraron un aumento de quimioluminiscencia del 64 % sobre los valores obtenidos en los animales control (Figura 39).

La figura 40 muestra que aumentos de la emisión espontánea de hígado, preceden la aparición de la necrosis en ratas deficientes en vitamina E y selenio.

#### 6.4. Actividad de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

La deficiencia en selenio, produjo una significativa disminución de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa dependiente de ese elemento (Tabla 14). Al cabo de 18 días de

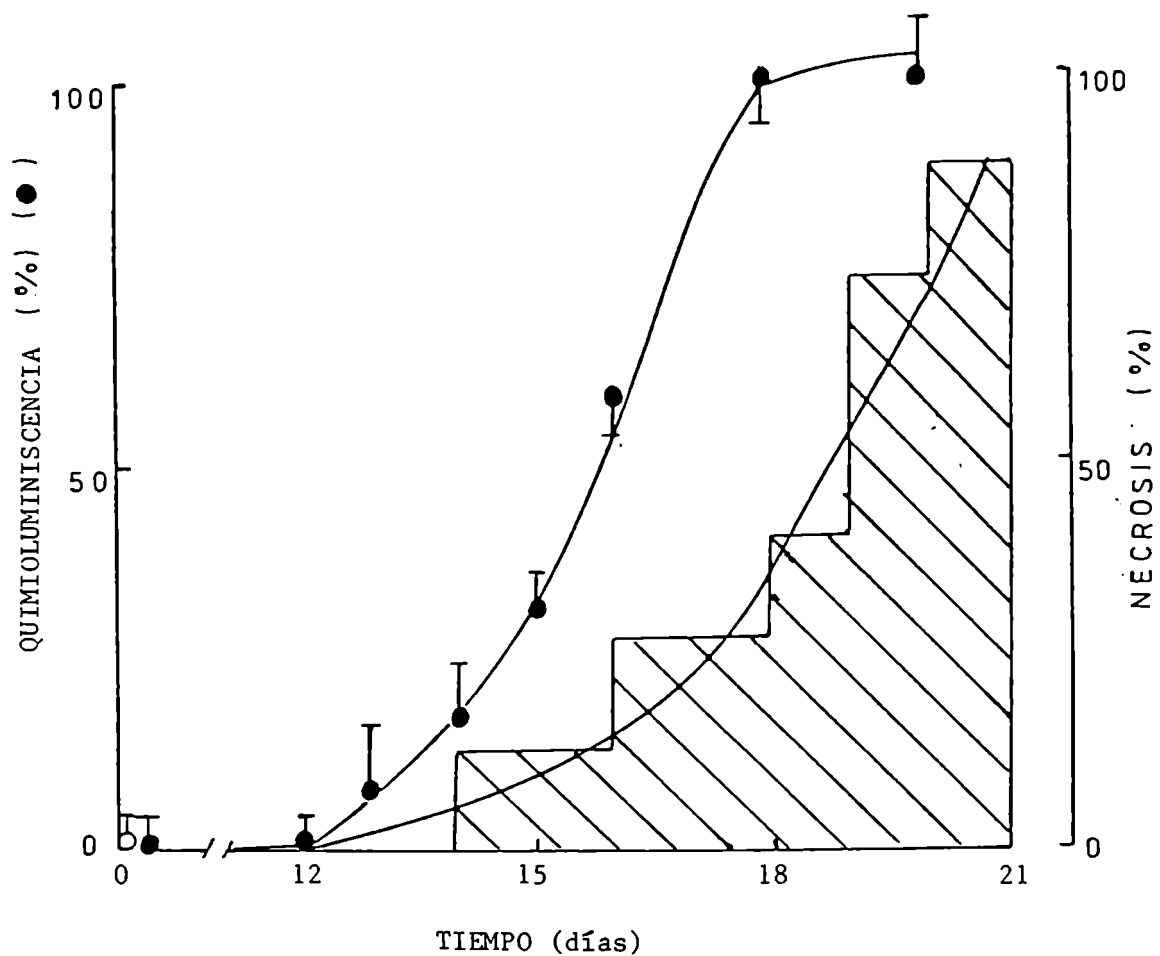


FIGURA 40. Quimioluminiscencia espontánea y necrosis en el hígado de ratas mantenidas con una dieta deficiente en vitamina E y selenio. La quimioluminiscencia se expresa como aumento sobre la emisión de los hígados de las ratas control. El área rayada representa el porcentaje acumulativo de animales con necrosis.

deficiencia, la actividad de esta enzima estaba disminuida a un 20 % de la actividad inicial.

TABLA 14. ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA EN EL HIGADO DE RATAS DEFICIENTES EN VITAMINA E Y SELENIO.

Tratamiento	Glutati3n peroxidasa	
	No dependiente de selenio	Dependiente de selenio
	(U/g de h3gado)	
Control	6.9 ± 1.5	7.6 ± 1.8
Deficiencia en selenio		
d3a 12	6.1 ± 0.9	4.9 ± 0.7
d3a 14	7.3 ± 0.9	3.1 ± 0.3
d3a 16	6.3 ± 0.6	1.7 ± 0.5
d3a 18	7.0 ± 1.4	1.0 ± 0.6
Deficiencia en vitamina E		
d3a 12	7.4 ± 0.5	7.1 ± 0.3
d3a 14	6.5 ± 1.4	7.6 ± 0.4
d3a 16	6.9 ± 0.5	7.2 ± 1.0
d3a 18	7.1 ± 1.0	7.9 ± 1.0

El n3mero de animales experimentales fue 6 en cada d3a para cada tratamiento.

La figura 41 muestra la correlaci3n entre la actividad de la glutati3n peroxidasa y la quimioluminiscencia espont3nea del h3gado.

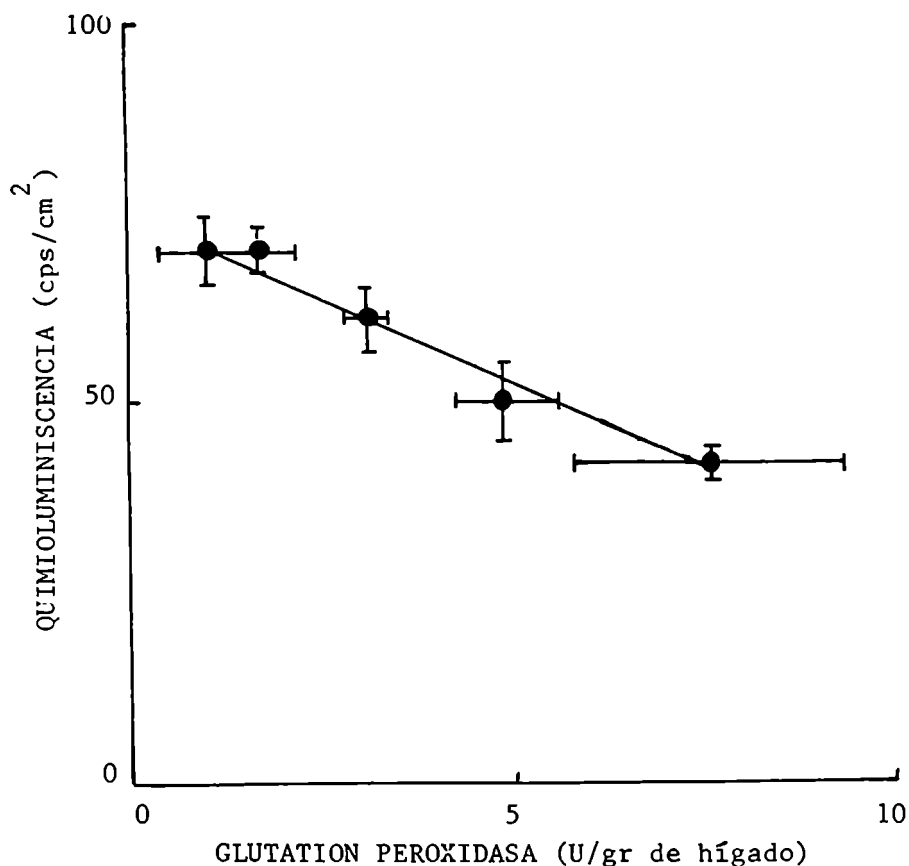


FIGURA 41. Correlación entre el contenido de glutatión peroxidasa y la quimioluminiscencia espontánea de hígado de ratas mantenidas con una dieta deficiente en selenio.

No se observaron modificaciones en las actividades de la superóxido dismutasa ( $900 \pm 35$  U/g de hígado), de la catalasa ( $6.8 \pm 0.1$  moles/g de hígado), ni de la glutatión peroxidasa no dependiente de selenio (Tabla 14). La actividad de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio ( $7.6 \pm 1.8$  U/g de hígado), no se modificó en los animales control a lo largo de los días de tratamiento. Tampoco se observaron variaciones en las actividad de estas enzimas por la aparición de necrosis.

7. EFECTO DE POLIFENOLES SOBRE  
LA QUIMIOLUMINISCENCIA DE HIGADO

## 7. Efecto de polifenoles sobre la quimioluminiscencia del hígado.

### 7.1. Quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado.

La adición de BOOH sobre fracciones subcelulares estimula la emisión de fotones (sección 2.2.2.). Para el estudio *in vitro* del poder antioxidante de polifenoles de origen vegetal (flavonoides y ácidos cafeoilquínicos), se evaluó la capacidad de estas sustancias para inhibir la quimioluminiscencia iniciada por BOOH, en homogeneizados de hígado de ratón.

#### 7.1.1. Solubilización de los polifenoles.

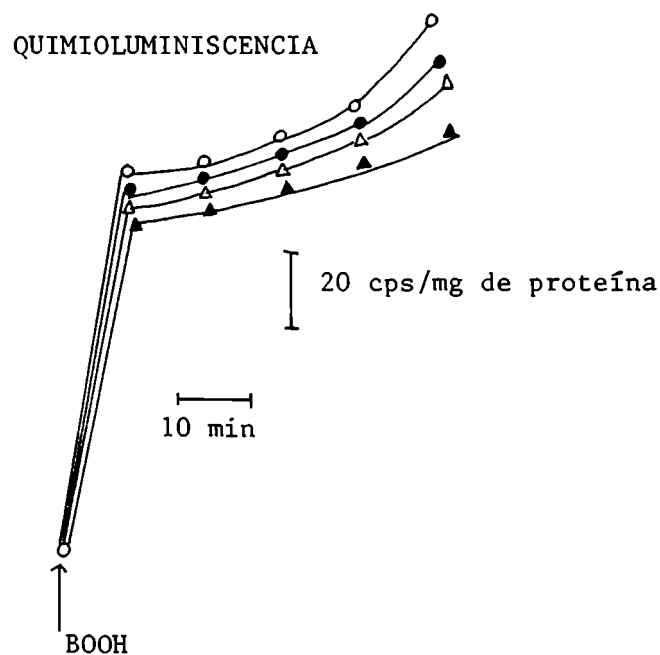


FIGURA 42. Efecto del dimetilsulfóxido sobre la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de ratón, iniciada por BOOH. Control (o), 30 uM (•), 300 uM (Δ) y 1.5 mM (▲).



Los polifenoles ensayados presentan distintas solubilidades en medio acuoso, por lo que fue necesario su dilución previa en soluciones de dimetilsulfóxido (DMSO). Como esta sustancia ejerce efectos tóxicos en el hígado (Rubin, 1975), se estudió su efecto sobre la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de ratón. La máxima concentración de DMSO que se usó al ensayar los polifenoles fue 150  $\mu\text{M}$ , y esta concentración no produjo modificaciones significativas en la quimioluminiscencia medida dentro de la primer hora posterior a la adición de BOOH (Figura 42).

#### 7.1.2. Efecto de los polifenoles sobre la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de ratón.

La adición de polifenoles a los homogeneizados, produjo diferentes efectos sobre la quimioluminiscencia de estas fracciones.

Diferentes concentraciones de (+)-catequina, disminuyeron la emisión de acuerdo con los resultados que se muestran en la figura 43. El mismo esquema experimental se repitió con cada uno de los polifenoles estudiados y a partir de los valores de quimioluminiscencia y concentración de cada polifenol se determinó la dosis que inhibió el 50 % de la emisión iniciada por la adición del BOOH ( $DI_{50}$ ), (Tabla 15). La (+)-catequina fue el polifenol que mostró menor  $DI_{50}$  (3  $\mu\text{M}$ ). El eriodictiol y la miricetina fueron otros polifenoles que presentaron  $DI_{50}$  relativamente bajas (9 y 15  $\mu\text{M}$  respectivamente). Las  $DI_{50}$  de

los otros polifenoles ensayados se muestran en la tabla 15.

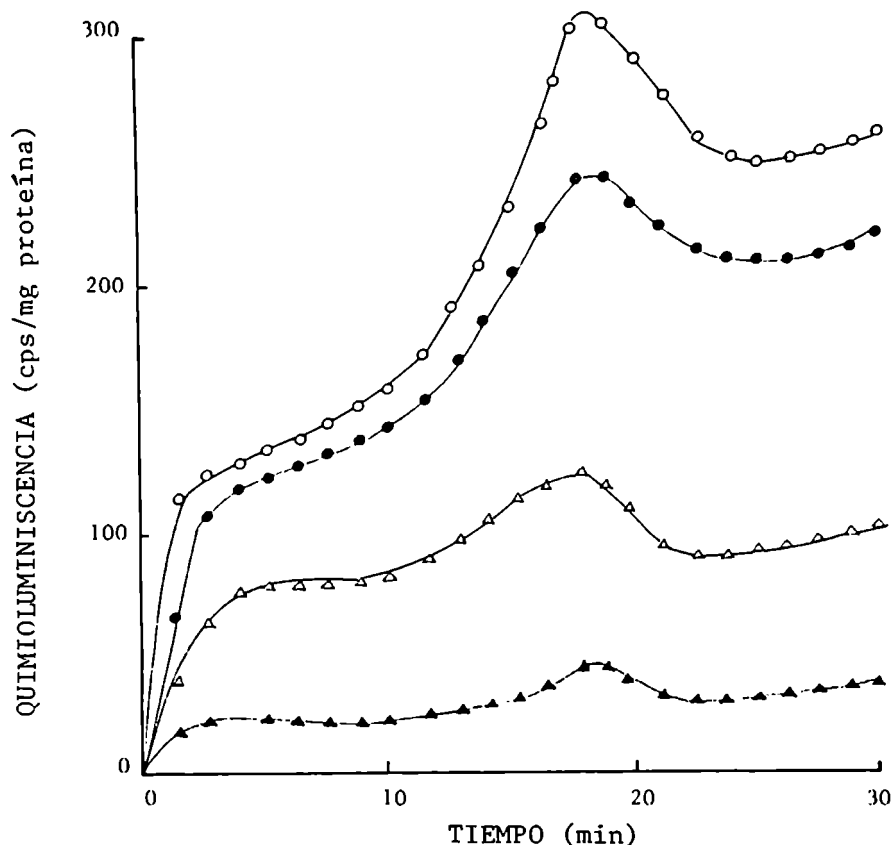


FIGURA 43. Efecto de la (+)-catequina sobre la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de ratón, adicionados con BOOH. (+)-catequina 0 (o), 1  $\mu$ M (●), 5  $\mu$ M (△) y 10  $\mu$ M (▲). Se considera tiempo cero al momento de agregado de BOOH.

## 7.2. Efecto de los polifenoles sobre la quimioluminiscencia de hígado medida in situ.

El efecto de los polifenoles como inhibidores de la quimioluminiscencia de hígado in situ, se estudió en dos situaciones de estrés oxidativo: intoxicación alcohólica aguda en ratas e intoxicación aguda con  $CCl_4$  en ratones.

TABLA 15. INHIBICION POR POLIFENOLES DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA INICIADA POR HIDROPEROXIDO DE t-BUTILO EN HOMOGENEIZADOS DE HIGADO DE RATON.

Polifenol	DI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
(+)-Catequina	3
Eriodictiol	9
Miricetina	15
Chalcona B	15
Acido 3,4-dicafeoilquínico	20
Acido isoclorogénico	30
Acido cafeico	50
5,6,3-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	50
Cinarina	50
Acido clorogénico	150
Apigenina	150
Quercetina	200
Pedalitina	200
Silimarina	200
Quercetina-3-metil éter	200
Flavanona B <sub>1</sub>	500
Canferol 3,7-diramnósido	500
Quercitrina	900
Ombuósido	1.5*
Galangina 3-metil éter	> 10*
Hesperidina	> 10*
Soforicósido	> 10*
Rutina	> 10*
Roifolina	> 10*
Acido quínico	> 10*
Genkwanina	> 10*
Floridzina	> 10*

\* = mM

### 7.2.1. Intoxicación aguda con etanol.

Se estudió el efecto que la administración de (+)-catequina produjo en ratas intoxicadas con etanol, según el esquema experimental explicado en la sección 2.4.3.1. La (+)-catequina se inyectó intraperitonealmente 1 hora antes de la adición de etanol. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16. Se observa que la (+)-catequina (400 mg/100 g de peso), mostró no tener efecto sobre la emisión fisiológica, pero en cambio inhibió totalmente el aumento en la emisión producido por el etanol (69%).

TABLA 16. QUIMIOLUMINISCENCIA DE HIGADO DE RATAS INTOXICADAS AGUDAMENTE CON ETANOL. EFECTO DE LA (+)-CATEQUINA.

Tratamiento	Quimioluminiscencia (cps/cm <sup>2</sup> )	Efecto (%)
Control	24 ± 1 (10)	-
+ (+)-catequina	24 ± 1 (10)	0 <sup>a</sup>
+ etanol	41 ± 2 (10)	+69 <sup>b</sup>
+ (+)-catequina + etanol	21 ± 2 (10)	-13 <sup>a</sup>

Los números entre paréntesis indican número de animales experimentales. En estos experimentos se usaron ratas cepa Wistar.

a = no significativo, referido al grupo control.

b =  $p < 0.001$ , referido al grupo control.

Al comparar las ratas tratadas con etanol y con etanol + catequina se obtuvo una  $p < 0.001$

### 7.2.2. Intoxicación aguda con tetracloruro de carbono.

Los polifenoles a estudiar, fueron administrados a distintos tiempos antes de la inyección del  $\text{CCl}_4$ . Se eligieron polifenoles que mostraron tener distinta actividad en inhibir la quimioluminiscencia *in vitro*, a fin de poder correlacionar los efectos *in vitro* e *in vivo*.

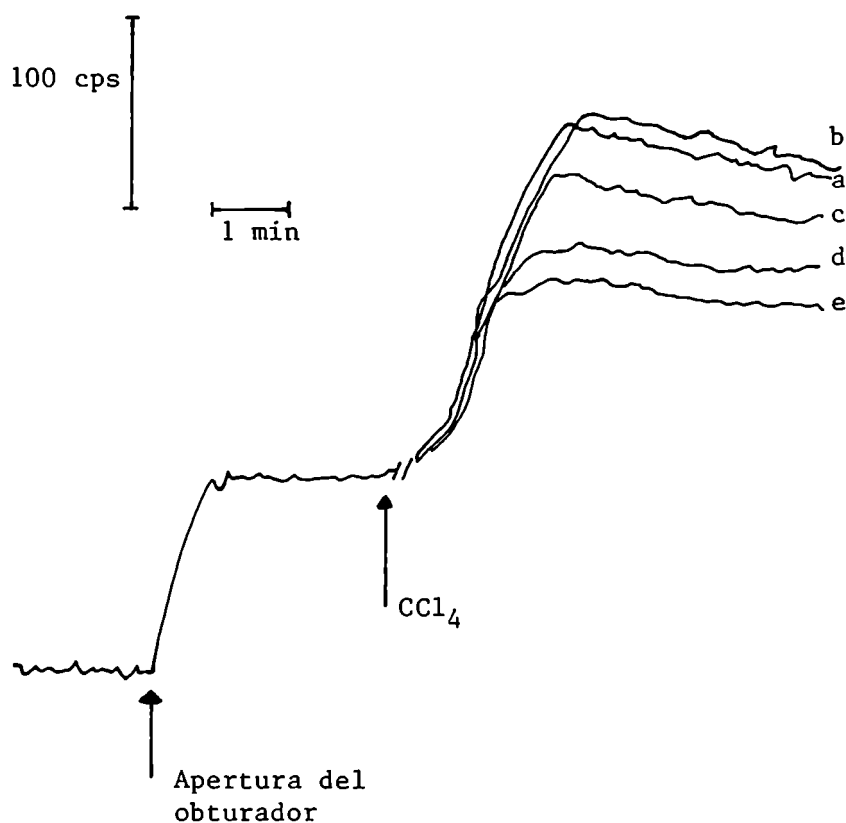


FIGURA 44. Efecto de polifenoles vegetales sobre la quimioluminiscencia estimulada por  $\text{CCl}_4$ , medida en hígado de ratones. Control (a); ácido 3-4-dicafeoilquínico (b); cinarina (c); (+)-catequina (d) y eriodictiol (e). Los polifenoles fueron adicionados en dosis 100 mg/kg de peso, 1 hora antes que el  $\text{CCl}_4$ .

La (+)-catequina administrada en dosis de 10 mg/100 g de peso, 1 hora antes de la inyección de  $\text{CCl}_4$ , inhibió el 31 % de

la emisión producida por esta droga (Figura 44, Tabla 17).

TABLA 17. EFECTO DE POLIFENOLES VEGETALES SOBRE LA QUIMIOLUMINISCENCIA DE HIGADO DE RATON ESTIMULADA POR TETRACLORURO DE CARBONO.

	Quimioluminiscencia		p
	Espontánea (cps/cm <sup>2</sup> )	+ CCl <sub>4</sub>	
Control (20)	95 ± 7	173 ± 12	-
+ Eriodictiol (6)	100 ± 10	107 ± 10	0.001
+ (+)-Catequina (8)	105 ± 5	119 ± 8	0.001
+ Cinarina (6)	95 ± 8	150 ± 10	0.2
+ Acido 3,4-dicafeoilquínico (6)	96 ± 9	177 ± 5	<u>ns</u>

Los números entre paréntesis indican número de animales. Los valores de p calculados para las diferentes drogas son referidos al grupo control. ns es no significativo.

Dosis menores de (+)-catequina (3.5 mg/100 g de peso), mostraron tener efecto prooxidante, mientras que dosis mayores (100 mg/100 g de peso), no presentaron mayor poder antioxidante (Figura 45). Cuando la (+)-catequina fue administrada 2 horas antes que el CCl<sub>4</sub>, se observó un efecto prooxidante de este polifenol (Figura 46).

El eriodictiol en dosis de 10 mg/100 g de peso inhibió el 38 % de la emisión estimulada por CCl<sub>4</sub> (Figura 44, Tabla 17). La administración de cinarina tuvo poco efecto y la de ácido 3,4-dicafeoilquínico, no tuvo efecto sobre la emisión

estimulada por el  $\text{CCl}_4$  (Figura 44, Tabla 17).

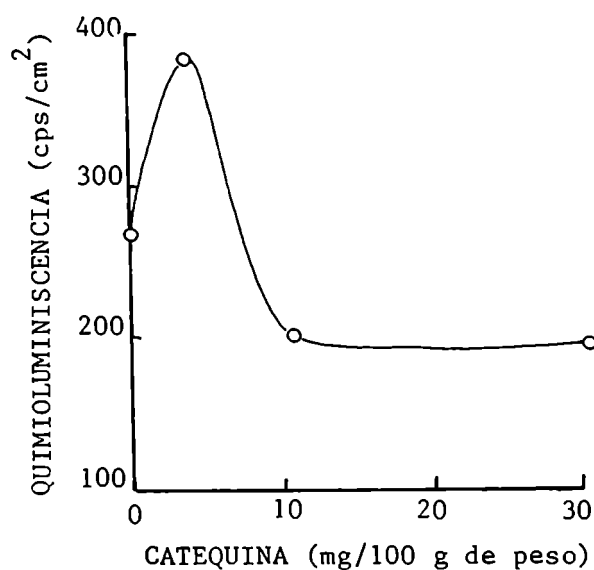


FIGURA 45. Efecto de la (+)-catequina sobre la quimioluminiscencia de hígado de ratón estimulada por  $\text{CCl}_4$ . La (+)-catequina era administrada 1 hora antes que el  $\text{CCl}_4$ .

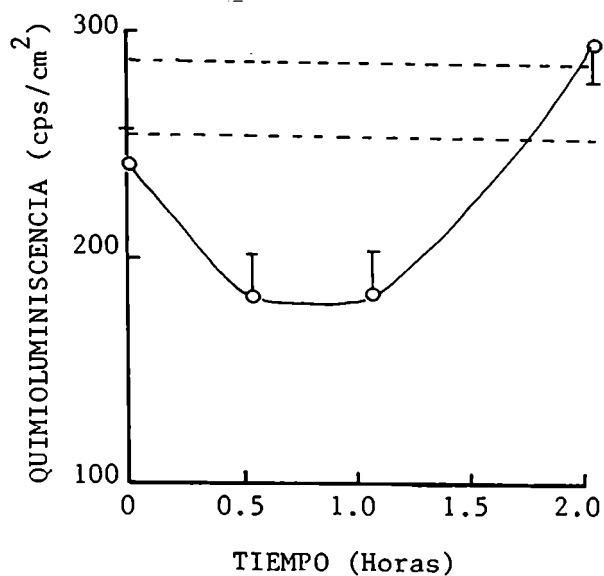


FIGURA 46. Efecto de la (+)-catequina sobre la quimioluminiscencia de hígado de ratón estimulada por  $\text{CCl}_4$ . La (+)-catequina (10 mg/100 g de peso), era administrada a distintos tiempos antes que el  $\text{CCl}_4$ .

## **Discusión**



### 8.1. Radicales libres en sistemas biológicos.

La producción de radicales libres en sistemas biológicos parece derivar principalmente de los productos formados durante la reducción parcial del oxígeno (Chance y col., 1979; Slater, 1984).

Estos radicales, dada su alta reactividad, pueden interaccionar con distintos componentes celulares iniciando reacciones en cadena, cuya iniciación y propagación puede ser causa de modificación o destrucción de estructuras químicas, con la consecuente pérdida de actividad biológica.

La interacción de los radicales libres con el material biológico, depende de la reactividad del radical y del entorno en el cual se encuentra. Así un radical de alta reactividad reacciona indiscriminadamente con cualquier especie presente en su entorno, en cambio un radical menos reactivo, lo hace en forma más específica.

A nivel celular, la producción fisiológica de radicales está controlada por un eficiente sistema de defensa antioxidante. Si la generación de radicales supera las defensas antioxidantes de la célula (enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasas, vitaminas E, C y A, glutatión), se produce una situación de estrés oxidativo que puede llevar a la lesión y muerte de la célula. Algunas de las condiciones que pueden provocar un estrés oxidativo in vivo son: intoxicación con xenobióticos (CCl<sub>4</sub>, etanol) capaces de incrementar la producción de radicales libres; deficiencia en

nutrientes (vitamina E, selenio), donde una disminución de las defensas antioxidantes lleva a un aumento del daño producido por los niveles fisiológicos de radicales libres.

Concretamente, en las situaciones de estrés oxidativo, los procesos que normalmente están ocurriendo a baja velocidad y determinan un daño fisiológico controlado, se incrementan y la integridad biológica se modifica.

Los radicales libres pueden interaccionar, dentro del compartimento celular con distintas moléculas: a) ácidos nucleicos, modificando su estructura química y provocando mutaciones; b) nucleótidos, alterando el estado redox  $\text{NAD(P)}/\text{NAD(P)H}$ ; c) grupos tioles, proteicos y no proteicos, oxidándolos; d) ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (plasmática, mitocondrial, microsomal). Este último proceso, es la peroxidación lipídica, y es uno de los primeros hechos patológicos observables, cuando un organismo es sometido a un estrés oxidativo.

La peroxidación de los lípidos de membrana lleva a la pérdida de la permeabilidad selectiva de la misma, hecho que puede conducir a una lesión celular irreversible (Tappel, 1983; Mead, 1976; Chance y col., 1979; Slater, 1984).

## 8.2. Lipoperoxidación y quimioluminiscencia espontánea de hígado.

Durante el proceso de peroxidación de los lípidos de membrana se forman hidroperóxidos orgánicos y radicales

peroxilo (Chance y col. 1979), cuya interacción puede llevar a la formación de especies excitadas (oxígeno singulete y carbonilos singulete y triplete) (Cadenas y col., 1984; Rivas y col., 1985). Estas especies excitadas pasan a su estado fundamental por diferentes fenómenos físicos, uno de los cuales es la emisión de fotones. La detección de los fotones generados a través de estos procesos constituye el fundamento de la quimioluminiscencia de sistemas biológicos como método de medida de lipoperoxidación en dichos sistemas (Boveris y col., 1980; 1981).

Si bien es posible que haya emisión sin lipoperoxidación en sistemas químicos y libres de células (Cadenas y Sies, 1984) ha sido demostrado que en hepatocitos aislados (Cadenas y col., 1981) y en hígado *in situ* (Videla y col., 1983), un incremento en la velocidad de peroxidación de lípidos produjo un aumento paralelo en la emisión de fotones.

La quimioluminiscencia espontánea de hígado, es una medida de la velocidad de producción de fotones emitidos por la superficie de ese órgano. Esta emisión es proporcional al estado estacionario de radicales peroxilo, el que representa, a concentración de oxígeno constante (reacción 19), una medida de la velocidad de lipoperoxidación.

A pesar de que en los compartimientos celulares, las especies excitadas se formarían con alto rendimiento, la emisión espontánea del hígado (y de otros órganos) es baja, sólo una pequeña porción de los fotones generados por estas

especies es radiado y puede ser detectado. Es probable que la mayoría de las especies excitadas sean desactivadas, en forma inmediata, en los lugares donde son generadas. El H<sub>2</sub>O (Turro, 1978), muchos aminoácidos (presentes en las células en concentraciones del orden de  $10^{-3}$  M), proteínas (Matheson y col., 1975), vitamina C (Chou y Khan, 1983), vitamina E (Grams y Eskins, 1972), vitamina A (Smith, 1983), NADPH y NADH y algunos componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Bodaness, 1982), son desactivadores de oxígeno singlete. Por lo tanto las células poseen una cantidad de sustancias que pueden reaccionar con las especies excitadas desactivándolas, esto hace que la emisión de los sistemas vivos sea del orden de 100 fotones/cm<sup>2</sup>/s (Boveris y col., 1983; 1983a; 1984; Cadenas y col., 1984; Cadenas, 1984).

La medida de la quimioluminiscencia de hígado de rata o ratón, in situ, requiere un contador de fotones adaptado para ese tipo de mediciones (Boveris y col., 1980). La determinación de las condiciones óptimas de funcionamiento del contador de fotones fue el objetivo de la primer parte del trabajo y así se establecieron: a) el voltaje aplicado sobre el fototubo (Figura 18), que fue comparable al usado para otros contadores de fotones empleados para medir quimioluminiscencia de sistemas biológicos (Stauff y Ostrowsky, 1967; Boveris y col., 1980); y b) los umbrales de discriminación del amplificador-discriminador (Figura 19) con los que luego se desarrollaron las medidas in vivo.

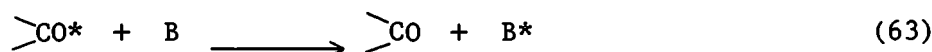
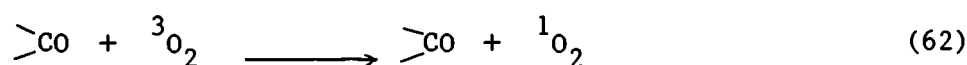
El uso de dos sistemas modelo de emisión conocida permitió constatar una adecuada eficiencia de conteo. El primer modelo fue uno biológico, semillas de soja, secas y humedecidas, (Figura 20), y los valores de emisión obtenidos coincidieron cualitativamente con los informados por Boveris y col., (1983a), utilizando un contador de centelleo. El segundo modelo, químico, fue la reacción entre citocromo c y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 21), y los resultados obtenidos fueron similares a los registrados utilizando un contador de fotones fabricado en la Johnson Research Foundation, Filadelfia, U.S.A. (Cadenas y col., 1980).

### 8.3. Características de la emisión espontánea.

De acuerdo con las reacciones 27 y 28, las principales especies excitadas que serían generadas en sistemas biológicos son <sup>1</sup>O<sub>2</sub> que se desexcita emitiendo la mayor parte de su energía como fotones a 634, 703 y 1268 nm y grupos carbonilos, en sus estados triplete y singulete, con bandas entre 420 y 460 nm. De los espectros obtenidos de la emisión espontánea de hígado de ratón (Figura 24), se observa que la mayor parte de la emisión detectada se debe a la desexcitación del oxígeno singulete (con el fototubo empleado sólo se registran las bandas de 634 y 703 nm), y la producción de fotones a partir de carbonilos excitados (en la zona entre 400 y 500 nm) era baja.

Cadenas y col. (1984) mostraron que en microsomas aislados, la producción de estados excitados, tiene un componente que

corresponde a la desexcitación de carbonilos, que no es emitido. Si se supone que in situ pueden ocurrir procesos similares y que los carbonilos son desexcitados al colisionar con oxígeno triplete (reacción 62) u con otros aceptores (reacción 63), la ausencia de emisión entre 420 y 460 nm no sería una evidencia experimental de la formación preferencial de  $^1\text{O}_2$  in vivo y la relación  $^1\text{O}_2/\text{CO}^*$ , sería menor.



Los aumentos de la emisión de hígado de ratón registrados luego administración de  $\text{CCl}_4$  no mostraban un espectro de emisión modificado con respecto al de la emisión determinada en condiciones fisiológicas (Figura 24), por lo que no se puede hablar de generación de especies diferentes, sino sólo de un aumento en la velocidad de su producción. Similares resultados se observaron cuando se trabajó con ratas (Varsavsky, 1983) y se estudiaron los espectros de la emisión espontánea y estimulada con  $\text{CCl}_4$ .

Cuando se midió la absorbancia del tejido hepático, a las longitudes de onda de la mayor parte de la emisión (600-650 nm) (Figuras 22 y 23), se pudo calcular que la emisión medida provenía de una capa superficial de tres o cuatro células (considerando el diámetro de un hepatocito  $25 \mu\text{m}$ ). Por lo tanto la emisión registrada en las situaciones estudiadas, debemos considerarla, asumiendo que el comportamiento de esta capa

externa de pocas células es representativo de los hechos que están ocurriendo en el resto del órgano.

La determinación de la fracción de O<sub>2</sub> consumido en el proceso de lipoperoxidación que es responsable de la generación de fotones se calculó a partir de la emisión espontánea de hígado de rata, que fue de 25 cps por cm<sup>2</sup> de superficie hepática. Si el espesor activo de emisión es de 90 µm y consideramos el peso específico del hígado como 1 g/cm<sup>3</sup>, se calculó una emisión de  $1.5 \times 10^4$  cps/g de hígado. Por medidas de quimioluminiscencia en diferentes sistemas *in vitro* (Cadenas y col., 1980; Cadenas, 1985), se obtuvo un valor promedio de 500 cuentas/nmol de O<sub>2</sub> consumido en la lipoperoxidación. A partir de estos resultados se obtuvo un valor de consumo de O<sub>2</sub> de 30 nmoles/min/g de hígado. Este valor representa el 1.5 % del consumo de O<sub>2</sub> total medido en hígado perfundido (Videla, 1984).

A fin de obtener una relación entre el O<sub>2</sub> consumido y la emisión de fotones, se calculó la relación entre cuentas y fotones. Para ello se consideró la sensibilidad del fototubo, que a la longitud de onda de la emisión registrada (600-700 nm), estaba entre el 8 y el 12 % (Figura 10) y la geometría del sistema de medición (distancia del hígado al fototubo). Además, solamente se midió la emisión de un lado de las células. Teniendo en cuenta estos factores, se puede considerar una eficiencia del conteo de fotones del 4 %, o sea 1 cuenta = 25 fotones. A partir del valor de 500 cuentas/nmol de oxígeno, se

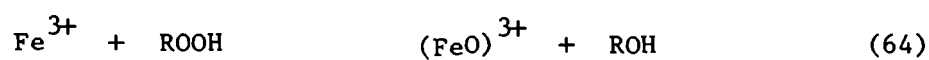
obtuvo un rendimiento de quimioluminiscencia de hígado, medida in situ, de  $1.25 \times 10^{-10}$  fotones/molécula de O<sub>2</sub> consumida en la lipoperoxidación.

#### 8.4. Quimioluminiscencia de fracciones subcelulares.

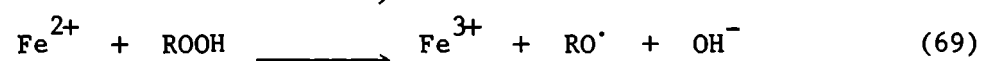
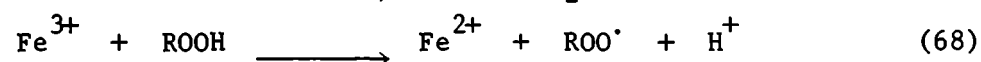
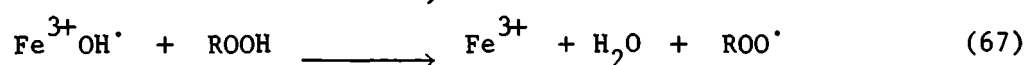
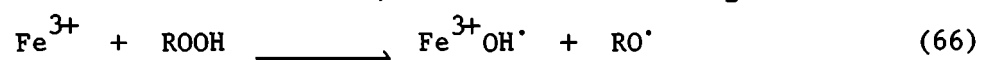
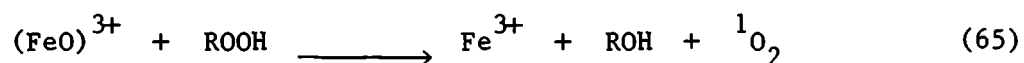
A partir de los valores de quimioluminiscencia de hígado se tuvo una medida indirecta de la velocidad con la que estaba ocurriendo la lipoperoxidación en ese órgano, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés oxidativo. A fin de conocer como este aumento en la velocidad de lipoperoxidación influía sobre el metabolismo celular, fue importante evaluar el contenido de antioxidantes y prooxidantes presentes en las fracciones subcelulares.

Las fracciones subcelulares (homogeneizados, mitocondrias, microsomas), fueron sometidos a un estrés oxidativo provocado por adición de hidroperóxidos orgánicos. La adición de ROOH a las fracciones, produjo significativos aumentos en la emisión, dependientes del contenido de antioxidantes y prooxidantes, por lo que se usó este tipo de ensayos para evaluar el contenido intracelular de pro- y antioxidantes.

Los peróxidos orgánicos inician una serie de reacciones, cuya química se basa en su activación a través de 3 tipos de procesos: ruptura heterolítica (reacciones 64 y 65), ruptura homolítica (reacciones 66 y 67) o activación reductiva (reacciones 68 y 69).







Todas estas reacciones llevan a la producción de especies oxidativas ( ${}^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$ ,  $\text{ROO}^\cdot$ ), capaces de iniciar reacciones en cadena, por ataque sobre los lípidos presentes en el sistema bajo estudio.

La cinética bifásica de la emisión de homogeneizados, mitocondrias y microsomas (Figura 25) puede explicarse considerando una fase inicial donde la emisión se debía a la desexcitación de especies generadas por la ruptura homolítica de los peróxidos, catalizada por citocromos y una segunda fase, desplazada en el tiempo, donde las especies excitadas se formaron a partir de la lipoperoxidación iniciada por los radicales y el  ${}^1\text{O}_2$  generados en la primera fase.

La actividad de los antioxidantes presentes en el medio de reacción, impidió la formación de especies excitadas o desactivó las ya formadas. El resultado final, fue una emisión de fotones inversamente proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes y directamente proporcional a los prooxidantes (Boveris y col., 1983; Cadenas y col., 1984; Fraga y col., 1984; Boveris y col., 1985).

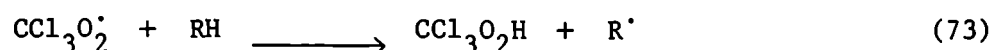
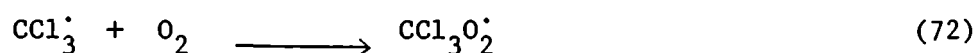
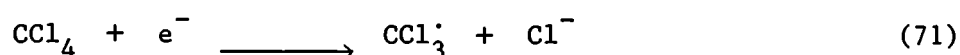
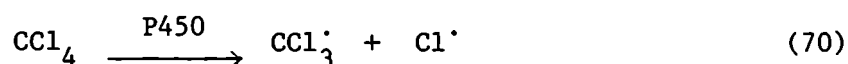
De acuerdo con lo explicado la quimioluminiscencia de fracciones subcelulares (homogeneizados, mitocondrias y

microsomias) iniciada por BODH, constituye un método adecuado para evaluar integrativamente el balance entre pro- y antioxidantes presentes en la fracción bajo estudio.

#### 8.5. Toxicidad del tetracloruro de carbono.

La toxicidad del CCl<sub>4</sub> sobre el hígado ha sido estudiada extensamente (Recknagel, 1967; Slater, 1984). Un importante número de conceptos que tienen aplicación al conocimiento de los mecanismos de producción de lesión celular, surgió a partir de estos estudios.

El mecanismo general de acción del CCl<sub>4</sub> fue propuesto casi simultáneamente por Slater (1966) y por Recknagel (1967) y responde a la siguiente serie de reacciones:



De acuerdo con estas reacciones, la acción tóxica del CCl<sub>4</sub> es posterior a su transformación a una especie más reactiva, la que iniciaría la producción de oxiradicales y la peroxidación de lípidos. La descomposición del CCl<sub>4</sub> para dar el radical triclorometilo puede ocurrir por ruptura homolítica de su molécula catalizada por el citocromo P450 (reacción 70) o por captura electrónica (reacción 71). La producción del radical CCl<sub>3</sub>· ha sido demostrada in vivo por medida del CCl<sub>3</sub>H en tejidos de animales intoxicados con CCl<sub>4</sub> y por medida directa

del radical  $\text{CCl}_3$  por resonancia de spin electrónico (RSE) (Mason, 1982). Packer y col., (1978), demostraron la formación de radical  $\text{CCl}_3\text{O}_2^{\cdot}$  (oxitriclorometilo) por reacción muy rápida de  $\text{CCl}_3^{\cdot}$  y  $\text{O}_2$  (reacción 72). Este radical, de más alta electrofilicidad que el  $\text{CCl}_3^{\cdot}$ , sería el responsable de la iniciación del proceso de lipoperoxidación por acción sobre los ácidos grasos poliinsaturados (reacción 73).

La administración intraperitoneal de  $\text{CCl}_4$  produjo un aumento de la emisión espontánea de fotones en el hígado de ratas (Figura 33) y de ratones (Figura 27). En ratones este aumento es dependiente de la dosis administrada como se muestra en la figura 28. A dosis mayores de 1 ml/100 g de peso, se observó una inhibición de la quimioluminiscencia posiblemente debida a la destrucción de la organización celular necesaria para la producción de especies excitadas. La quimioluminiscencia aumentó en el primer minuto luego de la adición de  $\text{CCl}_4$  (Figura 27), este hecho demuestra la rápida metabolización de la droga y la ventaja de la quimioluminiscencia sobre otros métodos de medida de lipoperoxidación al registrar inmediatamente los aumentos de la generación de especies excitadas. La medida de la liberación de alcanos en el aire expirado, en la intoxicación por  $\text{CCl}_4$  en ratas, recién registró incrementos al cabo de 15 minutos de la administración (Tappel, 1980). Recknagel (1977), midió la peroxidación de lípidos en microsomas, y observó aumentos del 60 % al cabo de 5 minutos; al medir unión del  $\text{CCl}_4$  a lípidos

microsomales obtuvo aumentos del 30 % al minuto y del 100 % a los 5 minutos. La diferencia en los tiempos de aparición de los aumentos en los distintos métodos, puede ser explicada en base a que la quimioluminiscencia y la unión del  $\text{CCl}_4$  son eventos primarios, mientras que la liberación de alcanos y la oxidación de NADPH son consecuencias de un posterior metabolismo de los hidroperóxidos.

Los aumentos de emisión registrados en el hígado de los ratones intoxicados con  $\text{CCl}_4$  fueron significativamente mayores que los aumentos registrados en la zona intestinal de los mismos animales (Tabla 3). Este hecho pone de manifiesto la especificidad del hígado en la biotransformación del  $\text{CCl}_4$ , que había sido postulada por Recknagel (1977).

El tratamiento con barbital incrementó la masa microsomal e indujo la síntesis del citocromo P450 en ratones (Tabla 4). Este aumento no se encontró en la proteína total de homogeneizado (Tabla 4), por lo que el incremento de la masa hepática no se debería a un aumento indiscriminado en la síntesis de proteínas. Como se observa en la figura 31, el aumento de la emisión estimulada por  $\text{CCl}_4$  es lineal con el incremento de la masa microsomal, de donde se infiere la importancia del citocromo P450, en la metabolización del  $\text{CCl}_4$ . Similares resultados se obtuvieron en la intoxicación crónica con etanol, donde se indujo la síntesis del citocromo P450 y aumentó la emisión estimulada por  $\text{CCl}_4$  (Figura 33). El aumento en la cantidad de citocromo llevo a un aumento en la generación

de O<sub>2</sub>- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los que incrementarían la velocidad de lipoperoxidación. A pesar de este aumento del citocromo P450, la emisión espontánea de hígado no se vió modificada (Figura 29, Tabla 5), como fue el caso del alcoholismo crónico en ratas (Figura 33). Este hecho puede ser explicado considerando los aumentos paralelos observados en las actividades de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) y en el contenido celular de GSH (Tabla 6), en la intoxicación con barbital.

La emisión de las fracciones subcelulares, aisladas a partir de hígados de ratones tratados con barbital e iniciada por BOOH, también se encontró aumentada. Este aumento se debería a la mayor cantidad de citocromo P450 presente, que catalizó la ruptura del BOOH (reacciones 64-69). Es interesante observar que el aumento en la emisión de los homogeneizados se mantuvo a lo largo de todo el tiempo de medida (Figura 32), para los diferentes días de tratamiento, mientras que en la fracción microsomal no se observó el mismo comportamiento. En esta fracción se determinó un incremento de la emisión en una primera fase dependiente del contenido de citocromos, pero en la segunda fase no se observaron diferencias en la emisión para los diferentes tiempos de tratamiento (Figura 32). Este hecho pudo deberse a la pérdida de las enzimas antioxidantes solubles, del glutatión reducido y del sistema de regeneración de glutatión, durante el proceso de aislamiento de los microsomas. El retraso observado en la aparición del primer

pico de emisión en los homogeneizados de los hígados de los ratones control respecto a los tratados (Figura 32), puede atribuirse a una mayor cantidad de glutatión reducido presente en el medio (Tabla 6), capaz de desactivar especies excitadas (Cadenas, 1985).

Diversas teorías trataron de explicar las bases moleculares de la toxicidad del  $\text{CCl}_4$  (Recknagel, 1967). Las más importantes a considerar son la lipoperoxidación (Slater, 1984; Fraga y col., 1984) y la unión covalente de los radicales formados (triclorometilo, oxitriclorometilo, etc.), a distintas macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, ácidos grasos), modificando su actividad biológica (Castro y col., 1974; Toranzo y col., 1974; Castro, 1984).

La quimioluminiscencia espontánea, la quimioluminiscencia de homogeneizados y microsomas iniciada por  $\text{BOOH}$  y la actividad de las enzimas antioxidantes, medidas en el hígado de ratones tratados con barbital, puntualizan la participación de radicales del  $\text{O}_2$ , producidos a partir de la metabolización microsomal del  $\text{CCl}_4$  y una activa intervención del citocromo P450. Así, en un medio como el intracelular, con abundante cantidad de membranas, el proceso de lipoperoxidación puede iniciarse y propagarse con relativa facilidad; el aumento de quimioluminiscencia, casi instantáneo, producido por el  $\text{CCl}_4$ , indica la participación de especies excitadas de muy corta vida media, y apoya un proceso que involucre reacciones en cadena más que formación de uniones covalentes.

#### 8.6. Intoxicación crónica con etanol.

La intoxicación crónica con etanol constituye otro hecho de interés en cuanto al estudio de los mecanismos moleculares responsables del daño producido en los hepatocitos por esta droga que puede llevar a la pérdida de su función biológica.

El primer informe sobre aumentos en la lipoperoxidación en el hígado de animales tratados crónicamente con etanol, fue el de Di Luzio (1973). Investigaciones más recientes, indicaron que la peroxidación de lípidos sería responsable de la posterior lesión y muerte celular que ocurre en el alcoholismo crónico (Sies y col., 1979).

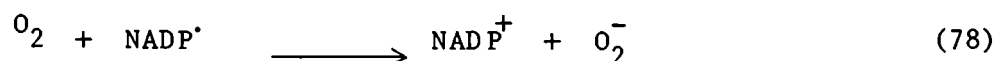
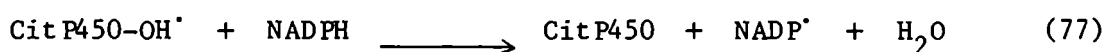
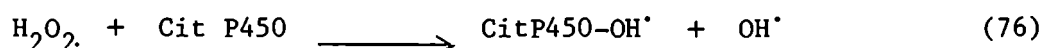
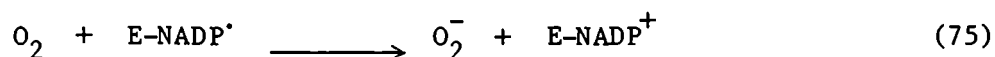
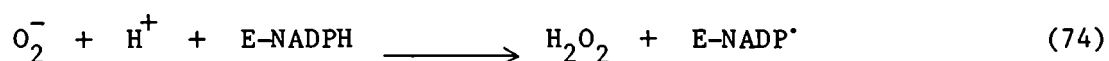
El tratamiento crónico con etanol produjo un aumento de la quimioluminiscencia espontánea en el hígado de ratas (Tabla 8, Figura 33). Este estrés oxidativo, pudo ser producido por un aumento en la generación de radicales libres oxidativos, ya sea por un aumento de los prooxidantes presentes en el hígado o por una disminución de las defensas antioxidantes.

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la velocidad de producción microsomal de  $O_2^-$  (Tabla 10, Figura 36). Este aumento es coincidente con los valores informados por Thurman (1973), para la producción microsomal de  $H_2O_2$  (aumento del 46 %). Es interesante observar que la producción mitocondrial de  $H_2O_2$  no se modificaba con el tratamiento empleado (Koch y col., 1977).

En el hígado de las ratas control la velocidad de producción microsomal de  $O_2^-$  fue de 1.5 nmol/min/mg de proteína

(Figura 36). Este valor es mucho más bajo que otros informados: 15 nmol/min/mg de proteína (Mishin y col., 1976) y 25 nmol/min/mg de proteína (Bartoli y col., 1977). También se había informado una velocidad de producción microsomal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1.7 nmol/min/mg de proteína a 23°C (Boveris y col., 1972; Thurman y col., 1972) y 6 nmol/min/mg proteína a 30°C (Hildebrandt y Roots, 1975); estas velocidades llevan a estimar que la velocidad máxima de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> no puede superar los 12 nmoles/min/mg de proteína.

Ante este hecho se plantea la posibilidad de que ocurra en los microsomas, una reacción similar a la planteada para NADH y partículas submitocondriales (Turrens y Boveris, 1980). El NADPH unido a la NADPH-citocromo c reductasa (E) puede ser oxidado por O<sub>2</sub><sup>-</sup> (reacción 74) e iniciar un proceso autocatalítico que rinde 2 O<sub>2</sub><sup>-</sup> y un OH<sup>•</sup> por cada O<sub>2</sub><sup>-</sup> inicial (reacciones 74-78).



Por lo tanto la velocidad de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> debe ser estimada inmediatamente después de la adición del NADPH, cuando las reacciones autocatalíticas aún no son importantes. Este error ha llevado a muchos autores a sobreestimar la velocidad



de producción de  $O_2^-$ .

Estas reacciones autocatalíticas del  $O_2^-$ , pueden adquirir especial importancia en el hígado, en la intoxicación crónica con etanol, donde están aumentados: la velocidad de producción de  $O_2^-$ , y los contenidos de NADH (puede reaccionar como sustrato de la reacción 77) y de citocromo P450 (Boveris y col., 1983).

El aumento observado en la producción microsomal de  $O_2^-$  luego del tratamiento crónico con etanol, no fue balanceado por un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa citosólica (Tabla 10), catalasa (Koch y col., 1977a) y glutatión peroxidasa (Sies y col., 1979), lo que condujo a una situación de estrés oxidativo, donde los aumentos en los estados estacionarios de  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$ , llevarían a un aumento en la velocidad de producción de  $OH^\cdot$  (reacción 13), capaz de iniciar la lipoperoxidación.

El aumento en la producción de especies oxidantes llevó a un aumento en el consumo de los antioxidantes fisiológicos (glutatión, vitamina E, vitamina A, etc.), produciendo una deficiencia de estas sustancias. Esta deficiencia de antioxidantes endógenos explicaría los aumentos en la quimioluminiscencia de hígado estimulada por  $CCl_4$  (Tabla 8, Figura 33) y en la emisión de fracciones subcelulares provenientes de hígados de animales tratados (Tabla 9, Figura 34), como así también los aumentos observados en la producción de malondialdehído en homogeneizados y mitocondrias (Di Luzio,

1973; Stege y col., 1977).

El aumento en la quimioluminiscencia de hígado estimulada por la administración de CCl<sub>4</sub>, puede también ser explicado por el mayor contenido de citocromo P450 en el hígado de los animales tratados con etanol.

La adición de vitaminas A y E, a los homogeneizados de hígado de ratas alcoholizadas, produjo una disminución de la emisión iniciada por BOOH (Tabla 9, Figura 35) lo que confirmó los bajos niveles de antioxidantes endógenos en el hígado de estas ratas.

Los resultados presentados aquí, parecen ser conclusivos en indicar la existencia de un aumento en la velocidad de lipoperoxidación en el hígado de ratas intoxicadas crónicamente con etanol.

### 8.7. Intoxicación aguda con etanol.

La existencia de lipoperoxidación en hígado producida por la administración aguda de etanol, ha sido demostrada en diferentes ensayos in vitro. Aumentos en la producción de malondialdehído (Stege y col., 1977; Videla y col., 1980), en la formación de dienos conjugados (Di Luzio, 1968; Valenzuela y col., 1980), en la quimioluminiscencia (Di Luzio y Stege, 1977) mostraron que la velocidad de peroxidación lipídica estaba aumentada en homogeneizados, mitocondrias y microsomas de hígado de rata. También se midieron aumentos en la lipoperoxidación in vivo por la exhalación de alcanos (Litov y col., 1978; Frank y col., 1980). El efecto agudo del etanol también se midió por la liberación de alcanos de hígado perfundido, donde la adición de etanol 44 mM incrementaba marcadamente la producción de estos hidrocarburos (Muller y Sies, 1982). Keller (1971) informó que la adición de etanol no incrementaba la producción de radicales libres, medidos por resonancia de spin electrónico.

En vista de estos resultados y del posible papel que podría tener la lipoperoxidación en el daño hepático producido por el etanol en el hombre (Matsumura y col., 1980), se estudió la quimioluminiscencia del hígado de ratas intoxicadas en forma aguda con etanol paralelamente con otros métodos invasivos, a fin de establecer conclusiones acerca de los posibles mecanismos bioquímicos del daño producido por el etanol.

Los resultados obtenidos por la medida de

quimioluminiscencia de hígado *in situ* muestran un incremento en la velocidad de producción de especies excitadas (Tabla 11, Figura 37). Aumentos paralelos se obtuvieron al evaluar la producción de malondialdehido y para la formación de dienos conjugados, en homogeneizados de hígado (Tabla 11). La integración de estos resultados muestra evidentes incrementos en la lipoperoxidación del hígado de ratas intoxicadas en forma aguda con etanol.

Las discrepancias en cuanto a la producción de lipoperoxidación en la intoxicación aguda con etanol, pueden deberse a los diferentes diseños experimentales y a la adecuabilidad de los métodos empleados. En las medidas de formación de malondialdehido y de producción de radicales por resonancia de spin electrónico hechas por Keller y col. (1971), se usaron altas dosis de etanol (6-7.5 g/kg de peso), donde la capacidad del alcohol de atrapar radicales libres (Cohen, 1977) adquiere importancia. Además el método de resonancia de spin electrónico, cuyo límite de detección es de  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  M (Keller y col., 1971) no tiene suficiente sensibilidad para detectar cambios en las concentraciones de radicales libres en sistemas biológicos, cuyo estado estacionario es siempre menor que  $10^{-8}$  M (Pryor, 1976).

La administración aguda de etanol produce la pérdida de la regulación térmica de los animales, con la consecuente disminución del metabolismo basal, incluida la peroxidación de los lípidos. Este hecho fue prevenido en nuestros experimentos

conservando el animal en condiciones térmicas adecuadas.

Otro punto, y quizás el más importante, es que la velocidad de lipoperoxidación está directamente relacionada con el contenido de antioxidantes en el órgano bajo estudio. Los niveles de glutatión varían con el tiempo luego de la administración del etanol (Videla y col., 1980), por lo tanto si los experimentos se llevaban a cabo cuando los niveles de glutatión no estuviesen disminuidos o cuando estos niveles habían sido parcialmente recuperados, la velocidad de lipoperoxidación pudo no modificarse significativamente. Por este motivo nuestros estudios se hicieron 6 horas después de la administración del etanol, cuando el contenido de GSH alcanzaba un mínimo (Videla y col., 1980).

Keller y col. (1971), no observaron modificaciones en la formación de malondialdehído en mitocondrias y microsomas de ratas intoxicadas con etanol, probablemente debido a la pérdida de GSH durante el proceso de aislamiento, lo que condujo a una extensiva lipoperoxidación.

La (+)-catequina ((+)-cyanidanol-3), es un poderoso antioxidante in vitro (Bertelli, 1975; Slater y Scott, 1981; Kappus, 1981). En experimentos in vivo, demostró una excelente capacidad antioxidante (Tabla 16), al prevenir completamente el aumento en la quimioluminiscencia del hígado, que produjo la intoxicación aguda con etanol. Dada la capacidad de la (+)-catequina de atrapar radicales libres, se pone de manifiesto la participación de estas especies en el proceso de

lipoperoxidación, durante la intoxicación aguda con etanol.

#### 8.8. Deficiencias en vitamina E y selenio.

Las deficiencias en vitamina E y Se, son causa de diversas patologías en numerosas especies animales, todas ellas de carácter degenerativo (Evans, 1962). En ratas la deficiencia en ambos nutrientes lleva a la necrosis hepática (Porta y col., 1968). Siguiendo el mismo esquema experimental que Porta y col., 1968, se observó que las ratas, mantenidas con la dieta deficiente en vitamina E y Se, desarrollaron necrosis al cabo de 20 días de tratamiento (Figura 38). En cambio las ratas mantenidas con la misma dieta adicionada ya sea con vitamina E o con Se no desarrollaron necrosis.

El aumento observado en la quimioluminiscencia espontánea, al cabo de 16 días, en las ratas deficientes en Se y en vitamina E y Se, no se correlacionó con la producción de lesiones celulares irreversibles en las ratas alimentadas con la dieta deficiente en vitamina E y Se (Figuras 39 y 40). Las ratas alimentadas con la dieta deficiente en vitamina E, mostraron aumentos en la quimioluminiscencia de hígado recién en el día 18 probablemente debido a un tiempo necesario hasta el agotamiento de la vitamina endógena por la generación fisiológica de radicales. En ese mismo día las ratas alimentadas con la dieta deficiente en vitamina E y Se, mostraron un máximo aumento en la emisión de sus hígados, que fue mayor al registrado en las ratas deficientes sólo en

vitamina E. Este aumento puede explicarse a una mayor velocidad de generación de especies oxidativas, ya que en ese momento la actividad de la glutatión peroxidasa estaba disminuida (Tabla 14), lo que incrementaba el estado estacionario de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el citosol.

De acuerdo con estos resultados, la alta velocidad de lipoperoxidación podría ser la causa del desarrollo de una posterior necrosis hepática, por lo que se podría hablar de un estado preneocrótico con niveles modificados de Se-glutatión peroxidasa y vitamina E y no modificados de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa no dependiente de Se. En este estado preneocrótico se hacen evidentes anomalías morfológicas en los hepatocitos (vacuolización, inflamación, etc.), (Porta y col., 1980).

Al cabo de 20 días de tratamiento el 90 % de las ratas mantenidas con la dieta deficiente en vitamina E y Se, desarrollaron necrosis, pero no se produjeron incrementos en la quimioluminiscencia de los hígados de las ratas deficientes en Se y en vitamina E y Se respecto al día 18.

El sinergismo de la acción de la vitamina E y del Se, protegiendo el hígado de la producción de lesiones celulares irreversibles, podría ser explicado en base a la localización celular de la enzima glutatión peroxidasa y de la vitamina E. Esta última, dado su carácter liposoluble, se acumula en las zonas hidrofóbicas de las membranas celulares, protegiéndolas de la acción de los radicales allí formados. La glutatión

peroxidasa dependiente de selenio, se localiza en el citosol y reacciona con peróxidos orgánicos y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con este último lo hace con una constante de reacción de  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Chance y col., 1979). La deficiencia en Se, llevó a una disminución de la actividad de la enzima (Tabla 14), que sería la causa de un aumento en el estado estacionario de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de OH<sup>·</sup>, capaces de iniciar la peroxidación lipídica.

De acuerdo con lo explicado la vitamina E y el Se actuarían en forma complementaria, en zonas hidrofóbicas y hidrofílicas de la célula. La deficiencia de uno de ellos, produjo aumentos en la lipoperoxidación pero las estructuras biológicas no resultaron lesionadas irreversiblemente (no se observó desarrollo de necrosis).

Segun los resultados mostrados en la figura 40, la lipoperoxidación precedió en el tiempo a la aparición de estados necróticos en el hígado de ratas. Similares resultados habían sido informados en eritrocitos donde la lipoperoxidación, medida como formación de malondialdehido, ocurre antes que la hemolisis (Fee y col., 1975). Este hecho es importante al considerar la posibilidad de que la lipoperoxidación podría ser el mecanismo desencadenante de lesiones irreversibles, al destruir los fosfolípidos de las membranas, alterando su permeabilidad selectiva.

La correlación que se muestra en la figura 41, entre la actividad de la glutatión peroxidasa dependiente de Se y la emisión del hígado, pone de manifiesto una situación de estrés



oxidativo donde por modificación de los niveles de un nutriente (en este caso el Se), se genera un aumento en la velocidad de lipoperoxidación, medida como quimioluminiscencia. Un resultado similar, fue obtenido en ratones portadores de tumor, en los cuales al disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y del GSH, se registró un aumento en la emisión de los hígados de estos animales (Boveris y col., 1985).

#### 8.9. Efecto antioxidante de polifenoles vegetales.

Los polifenoles usados, flavonoides y ácidos cafeoilquínicos, son sustancias que abundan en los vegetales. Muchos de ellos han sido usados frecuentemente como protectores hepáticos y se ha intentado explicar su papel hepatoprotector por la capacidad de atrapar radicales libres, que muestran los polifenoles al tener una estructura química en la que abundan los dobles enlaces y los grupos con átomos de O<sub>2</sub>. En los últimos años aparecieron trabajos, abarcando estos estudios in vitro (Younes y Sieger, 1981; Kiso y col., 1983).

En la primer parte de nuestros experimentos se estudió el poder antioxidante de una serie polifenoles, por su capacidad de inhibir la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de ratón, iniciada por BOOH. La (+)-catequina ((+)-cyanidanol-3) fue el flavonoide que mostró mayor capacidad antioxidante (Tabla 15, Figura 43). Esta droga había sido extensamente estudiada en la década del 70 como hepatoprotector

(Slater y Sawyer, 1971; Bertelli, 1975; Kappus, 1981; Conn, 1983). La capacidad antioxidante encontrada en nuestro sistema ( $DI_{50} = 3 \mu M$ ) fue similar a la informada por Young y Sieger (1981), evaluada por la inhibición de la peroxidación espontánea de homogeneizados de hígado de rata, medida como formación de malondialdehído ( $DI_{50} = 2.5 \mu M$ ). En experimentos de nuestro grupo, se determinó una  $DI_{50}$  del orden de  $10^{-3}$  M, para la vitamina E; este resultado puede explicarse por la baja solubilidad de la vitamina E en medio acuoso, lo que dificulta su accesibilidad a las zonas hidrofílicas donde se estarían generando los radicales oxidativos (membranas microsomales, membrana plasmática).

Las actividades de los polifenoles estudiados (Tabla 15), permitió conocer la capacidad de cada uno de inhibir la quimioluminiscencia iniciada por BOOH.

Comparando las estructuras químicas de las sustancias estudiadas, se hace difícil correlacionar estructura y actividad. Sin embargo es posible considerar la necesidad de la presencia de grupos hidroxilo, en las posiciones 3' y 4', para desarrollar actividad; asimismo la metilación de los grupos hidroxilo y la presencia de grupos azúcar en la molécula de polifenol, mostraron ser motivo de una disminución de la actividad. Si bien a estas restricciones obedecen la mayor parte de los compuestos, hay dos excepciones: la alta actividad de la chalcona B, que carece de oxidrilo en la posición 4', y la baja actividad de la quercitina.

Videla y col., (1981), informaron acerca del efecto de la (+)-catequina sobre los cambios en el contenido de glutatión y en la lipoperoxidación producidos por la ingesta aguda de etanol en ratas. En base a este trabajo y a los resultados obtenidos para la (+)-catequina en nuestros experimentos in vitro (Tabla 14, Figura 43) se estudió el efecto de la droga sobre el aumento de emisión producido por el etanol in vivo. La protección ejercida por la (+)-catequina, enfatiza la importancia de la deficiencia en antioxidantes solubles que generaría aumentos en la velocidad de producción de especies excitadas en esta situación de estrés oxidativo. Cuando se estudió el efecto de la (+)-catequina sobre la emisión estimulada por CCl<sub>4</sub> (Tabla 18), la protección ejercida fue mucho menor, y esto pudo deberse a los diferentes mecanismos bioquímicos, a través de los cuales ambas sustancias inician el proceso de lipoperoxidación. El CCl<sub>4</sub> desencadena la formación de especies excitadas inmediatamente a su acción sobre el citocromo P450, por lo tanto se hace difícil prevenir la formación o desactivar las especies oxidativas, ya que los antioxidantes solubles no estarían concentrados en las zonas cercanas al retículo endoplásmico, sino distribuidos homogéneamente en el citosol.

El eriodictiol, mostró tener un mayor efecto en la prevención de los aumentos de quimioluminiscencia producidos por el CCl<sub>4</sub>, a pesar de que in vitro su efecto fue menor que el de la catequina.

De estos resultados puede inferirse que el carácter soluble de las sustancias estudiadas, es importante no sólo en la protección frente a la lipoperoxidación, sino que serían drogas de gran importancia en la prevención del efecto destructivo de radicales oxidativos sobre ácidos nucleicos, proteínas solubles, nucleótidos, y otras moléculas presentes en el citosol. La administración de estos polifenoles a individuos sometidos a estrés oxidativo, sería de utilidad al cubrir la falta o reemplazar los antioxidantes consumidos.

#### 8.10. Quimioluminiscencia de hígado medida in situ y su relación con la lipoperoxidación.

Los resultados obtenidos del estudio de las diferentes situaciones de estrés oxidativo, permiten establecer una clara correlación entre la quimioluminiscencia y la lipoperoxidación en el hígado de ratas y ratones. Las evidencias que sustentan esta correlación son: a) el uso de un modelo experimental conocido por su capacidad de producir lipoperoxidación en el hígado, como es la intoxicación con  $\text{CCl}_4$ ; b) las medidas de lipoperoxidación in vitro (formación de malondialdehído y de dienos conjugados), hechas en paralelo con las medidas de quimioluminiscencia en la intoxicación aguda con etanol (Tabla 11) y c) las modificaciones de la emisión del hígado producidas por desbalances entre pro- y antioxidantes. Así un aumento en la generación de  $\text{O}_2^-$  (Tabla 10), un aumento en el contenido de citocromo P450 (Figura 31) o una disminución de la actividad de

la glutatión peroxidasa (Figura 41), del GSH (Figura 37), o del contenido de vitamina E (Figura 39), llevaron a aumentos en la quimioluminiscencia de hígado. Asimismo un aumento en las actividades de las enzimas antioxidantes (Tabla 6) o un aumento de la concentración de sustancias antioxidantes como el eriodictiol y la catequina (Tabla 18), produjeron disminuciones de la emisión del hígado.

En la tabla 19 se observa que no hay un mecanismo bioquímico único que relacione un estrés oxidativo con el aumento que produce en la velocidad de lipoperoxidación en el hígado, sino que diferentes modificaciones intracelulares pueden desencadenar la lipoperoxidación.

A partir de los estudios de quimioluminiscencia se intentó establecer una continuidad bioquímica entre la lipoperoxidación y la producción de lesiones irreversibles en el hígado. En la tabla 19 se observa que las situaciones de estrés que llevan a necrosis (intoxicación con CCl<sub>4</sub> (administrada en dosis mayores que las usadas en nuestros experimentos) y deficiencia en vitamina E y Se), llevaron a aumentos del orden del 100 % sobre la quimioluminiscencia de los hígados de los animales control. En las demás situaciones estudiadas, aumentos menores no causan lesiones irreversibles. Este hecho estaría indicando la capacidad de los sistemas biológicos de adaptarse a situaciones de estrés oxidativo hasta un determinado nivel de aumento de la producción de especies oxidativas potencialmente destructivas de la integridad biológica.

Así cuando una célula es sometida a un estrés oxidativo (altas presiones de oxígeno, altos niveles de polutantes, radiaciones, etc.), se produce una disminución de los niveles de sus defensas antioxidantes en las sustancias atraparoras de radicales libres. Esta disminución lleva a una situación donde se desencadenan procesos patológicos, como pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas, inactivación enzimática o daño a moléculas informacionales, que conducirán a alteraciones y muerte celular. Estos procesos parecen estar relacionados con cáncer, enfermedades degenerativas (envejecimiento), intoxicaciones, etc. Dichas situaciones patológicas, podrían ser mejoradas suplementando el tratamiento específico con la administración de antioxidantes exógenos (enzimas o sustancias), biológicamente activos. Ya que estos antioxidantes actúan a distintos niveles dentro del proceso de peroxidación, los estudios de los mecanismos bioquímicos de cada situación, se hacen indispensables a fin de determinar la sustancia antioxidante adecuada a ser usada en cada caso.

TABLA 19. QUIMIOLUMINISCENCIA Y MODIFICACIONES BIOQUIMICAS EN EL HIGADO DE RATAS Y RATONES SOMETIDOS A ESTRES OXIDATIVO.

Estrés	Modificación bioquímica	Quimioluminiscencia (%)
Intoxicación con $\text{CCl}_4$ (rata)	Destrucción del retículo endoplásmico. Daño celular, dependiente de la dosis administrada.	+ 658
(ratón)		+ 173
+ eriodictiol (ratón)		+ 100
Intoxicación con barbital (ratón)	Inducción de la proteína microsomal (citocromo P450). Incremento de la actividad de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y del contenido de catalasa y de glutatión.	0
+ $\text{CCl}_4$		+ 120
Intoxicación crónica con etanol (rata)	Proliferación del retículo endoplásmico. Niveles no modificados de enzimas antioxidantes.	+ 54
+ $\text{CCl}_4$		+ 695
Intoxicación aguda con etanol (rata)	Niveles disminuídos de glutatión reducido	+ 69
+ (+)-Catequina		0
Deficiencia en vitamina E y Se	Disminución en los niveles de vitamina E y en la actividad de la glutatión peroxidasa dependiente de Se. Necrosis hepática	+100

**Conclusiones**



1. La quimioluminiscencia de órgano, constituye una técnica específica y no invasiva para el órgano bajo estudio, que permite evaluar la emisión de fotones que se está produciendo in vivo. Esta emisión de fotones es proporcional a la velocidad de formación de especies excitadas, la que a su vez es proporcional a la velocidad de lipoperoxidación.
2. La quimioluminiscencia espontánea de hígado de rata y de ratón, indica la existencia de una velocidad fisiológica de lipoperoxidación, medida a partir de una capa externa de 3 o 4 células.
3. Diferentes situaciones de estrés oxidativo producen aumentos en la quimioluminiscencia del hígado, que pueden ser interpretados como incrementos en la velocidad de lipoperoxidación.
4. Los mecanismos bioquímicos responsables de los aumentos de quimioluminiscencia del hígado, son diferentes según la situación de estrés considerada.
5. En la biotransformación hepática del CCl<sub>4</sub> interviene el citocromo P450, produciendo especies radicales capaces de iniciar el proceso de lipoperoxidación.
6. Un incremento simultáneo de los prooxidantes y de los

antioxidantes celulares, conduce a niveles no modificados de la quimioluminiscencia del hígado en ratones.

7. El etanol produce lipoperoxidación hepática, tanto cuando es administrado crónica como agudamente. Un aumento de los prooxidantes sin modificación del contenido o actividad de los antioxidantes o una disminución de una sustancia antioxidante, producidos por el etanol, llevan a aumentos de la quimioluminiscencia del hígado de ratas.

8. Una disminución de los antioxidantes fisiológicos (vitamina E y Se-glutación peroxidasa) lleva a la producción de lesiones celulares irreversibles (necrosis), que son precedidas por un aumento de la quimioluminiscencia espontánea del hígado en ratas.

9. La vitamina E y la Se-glutación peroxidasa parecen actuar como antioxidantes fisiológicos en forma sinérgica. Las deficiencias en vitamina E o en selenio en ratas, no producen necrosis, pero sí se generan aumentos en la quimioluminiscencia espontánea del hígado.

10. La quimioluminiscencia de fracciones subcelulares, iniciada por BDOH, constituye un método adecuado de medida de los antioxidantes y prooxidantes presentes en la fracción.

11. La administración a ratas y ratones de sustancias que por su estructura química pueden actuar como antioxidantes (flavonoides y ácidos cafeoilquínicos), disminuye la quimioluminiscencia del hígado tanto in vivo como in vitro.

12. A partir de las medidas de quimioluminiscencia de hígado in situ, se puede estimar que el oxígeno consumido por la lipoperoxidación fisiológica, representa entre un 1 y un 2 % del consumo total.

## **Referencias**

- Agarwal, A. K. y H. M. Mehendale (1984). Carbon tetrachloride alterations in calcium homeostasis in chlordecone and phenobarbital pretreated animals. *Life Sci.* 34:141-148
- Ames, B., R. Cathcart, E. Schwiers y P. Hochstein (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in human against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6858-6862
- Bartoli, G. M., T. Galeotti, G. Palombini, G. Parisi y A. Azzi (1977). Different contributions of rat liver microsomal pigments in the formation of superoxide anions and hydrogen peroxide during development. *Arch. Biochem. Biophys.* 184:276-281
- Bartoli, G. y H. Sies (1978). Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. *FEBS Lett.* 86:89-91
- Bertelli, A. (1975). Pharmacological aspects of (+)-cyanidanol-3, en Bertelli-New Trends in the Therapy of Liver Diseases. Karger Basel, pp 92-99
- Bird, R. P. y H. H. Drapper (1984). Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Meth. Enzymol.* 105:299-305
- Bodaness, R. S. (1982). The potential role of NADPH and cytoplasmic NADP-linked dehydrogenases in protection against singlet oxygen-mediated cellular toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:1709-1715
- Bors, W., C. Michell y M. Saran (1979). On the nature of biochemically generated hydroxyl radical. *Eur. J. Biochem.* 95:621-627.
- Boveris, A., N. Oshino y B. Chance (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128:617-630
- Boveris, A., E. Cadenas y A. O. M. Stoppani (1976). Role of ubisemiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 56:435-444
- Boveris, A., E. Cadenas, R. Reiter, M. Filipkowsky, M. Nakase y B. Chance (1980). Organ chemiluminescence: non invasive assay for oxidative radical reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:347-351
- Boveris, A., E. Cadenas y B. Chance (1981). Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for peroxidative radical reactions. *Fed. Proc.* 40:195-198
- Boveris, A., C. G. Fraga, A. I. Varsavsky y O. R. Koch (1983).

- Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227:534-541
- Boveris, A., A. I. Varsavsky, S. Gonzalez Da Silva y R. A. Sanchez (1983a). Chemiluminescence of soybean seeds: spectral analysis, temperature dependence and the effect of inhibitors. *Photochem. Photobiol.* 38:99-104
- Boveris, A., S. F. Llesuy y C. G. Fraga (1985). Increased liver chemiluminescence in tumor bearing mice. *J. Free Radicals in Biology and Medicine.* 1:
- Burton, G. W., K. H. Cheeseman, T. Doba, K. U. Ingold y T. F. Slater (1983). Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo. *Ciba Foundation Symp.* 101:4-18
- Cadenas, E., A. Boveris y B. Chance (1980). Spectral analysis of the low level chemiluminescence of hydrogen peroxide-supplemented ferricytochrome c. *FEBS Lett.* 112:285-288
- Cadenas, E., H. Wefers y H. Sies (1981). Low-level chemiluminescence of isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 119:531-536
- Cadenas, E. (1984). Biological chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.* 49:823-830
- Cadenas, E. y H. Sies (1984). Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Meth. Enzymol.* 105:221-231
- Cadenas, E., H. Sies, A. Campa y G. Cilento (1984). Electronically excited states in microsomal membranes. Use of chlorophyll-a as an indicator of triplet carbonyls. *Photochem. Photobiol.* 40:661-666
- Cadenas, E., M. Grinsberg, U. Rabe y H. Sies (1984a). Evaluation of  $\alpha$ -tocopherol antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation as detected by low level chemiluminescence. *Biochem. J.* 223:755-759
- Cadenas, E. (1985). Oxidative stress and formation of excited species, en *Oxidative Stress*, editado por H. Sies, Academic Press, San Diego, (en prensa)
- Castro, J. A., E. C. de Ferreyra, C. R. de Castro, O. M. de Fenos, H. Sasame y J. R. Gillette (1974). Prevention of carbon tetrachloride-induced necrosis by inhibitors of drug metabolism. Further studies on their mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.* 23:295-302

- Castro, J. A. (1984). Mechanistical studies and prevention of free radical cell injury, en Proc. of the IUPHAR, volumen II, Mac Millan Press (Londres), pp 243-250
- Cederbaum, A. H., C. S. Lieber, D. S. Beathie y E. Rubin (1975). Effect of chronic ethanol ingestion on fatty acids oxidation by hepatic mitochondria. J. Biol. Chem. 250,13:5122-5129
- Cederbaum, A. I., E. Dicker y G. Cohen (1980). Role of hydroxyl radical in microsomal oxidation of alcohols, en Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Advances in Experimental Biology and Medicine, editado por R. G. Thurman, Plenum Press, New York, pp 1-10
- Cilento, G. (1980). Generation of triplet energy in enzymatic systems. Acc. Chem. Res. 13:225-230
- Cohen, G. (1977). A novel route for the metabolism of ethanol: the oxidation of ethanol by hydroxyl radicals, en Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, volumen II, editado por R. G. Thurman, J. R. Williamson, H. R. Drott and B. Chance, Academic Press, Nueva York, pp 403-412
- Combs, G. F., T. Noguchi y M. L. Scott (1975). Mechanism of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. Fed. Proc. 34:2090-2095
- Conn, H. O. (1983). Cyanidanol: will a hepatotrophic drug from Europe go west? Hepatology 3:121-123
- Cooper, D. Y., H. Scheleyer, J. H. Thomas, H. M. Vars y O. Rosenthal (1975). Comparison of the induction course, biophysical chemical interactions and photochemical action spectra of phenobarbital and 3-methylcholathrene induced hepatic microsomal P450. Adv. Exp. Med. and Biol. 58:81-102
- Chance, B. (1954). Special methods, en Methods of Biochemical Analysis, editado por D. Glick, Interscience, Nueva York, pp 408-424
- Chance, B., A. Boveris, Y. Nakase y H. Sies (1978). Hydroperoxide metabolism: an overview, en Functions of Glutathione in Liver and Kidney, editado por H. Sies y A. Wendel. Springer Verlag, Berlin, pp 95-106
- Chance, B., H. Sies y A. Boveris (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 59,3:527-605
- Chou, F. T. y A. U. Khan (1983). L-ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: generalyzed antioxidant property of vitamin C. Biochem. Biophys. Res.

Commun. 115:932-937

Darling, T. R. y C. S. Foote (1974). Thermal and photochemical decomposition of 3,4-dimethyl, 3,4-di-n-butyl-1,2-dioxetane. Competitive generation of singlet and triplet 2-hexanone. J. Am. Chem. Soc. 96:1625-1627

De Duve, C. y P. Baudhuin (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). Physiol. Rev. 46:323-357

Di Luzio, N. R. (1966). A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. Lab. Invest. 15,1,1:50-60

Di Luzio, N. R. (1968). The role of lipid peroxidation and antioxidants in ethanol-induced lipid alterations. Exp. Mol. Pathol. 8,3:394-402

Di Luzio, N. R. (1973). Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury. Fed. Proc. 32:1875-1881

Di Luzio, N. R. y T. E. Stege (1977). Enhanced hepatic chemiluminescence following carbon tetrachloride or hydrazine administration. Life Sci. 21:1457-1464

Diplock, A. T. y J. A. Lucy (1973). The biochemical modes of action of vitamin E and selenium: a hypothesis. FEBS Lett. 29,3:205-210

Diplock, A. T. (1983). The role of vitamin E in biological membranes. Ciba Foundation Symp. 101:45-55

Ernster, L. y K. Nordenbrand (1967). Microsomal lipid peroxidation. Meth. Enzymol. 10:574-580

Estabrook, R. W. y J. Werringloer (1977). The oxygen sensing characteristics of microsomal enzymes, en Tissue Hypoxia and Ischemia, editado por M. Reivich, R. Loburn, S. Lahiri y B. Chance, Plenum Press, Nueva York, pp 19-35

Evans, H. M. (1962). The pioneer history of vitamin E, en Vitamins and Hormones, volumen XX, editado por R. S. Harris y I. G. Wool, Academic Press, New York, pp 379-387

Fee, J. A., R. Bergamini y R. G. Briggs (1975). Observations on the mechanism of the oxygen/dialuric acid-induced hemolysis of vitamin E-deficient rat red blood cells and the protective roles of catalase and superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophys. 169:160-167

Flohe, L. y Gunzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. Meth. Enzymol. 105:114-121



Foote, C. S. (1976). Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, en *Free Radicals in Biology*, volumen II, editado por W.A.Fryor, Academic Press, Nueva York, pp 85-133

Fraga, C. G., V. S. Martino, G. Ferraro, J. Coussio y A. Boveris (1984). Polifenoles aislados de plantas medicinales argentinas. Su accion antioxidante sobre el higado. Premio Felix de Azara, bienio 82-83, Facultad de Farmacia y Bioquimica, Universidad de Buenos Aires.

Fraga, C. G., S. F. Llesuy y A. Boveris (1984). Increased carbon tetrachloride-stimulated chemiluminescence in the in situ liver of barbital-treated mice. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 34:143-155

Frank, H., T. Hintze, D. Bimboes y H. Remmer (1980). Monitoring lipid peroxidation by breath analysis: endogenous hydrocarbons and their metabolic elimination. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56:337-340

Fridovich, I. (1976). Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity, en *Free Radicals in Biology*, volumen I, editado por W. A. Fryor, Academic Press, New York, pp 239-277

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201:875-880

Gerschman, R., D. Gilbert, S. Nye, P. Dwyer y W. Fenn (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation. A mechanism in common. *Science*, 119:623-626

Gerschman, R. (1964). Biological effects of oxygen, en *Oxygen in the Animal Organism*, editado por F. Dickens y E. Neil, Pergamon Press, Londres, pp 475-494

Gilbert, D. L. (1981). Oxygen: an overall biological view, en *Oxygen and Living Process*, editado por D. L. Gilbert, Springer Verlag, New York, pp 376-392

Grams, G. W. y K. Eskins (1972). Dye-sensitized photooxidation of tocopherols. Correlation between singlet oxygen activity and vitamin E activity. *Biochemistry*, 11:606-608

Green, J. (1972). Vitamin E and the biological antioxidant theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 203:29-44

Haber, F. y J. Weiss (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London*, 147:322-351

- Hastings, J. W. y G. Weber (1963). Total quantum flux of isotopic sources. *J. Optical. Soc. of America*, 53:12,1410-1415
- Hastings, J. W. y T. Wilson (1976). Bioluminescence and chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.* 23:461-473
- Hildebrandt, D. G. y I. Roots (1975). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 171:385-397
- Hoekstra, W. G. (1975). Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed. Proc.* 34:2083-2089
- Ingold, K. U. (1969). Peroxy radicals. *Acc. Chem. Res.* 2:1,1-9
- Kappus, H., U. Koster, D. Albrecht, H. Kieczka y H. Remmer (1978). Lipid peroxidation induced by ethanol and halogenated hydrocarbons in vivo as measured by ethane exhalation, en *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*, editado por H. Sies y A. Wendel, Springer Verlag, Berlin, pp 176-182
- Kappus, H. (1981). (+)-cyanidanol-3 inhibition of lipid peroxidation induced by hepatotoxic drugs in the rat, en (+)-cyanidanol-3 in *Diseases of the Liver*, editado por H. O. Conn, Academic Press y Royal Soc. Medicine (Londres), pp 17-18
- Keller, F., A. Snyder, F. J. Petracek y K. M. Sancier (1971). Hepatic free radical levels in ethanol-treated and carbon tetrachloride-treated rats. *Biochem. Pharmacol.* 20:2507-2511
- Khan, A. U. y M. Kasha (1966). Physical theory of chemiluminescence in systems involving molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 88:1574-1576
- Kiso, I., M. Tohkin y H. Hikino (1983). Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced citotoxicity in primary cultured hepatocytes. *J. Nat. Prod.* 46:841-847
- Klug, D., I. Rabani y I. Fridovich (1972). A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* 247:4839-4842
- Koch, O. R., C. D. Bedetti, M. Gamboni, G. Anzola Montero y A. O. M. Stoppani (1976). Functional alterations of liver mitochondria in chronic experimental alcoholism. *Exp. Mol. Pathol.* 25:253-262
- Koch, O. R., A. Boveris y A. O. M. Stoppani (1977).

Mitochondrial injury in experimental chronic alcoholism, en Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, volumen II, editado por R. G. Thurman, J. R. Williamson, H. R. Drott y B. Chance, Academic Press, New York, pp 441-450

Koch, O. R., A. Boveris, S. Sirotzky de Favelukes, M. Schwarcz de Tarlovsky y A. O. M. Stoppani (1977a). Biochemical lesions of liver mitochondria from rats after chronic alcohol consumption. *Exp. Mol. Pathol.* 27:213-220

Koch, O. R., E. Martino, A. Boveris y H. Sies (1980). Increase biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats, en Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Advances in Experimental Medicine and Biology, editado por R. G. Thurman, Plenum Press, New York, pp 619-626

Kosower, N. S. y E. M. Kosower (1976). The glutathione-glutathione disulfide system, en Free Radicals in Biology, volumen II, editado por W. A. Pryor, Academic Press, New York, pp 55-84

Krinsky, N. I. y J. M. Deneke (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J. Natl. Cancer Inst.* 69:205-209

Lengfelder, E., E. Cadenas y H. Sies (1983). Effect of DABCO on singlet oxygen monomol (1270 nm) and dimol (634 and 703 nm) emission. *FEBS Lett.* 164,2:366-370

Lieber, C. S. y L. M. De Carli (1970). Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. *J. Biol. Chem.* 245:2505-2512

Litov, R. E., D. H. Iwing, J. E. Downey y A. L. Tappel (1978). Lipid peroxidation: a mechanism involved in acute ethanol toxicity as demonstrated by in vivo pentane production. *Lipids*, 13:305-307

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275

Mc Cay, P. B., D. D. Gibson, K. L. Fong y K. R. Hoonbrook (1976). Effect of glutathione peroxidase on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 431:459-468

Mc Cay, P. B., M. M. King, J. L. Poyer and E. K. Lai (1982). An update on antioxidant theory: spin trapping of trichloromethyl radicals in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 393:23-30

McCord J. M. y I. Fridovich (1969). Superoxide-dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055

Mc Cord, J. M. y E. D. Day (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. FEBS Lett. 86:139-142

Mason, K. E. (1954). Tocopherols, VII. Effects of deficiency un animals, en *The Vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Methods*, editado por W. H. Sebrell Jr y R. S. Harris, Academic Press, New York, pp 514-562

Mason, R., (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals, en *Free Radicals in Biology*, volumen V, editado por W. A. Pryor, Academic Press, New York, pp 161-212

Matheson, I. B. C., R. D. Etheridge, N. R. Kratowich y J. Lee (1975). The quenching of singlet oxygen by aminoacids and proteins. *Photochem. Photobiol.* 21:165-171

Matsumura, T., T. Suematsu, N. Sato, T. Kaneda y H. Abe (1980). Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in man, en *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Plenum Press, New York, pp 287-294

Mattill, H. A. (1947). Antioxidants. *Ann. Rev. Biochem.* 16:177-192

Mead, J., (1976). Free radical mechanism of lipid damage and consequences for cellular membranes, en *Free Radicals in Biology*, volumen I, editado por W. A. Pryor, Academic Press, New York, pp 51-67

Michaelis, L. (1946). Fundamentals of oxidation or reduccion, en *Currents in Biochemical Research*, editado por D. E. Green, Interscience, New York, pp 207-227

Mills, G. C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229:189-197

Mills, G. C. (1960). Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 86:1-5

Mishin, V., A. Pokrovsky y V. V. Lyakovich (1976). Interactions of some acceptors with superoxide anion radicals formed by the NADPH-specific flavoprotein in rat liver microsomal fractions. *Biochem. J.* 154:307-310

Misra, H. P. y I. Fridovich (1972). The role of superoxide anion in the auto oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247,10:3170-3175

- Miwa, G. T., W. Levin, P. E. Thomas y A. Y. H. Lu (1977). Evidence for the direct involvement of hepatic cytochrome P450 in ethanol metabolism, en *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, volumen II, editado por R. G. Thurman, J. R. Williamson, H. R. Drott y B. Chance, Academic Press, New York, pp 323-334
- Muller, A. y H. Sies (1982). Role of alcohol deshydrogenase activity and of acetaldehyde in ethanol-induced ethane and pentane production by isolated perfused rat liver. *Biochem. J.* 206:153-156
- Oberley, L. W. (1982). Superoxide dismutase and cancer, en *Superoxide Dismutase*, volumen II, editado por L. W. Oberley, CRC Press, Florida, pp 127-165
- Ohnishi, K. y C. S. Lieber (1977). Reconstitution of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system in control rats and after ethanol feeding. *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, volumen II, editado por R. G. Thurman, J. R. Williamson, H. R. Drott y B. Chance, Academic Press, Nueva York, pp 341-350
- Owens, C. W. I. y R. V. Belcher (1965). A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* 94:705-711
- Packer, J. E., T. F. Slater y R. L. Wilson (1978). Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical (CC13O2) with aminoacids: pulse radiolysis evidence. *Life Sci.* 23:2617-2620
- Packer, J. E., T. F. Slater y R. L. Wilson (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278:737-738
- Patterson, E. L., R. Milstrey y E. L. Stokstad (1957). Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95:617-620
- Pietronigro, D., W. Jones, K. Kalty y H. Demopoulos (1977). Interaction of DNA and liposomes as a model for membrane-mediated DNA damage. *Nature*, 267:78-79
- Firenne, M. H. y E. J. Denton (1952). Accuracy and sensivity of human eye. *Nature (London)*, 170:1039-1042
- Porta, E. A., F. A. De La Iglesia y W. S. Hartroft (1968). Studies on dietary hepatic necrosis. *Lab. Invest.* 18,3:283-297
- Porter, N. A., (1980). Prostaglandines endoperoxides, en *Free Radicals in Biology*, volumen IV, editado por W. A. Pryor,

Academic Press, New York, pp 261-294

Pryor, W. A. (1976). The role of free radical reactions in biological systems, en *Free Radicals in Biology*, editado por W. A. Pryor, Academic Press, New York, pp 1-43

Recknagel, R. O. (1967). Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 19:145-208

Recknagel, R. O., E. A. Glende y A. M. Hruszkewycz (1977). Chemical mechanism in tetrachloride toxicity, en *Free Radicals in Biology*, volumen III, editado por W. A. Pryor, Academic Press, Nueva York, pp 97-132

Recknagel, R. O. y E. A. Glende (1984). Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Meth. Enzymol.* 105:331-337

Remmer, H., H. Greim, J. B. Schenkman y R. W. Estabrook (1967). Methods for the elevation of hepatic microsomal mixed function oxidase levels and cytochrome P450. *Meth. Enzymol.* 10:703-708

Reynolds, E. S. y M. T. Moslen (1980). Free radical damage in liver, en *Free Radicals in Biology*, volumen IV, editado por W. A. Pryor, Academic Press, Nueva York, pp 49-90

Rieley, C. A., G. Cohen y M. Lieberman (1974). Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science*, 183:208-210

Rivas, E. I., G. Cilento y A. Boveris (1985). Generation of excited states during lipoxigenase catalyzed oxidation of linoleate. *Photochem. Photobiol.* (en prensa)

Rotilio, G., R. C. Bray y E. M. Fielden (1972). A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta.* 268:605-609

Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman y W. G. Hoekstra (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179:588-590

Rubin, L. F., (1975). Toxicity of dimethyl sulfoxide, alone and in combination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 243:98-103

Russell, G. L. (1957). Deuterio-isotope effects in the autooxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 79:3871-3877

Sagai, M. y A. L. Tappel (1978). Effects of vitamin E on carbon tetrachloride induced lipid peroxidation as demonstrated by in vivo pentane production. *Toxicol. Lett.* 2:149-155

Schwartz, K. y C. M. Foltz (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79:3292-3293

Sies, H., T. Bucher, N. Oshino y B. Chance (1973). Heme occupancy of catalase in hemoglobin free perfused rat liver and of isolated liver catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 154:106-116

Sies, H. y K. H. Summer (1975). Hydroperoxide metabolizing system in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 57:503-512

Sies, H., O. R. Koch, E. Martino y A. Boveris (1979). Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett.* 103:287-290

Sies, H. y T. P. M. Akerboom (1984). Glutathione disulfide (GSSG) eflux from cells and tissues. *Meth. Enzymol.* 105:445-451

Slater, T. F. (1966). Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation. *Nature (London)*, 209:36-40

Slater, T. F. y B. C. Sawyer (1971). The stimulatory effects of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. *Biochem. J.* 123:823-828

Slater, T. F. y R. Scott (1981). The free radical scavenging action of (+)-cyanidanol-3 in relation to the citotoxicity of carbon tetrachloride, en (+)-cyanidanol-3 in *Diseases of the Liver*, editado por H. O. Conn, Academic Press y Royal Soc. of Medicine, Londres, pp 33-39

Slater, T. F. (1984). Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 222:1-15

Smith, G. J. (1983). Reaction of retinol with singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 38:2,119-121

Stauff, J., H. Schmidkuntz y G. Hartman (1963). Weak chemiluminescence of oxidation reactions. *Nature (London)*, 198:281-283

Stauff, J. y J. Ostrowski (1967). Chemilumineszenz von mitochondrien. *Z. Naturforschg*, 22b:734-740

Stege, T. E., J. D. Hauby y N. R. Di Luzio (1977). Acetaldehyde-induced hepatic lipid peroxidation, en *Currents in Alcoholism, Biological, Biochemical and Clinical Studies*,

volumen I, editado por F. R. Seixas, Grune and Stratton, Nueva York, pp 139-160

Tappel, A. L. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. Fed. Proc. 32:1870-1874

Tappel, A. L. (1980). Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation, en Free Radicals in Biology, volumen IV, editado por W. A. Pryor, Academic Press, pp 1-47

Tappel, A. L. y C. J. Dillard (1981). In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. Fed. Proc. 40:174-178

Tarusov, B., A. Polidova, A. Zhuravlev y E. Sekamova (1962). Ultraweak luminescence of animal tissues. Tsitologiya, 4:696-699

Theorell, H. (1974). Historical aspects of physiological alcohol combustion, en Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, editado por R. G. Thurman, T. Yonetani, J. R. Williamson y B. Chance, Academic Press, New York, pp 1-6

Thurman, R. G., H. G. Ley y R. Scholz (1972). Hepatic microsomal ethanol oxidation. Eur. J. Biochem. 25:420-430

Thurman, R. G. (1973). Induction of hepatic microsomal NADPH-dependent production of hydrogen peroxide by chronic prior treatment with ethanol. Mol. Pharmacol. 9:670-675

Tietze, F. (1969). Enzimatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Anal. Biochem. 27:502-522

Tolmasoff, J., T. Ono y R. Cutler (1980). Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:2777-2781

Toranzo, E. G. D. de, A. Marzi y J. A. Castro (1981). Effects of cysteine and cystamine on the carbon tetrachloride induced decreased in arachidonic acid content of rat liver microsomal phospholipids. Toxicology, 19:77-82

Totter, J. R. (1980). Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:1763-1767

Turrens, J. F. y Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH deshydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem. J. 191:421-427

Turro, N. J., (1978). Modern molecular photochemistry. The



Benjamin Cummings, USA.

Valenzuela, A., N. Fernandez, V. Fernandez, G. Ugarte, L. A. Videla, R. Guerra y A. Villanueva (1980). Effect of acute ethanol ingestion on lipoperoxidation and on the activity of the enzymes related to peroxide metabolism in rat liver. FEBS Lett. 111:11-13

Varsavsky, A. (1983). Quimioluminiscencia de sistemas biológicos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Vassilev, R. y A. A. Vichuttinskii (1962). Chemiluminescence and oxidation. Nature (Londres), 194:1276-1277

Videla, L. A., V. Fernandez, G. Ugarte, A. Valenzuela y A. Villanueva (1980). Effect of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. FEBS Lett. 111:6-10

Videla, L. A., V. Fernandez, A. Valenzuela y G. Ugarte (1981). Effect of (+)-cyanidanol-3 on the changes in liver glutathione content and lipoperoxidation induced by acute ethanol intoxication in rats. Pharmacology, 22:343-348

Videla, L. A. y A. Valenzuela (1982). Alcohol ingestion, liver glutathion and lipid peroxidation: metabolic interrelations and pathological implications. Life Sci. 31:2395-2407

Videla, L. A., C. G. Fraga, O. R. Koch y A. Boveris (1983). Chemiluminescence of the in situ rat liver after acute ethanol intoxication. Effect of (+)-cyanidanol-3. Biochem. Pharmacol. 32:2822-2825

Videla, L. A. (1984). Hepatic antioxidant-sensitive respiration. Biochem. J. 223:885-891

Wefers, H. y H. Sies (1983). Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. Eur. J. Biochem. 137:29-36

Wilson, R. L. (1983). Free radical protection: why vitamin E, not vitamin C, carotene o glutathione. Ciba Foundation Symp. 101:19-44

Witting, L. A., (1981). Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical-initiated reactions, en Free Radicals in Biology, volumen IV, editado por W. A. Pryor, Academic Press, New York, pp 295-319

Younes, M. y C. P. Sieger (1981). Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. Planta Medica 43:240-244

# Resumen

Se estudió la quimioluminiscencia de hígado de rata y ratón, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés oxidativo.

La quimioluminiscencia fisiológica del hígado de rata fue de  $24 \pm 1$  cps/cm<sup>2</sup> y del hígado de ratón fue de  $109 \pm 6$  cps/cm<sup>2</sup>. Estos valores correspondieron a una capa superficial de tejido de aproximadamente 100  $\mu$ m de espesor y daban cuenta de un 2 % del oxígeno total consumido por el hígado. El 95 % de la emisión del hígado de ratones se midió a longitudes de onda mayores de 600 nm.

La administración de CCl<sub>4</sub> a ratones, produjo un 64 % de aumento de la emisión del hígado de esos animales. El tratamiento con barbital, no modificó la emisión espontánea del hígado, pero sí produjo aumentos de la emisión estimulada por CCl<sub>4</sub>, que a los 15 días de tratamiento fue del 135 %. Este aumento de la quimioluminiscencia estimulada por CCl<sub>4</sub>, se correlacionó con un aumento de la proteína microsomal. También aumentaron las actividades de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (109 %), catalasa (90 %) y glutatión peroxidasa (103 %) y del contenido de glutatión (18 %).

El tratamiento crónico con etanol, produjo aumentos del 45% de la velocidad fisiológica de producción microsomal de O<sub>2</sub>- ( $1.5 \pm 0.1$  nmoles/min/mg de proteína), del 54 % de la quimioluminiscencia espontánea del hígado y del 63 % de la emisión del hígado estimulada por CCl<sub>4</sub>. La actividad de la superóxido dismutasa citosólica no se modificó y la

quimioluminiscencia iniciada por BOOH, estaba aumentada en los homogeneizados (57 %), en las mitocondrias (43 %) y en los microsomas (28 %) aislados a partir del hígado de los animales tratados.

La administración aguda de etanol llevó a aumentos de la emisión espontánea del hígado del 60 %, de la formación de malondialdehído (48 %) y de la formación de dienos conjugados (65 %).

La deficiencia de vitamina E y Se, produjo aumentos de la emisión fisiológica del hígado de ratas, que al cabo de 18 días de tratamiento fueron del 100 %, y precedieron a la aparición de necrosis en ese órgano. Al cabo del 18 días, la quimioluminiscencia de hígado se incrementó en un 23 % en las ratas deficientes en vitamina E y en un 64 % en las deficientes en Se (en las cuales la actividad de la Se-glutación peroxidasa se redujo de 7.6 a 1.0 U/g de hígado).

La administración de (+)-catequina inhibió el 100 % del incremento de la emisión de hígado producido por la administración aguda de etanol. El eriodictiol, la catequina, la cinarina y el ácido 3,4-dicafeoilquínico, disminuyeron en un 38 %, 31 %, 13 % y 0 %, respectivamente, la emisión estimulada por CCl<sub>4</sub>. Estas sustancias fueron elegidas entre 21 polifenoles, a partir de sus DI<sub>50</sub> calculadas por su capacidad de disminuir la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de ratón iniciada por BOOH.

Todos estos resultados indican una clara correlación entre

lipoperoxidación y quimioluminiscencia de hígado in situ. Se observó que diferentes situaciones de estrés oxidativo, modificaron la emisión del hígado por distintos mecanismos bioquímicos.

Abstract

Cesar Fraga