

Rol de la vitamina E en la prevención del daño oxidativo en hígados regenerantes

González, M.A.¹; Bernal, C.²; Contini, M.C.¹; Mahieu, S.¹; Carrillo, M.C.³

1-Cátedra de Fisiología Humana.

2-Cátedra de Bromatología y Nutrición. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje el Pozo (3000) Santa Fe.

3- Instituto de Fisiología Experimental. Conicet. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Santa Fe.

RESUMEN: El objetivo del siguiente trabajo fue estudiar el potencial efecto preventivo de la vitamina E (Vit.E) sobre las alteraciones en la excreción hepática de aniones orgánicos colefilicos y en parámetros relacionados al estrés oxidativo en hígados regenerantes de ratas Wistar machos, a los 0 y 2 días post- hepatectomía parcial (65%). La excreción hepática de aniones orgánicos colefilicos fue evaluada a través de la desaparición plasmática del colorante rosa de bengala. Además evaluamos las actividades enzimáticas de catalasa, Glutathion peroxidasa, el contenido de Glutathion y el índice de lipoperoxidación en tejido hepático. A los 2 días de la hepatectomía parcial (HP) se observó una disminución de las constantes de captación y excreción del colorante, un aumento en el índice de lipoperoxidación y una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes, lo que reflejaría un aumento en la producción de radicales libres, sin modificación de los niveles de glutathion. El tratamiento con Vit E previno las alteraciones en las constantes de transferencia basolateral y canalicular como así también en los parámetros de estrés oxidativo. Estos hallazgos podrían tener relevancia clínica, ya que sugieren que estos efectos deletéreos sobre el transporte de aniones orgánicos ocasionados por la HP, vía inducción de estrés oxidativo, podrían ser eficientemente prevenidos por el tratamiento antioxidante con Vit E.

Palabras claves: hepatectomía parcial- vitamina E- estrés oxidativo- hígado.

Preventive effect of vitamin E on indicators of oxidative stress in liver regeneration. González, MA¹; Bernal, C²; Contini, MC¹; Mahieu, S¹; Carrillo, MC³. **Summary:** The aim of this work was to study the potential preventive effect of vitamin E (Vit E) on hepatic excretion alterations of colefilic organic anions and on oxidative stress parameters in the liver regeneration of male Wistar rats. The study was performed at 0 and 2 days after partial hepatectomy (65%). The hepatic excretion of colefilic organic anions was evaluated by determining the plasmatic disappearance of the Bengal Rose dye. The enzymatic activities of catalase, glutathion peroxidase, glutathion content, and lipoperoxidation levels in liver tissue were also evaluated. At 2 days of the partial hepatectomy (PH), a decrease in the dye uptake and excretion constants was observed as well as an increase in the lipoperoxidation level and a decrease in the antioxidant enzyme activity. This would reflect an increase in the production of free radicals with no modification of glutathion levels. Treatment with Vit E prevented alterations in the basolateral and canalicular transference constants as well as in the oxidative stress parameters. These findings could be clinically relevant since they suggest that these deleterious effects on organic anion transport caused by PH through oxidative stress induction could be efficiently prevented by the Vit E antioxidant treatment.

Key words: Partial Hepatectomy – vitamin E - oxidative stress- liver-

*** Correspondencia:**

Bioq. Marcela González. maidagon@fcb.unl.edu.ar.
4 de Enero 1186. Santa Fe. TE: 0342-4594763.

Introducción

El proceso de regeneración hepática fue descrito por Higgings y col. (1), en 1931 en estudios in vivo y más recientemente gracias a estudios desarrollados in vitro en cultivo primario de hepatocitos (2). Dicho proceso es el resultado de un equilibrio entre factores estimulantes e inhibidores de la proliferación hepatocitaria. El mantenimiento de una masa hepática funcionante adecuada parece ser un punto clave en la regulación del crecimiento hepático. La cinética de la regeneración depende de la especie y de la edad del animal, como así también del ritmo circadiano. Así la síntesis de ADN luego de una hepatectomía parcial (HP) es máxima a la 24 hs en la rata y a las 48 hs en el ratón llegando a alcanzar el volumen hepático inicial en 10 días luego de la cirugía. El hígado de los animales jóvenes parece regenerarse más rápido.

El hígado desempeña un papel vital en la digestión, así como también en la degradación de fármacos y sustancias extrañas que pueden formar productos metabólicos que dañan la célula hepática e interfieren con sus funciones. Dentro de las sustancias tóxicas metabolizadas por el hígado se encuentran los radicales libres generados a través del oxígeno (3). Bajo condiciones fisiológicas normales, las principales especies de oxígeno reducidas son el peróxido de hidrógeno, anión superóxido e hidroxilo y la supervivencia celular depende de la capacidad de contrarrestar las mismas a través de mecanismos de defensas antioxidantes que se encargan de la remoción de especies de oxígeno tóxicas.

Bajo condiciones de estrés oxidativo, la producción excesiva de especies oxígeno reactivas (ROS), supera la capacidad de los mecanismos de defensa. El exceso de radicales libres formados pueden dañar las células por aumento de la lipoperoxidación y por alteración de estructuras proteicas y de ácidos nucleicos (4,5).

Estudios experimentales han demostrado claramente que la injuria hepática, como la HP, está asociada a un incremento y la Vit E a una disminución del estrés oxidativo (6).

No ha sido totalmente dilucidado, a nivel molecular, el papel de la Vit E en la prevención del estrés oxidativo. Las experiencias con animales revelan que la Vit E ejerce dos funciones diferentes;

una función antitóxica y una función a nivel enzimático. La Vit E presenta una función antitóxica de protección frente a varios agentes químicos, en especial previene la formación de peróxidos a partir de ácidos grasos poli-insaturados, con lo cual facilita el mantenimiento y la estabilidad de las membranas biológicas y de los lisosomas en los eritrocitos, hígado y músculo (7). Además, la Vit E resulta ser necesaria, a nivel enzimático, para la síntesis del Heme, ya que, en su deficiencia, las actividades de las enzimas α ácido amino levulínico (ALA) sintetasa en la médula ósea y α ALA dehidrasa en el hígado se hallan disminuidas. Además, estudios en hígado de ratas, revelaron una disminución en el sistema hepático mitocondrial de hidroxilación de drogas que vuelven a la normalidad luego de la administración de Vit E (7).

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar, en animales de experimentación, si la administración de un agente antioxidante como la Vit E, puede prevenir las alteraciones inducidas por la hepatectomía parcial en la excreción hepática de aniones orgánicos colefilicos y en parámetros de estrés oxidativo.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos, peso promedio 300g (n=6 en cada grupo experimental). Los animales fueron mantenidos en un ambiente a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), con un ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas y alimentados con una dieta standard (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina) y agua *ad libitum*.

Protocolo experimental

Luego de 7-10 días de aclimatación, para evaluar el efecto preventivo de la Vit E sobre la excreción hepática de aniones orgánicos colefilicos y sobre parámetros de estrés oxidativo ocasionado por la recesión del 65 % del hígado, los animales fueron divididos al azar en 4 grupos experimentales:

- 1- HP (-): ratas controles.
- 2- HP(+): ratas con hepatectomía parcial (65%) y evaluadas a los 2 días de la cirugía
- 3- HP(-)E(+): ratas que fueron inyectadas diariamente en forma subcutánea con vitamina E (a-

tocóferol 0.95 g/ml, [Sigma Chemicals Co. St Louis, MO, USA]), durante 4 días antes de su sacrificio con una dosis de 600 mg/Kg de peso corporal.

4- HP(+)E(+): ratas con resección del 65% del hígado e inyectadas diariamente en forma subcutánea con Vit E durante los 2 días previos a la hepatectomía parcial y durante los 2 días de regeneración hepática, en la misma dosis administrada al grupo HP(-)E(+).

Las hepatectomías parciales se realizaron según la técnica de Higgins y Anderson (1). A los 0 y 2 luego de las hepatectomías, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50mg / Kg p.c). Animales de cada grupo fueron sacrificados y los hígados removidos, pesados y lavados con solución fisiológica fría para realizar las determinaciones de parámetros de estrés oxidativo (estudios *in vitro*).

Para la determinación de la desaparición plasmática del colorante rosa de bengala (estudios *in vivo*), 4 animales de cada grupo fueron anestesiados con una dosis única intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg pc), y mantenidos en esta condición durante todo el experimento. La vena femoral fue cateterizada utilizando catéter de polietileno PC-50 (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ EEUU) y el conducto biliar común se cateterizó con un catéter de polietileno PE-10 (Intramedic Clay Adams, Parsippany, NJ EEUU). En todos los casos, se realizó una traqueotomía, colocándose un catéter en la tráquea para facilitar la remoción de la secreción bronquial inducida por el anestésico. La temperatura corporal fue mantenida en todo momento entre 37 y 38.5 °C con una lámpara infrarroja. Finalizados los experimentos los animales fueron sacrificados por exsanguinación y los hígados removidos y pesados.

Determinación de la capacidad de regeneración hepática

Para evaluar la eficiencia de la regeneración hepática se midió la incorporación de ³H-Timidina al ADN en los animales que fueron sometidos a hepatectomía parcial. A las 24 y 48 hs luego de realizadas las hepatectomías parciales, ³H-Timidina (New Life Sciences, Boston, MA, USA) fue inyectada intraperitonealmente a una dosis de 10 mCi/200g pc y 1 hora después las ratas fueron sacrificadas. Los

hígados fueron extraídos y lavados con solución fisiológica fría. La incorporación de la radioactividad fue medida con un contador de centelleo líquido. La incorporación de ³H-Timidina fue expresada en dpm/mg ADN.

Estimación de parámetros farmacocinéticos de transporte hepático

Estos estudios fueron llevados a cabo con la finalidad de estimar el estado funcional de los dos sistemas de transporte hepático de mayor relevancia fisiológica, esto es, aquéllos involucrados en la transferencia a bilis de aniones orgánicos colefilicos y de sales biliares.

Para evaluar los sistemas de transporte de aniones orgánicos, se administró el colorante colefilico Rosa de Bengala (RB) (Sigma Chemical Co.; St.Louis, MO, EE.UU). Luego de inyectar el RB (25 mg/Kg p.c) por vía intravenosa, se recogieron muestras de sangre cada 2 minutos durante 30 min y muestras de bilis cada 10 min durante 60 min.

Los estudios farmacocinéticos de manejo hepático de estos compuestos fueron llevados a cabo graficando la concentración plasmática de los mismos en función del tiempo. Las curvas obtenidas se ajustaron a una ecuación biexponencial del tipo:

$$C - A.e^{-a_1t} + B.E.e^{-b_1t}$$

Un intento preliminar de ajuste triexponencial no ofreció ninguna mejora en la calidad del ajuste de los datos, según se pudo juzgar aplicando los criterios de Akaike (8). Por lo tanto, el modelo de dos compartimientos (plasma e hígado) con un extremo biliar abierto, descrito por Richards y col. (9) fue considerado fisiológicamente adecuado para el análisis. Las constantes intrínsecas para el transporte de estos compuestos de plasma a hígado (captación hepática, r_{12}), de hígado a plasma (reflujo sinusoidal, r_{21}) y de hígado a bilis (excreción canalicular, r_3) fueron obtenidas como se describió previamente (9), de acuerdo a las siguientes ecuaciones, donde A es la ordenada al origen de la recta de desaparición rápida del colorante, B es la ordenada al origen de la recta de desaparición lenta del colorante, a es la pendiente de la recta de desaparición rápida y b es la pendiente de la recta de desaparición lenta.

$$r_{12} - (A. a + B. \beta) / (A+B)$$

$$r_3 - (a. \beta) / r_{12}$$

$$r_{21} - (a + \beta) - (r_{12} + r_3)$$

Determinación de actividades enzimáticas

Se prepararon los homogenados hepáticos utilizando un homogenizador tipo Potter. La fracción citosólica se obtuvo mediante dos centrifugaciones sucesivas (10.000 g por 10 minutos y 100.000 g por 60 minutos) con buffer conteniendo 0.001 M EDTA; 0.03 M Na_2HPO_4 y 0.25 M de sacarosa (pH 7,4), donde se determinaron las actividades enzimáticas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px).

La actividad enzimática CAT fue determinada por el método de Beers, RF y col. (10), basado en la disminución de la absorbancia entre los 45 segundos y 1 minuto midiendo el consumo del sustrato H_2O_2 a 240nm y la actividad de la enzima GSH-Px midiendo a 340 nm, la cantidad de NADPH consumidos en la reacción, por el método de Paglia y Valentine (11)

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (12) para expresar los resultados por g o mg de proteínas.

Contenido de glutatión hepático

El contenido de glutatión (GSH) se evaluó espectrofotométricamente en homogenados hepáticos preparados con ácido tricloroacético al 5% en HCl 0.01 M por el método colorimétrico de Ellman (13)

Peroxidación lipídica

La lipoperoxidación (LPO) se midió en homogenados de hígado en KCl 1.15 % en la proporción 1:10 en peso, como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando como testigo externo 1,1,3,3-tetrametoxipropano, de acuerdo al método de Ohkawa y col. (14). Los productos resultantes de la reacción entre TBA y el hidrolizado, fueron extraídos con n-butanol y el color fue medido a 532 nm. Los TBARS fueron expresados en términos de niveles de malonildialdehído (MDA) en nmoles / g de tejido húmedo.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron expresados como la media \pm ESM. Las variables fueron analiza-

das en un 2 x 2 factorial ANOVA seguidos por un test LSD. Un valor con $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Luego de realizadas las hepatectomías parciales, no se registraron muertes de los animales de experimentación ni signos evidentes de toxicidad en los 4 grupos experimentales.

La incorporación de ^3H -Timidina al ADN fue usada como medida de la capacidad de regeneración hepática. Se observa un marcado grado de regeneración hepática durante los 2 días post-hepatectomía, alcanzando su máxima expresión al primer día luego de la HP (Fig 1).

La Tabla 1 muestra el efecto de la HP y tratamiento con Vit E en el flujo biliar de animales de experimentación. El análisis de Variancia claramente muestra un significativo efecto de ambas variables ($p < 0.05$). Cuando se analiza el efecto de cada variable individualmente, observamos que la HP reduce significativamente el flujo biliar (FB) (23%). El tratamiento con Vit E, previene la disminución del FB en los animales hepatectomizados y no altera dicho parámetro en los animales que no fueron parcialmente hepatectomizados.

La eficiencia de los diferentes procesos involucrados en la detoxificación hepática de compuestos colefílicos fue estudiada por el análisis farmacocinético del anión orgánico Rosa de Bengala (RB) como se muestra en la Tabla 2. Las constantes de velocidad de captación hepática y de excreción canalicular fueron influenciadas por la HP y por el tratamiento con Vit E. A los 2 días de la HP disminuye tanto la eficiencia de la captación hepática del RB (r_{12} , -63%) como así también su excreción canalicular (r_3 , -83%). El tratamiento con Vit E previene el efecto de la HP en ambas constantes; no obstante no altera sus valores en los animales no hepatectomizados. La constante de reflujo sinusoidal no mostró variaciones por la injuria provocada por la HP ni tampoco por la acción de la Vit E.

La Fig 2 muestra el efecto de la HP y de la Vit E sobre la lipoperoxidación hepática. El grupo HP(+) mostró un grado de lipoperoxidación hepática dos veces mayor al grupo control HP(-). El tratamiento con Vit E previno la acción pro-oxidante de la HP.

El contenido de Glutathion hepático (Fig 3) no muestra efecto por la HP ni por el tratamiento con Vit E.

Las actividades enzimáticas CAT y GSH-Px en homogenados hepáticos de animales hepatectomizados [HP(+)] mostraron una disminución significativa con respecto al grupo HP(-). Cuando analizamos el efecto de la Vit E, observamos una significativa prevención sobre algunos mecanismos claves en la neutralización de los radicales libres en los animales que mostraban un importante estrés oxidativo [HP(+)], y ningún efecto fue observado en los animales bajo condiciones normales [HP(-)] (Fig 4).

Discusión

En trabajos previos ha sido demostrado que animales expuestos a una hepatectomía parcial pueden recuperar el peso normal hepático luego de 7 a 10 días de la cirugía (15). La incorporación de Timidina al ADN, indicador de la regeneración hepática, claramente demuestra que los hígados están regenerándose a lo largo del período experimental hasta alcanzar su tamaño original (16).

Las especies oxígeno reactivas (ROS), como por ejemplo el anión superóxido, peróxido de hidrógeno o radical hidroxilo, son generalmente producidas en el metabolismo de drogas y en otras ocasiones como la injuria hepática producida luego de una hepatectomía parcial (6). Cuando estas ROS no son eficientemente eliminadas, se produce estrés oxidativo con el consiguiente daño celular (17).

En el presente trabajo se confirman resultados previos (18,19), donde hemos demostrado que luego de una hepatectomía parcial se produce un incremento de la lipoperoxidación expresada en términos de niveles de malondialdehído (MDA). Los mecanismos reguladores capaces de contrarrestar las acciones potencialmente tóxicas producidas por los radicales libres originados como consecuencia del daño hepático o pérdida de masa hepática luego de una hepatectomía parcial, pueden no ser suficientes para neutralizar la acentuada lipoperoxidación producida (20,21,22). La Vit E, antioxidante lipofílico que naturalmente se localiza en membranas celulares, es reconocido como el principal antioxidante para proteger los fosfolípidos

de membrana contra el daño oxidativo (LPO) observado en estudios post hepatectomías (6,23) y de este modo, potencialmente prevenir el daño hepatocelular. En nuestro trabajo la Vit E previno el incremento en la lipoperoxidación observada en los animales hepatectomizados, así como fuera también observado por otros investigadores bajo condiciones diferentes (6).

Por otro lado, la Vit E además de proteger los lípidos de membranas, posee otras funciones importantes que contribuyen a preservar el equilibrio dinámico celular, a través del mantenimiento del metabolismo energético (24) o protegiendo proteínas de membrana (25). Si bien los mecanismos, no han sido totalmente dilucidados, la Vit E evitaría los daños sobre proteínas de membrana susceptibles al ataque de las ROS (26,27).

Dentro de los sistemas compensadores capaces de evitar los daños oxidativos, existen mecanismos no enzimáticos y enzimáticos. Entre los mecanismos no enzimáticos el contenido de glutathion celular juega un importante papel en diversos fenómenos biológicos tales como la detoxificación de metabolitos electrofílicos, de xenobióticos y protección contra la acción de radicales libres (28). Así la concentración de GSH disminuye en las células que pierden la capacidad regenerativa, mientras que permanece constante o aumenta durante la diferenciación de los tejidos (29,30). Nuestros resultados coinciden con los antes descritos, mostrando que el contenido de glutathion hepático permaneció constante durante la experiencia.

Las defensas antioxidantes enzimáticas evaluadas en este trabajo, revalidan datos reportados anteriormente (18) donde durante la regeneración hepática se observa una disminución en algunas enzimas con capacidad para contrarrestar el efecto de compuestos oxidantes.

A través de estos estudios, hemos observado que el tratamiento con antioxidantes como la Vit E podría proteger al hígado contra el daño oxidativo a través de mecanismos enzimáticos. Esto fue evidenciado en nuestro trabajo por la normalización en los valores de las enzimas CAT y GSH-Px en los animales hepatectomizados tratados con Vit E.

Por otro lado, la hepatectomía provoca una significativa disminución en las constantes de captación hepática, así como también de excreción canalicular.

Esto podría estar relacionado a que la resección hepática es seguida de un aumento de la proliferación celular, principalmente en el índice mitótico, lo cual disminuye la eficiencia secretora del hígado (31,32). El estrés oxidativo causado por la hepatectomía parcial podría ser una de las causas de esta disfunción secretora hepática de aniones orgánicos colefilicos a través de una alteración en la expresión y/o función de los transportadores involucrados en la captación y excreción de los mismos. Esta hipótesis resulta relevante ya que estos sistemas de transporte implicados en la eliminación de aniones orgánicos son también los sistemas que remueven compuestos potencialmente tóxicos, endo-xenobióticos, incluyendo bilirrubina, sales biliares glucuronizadas y sulfatadas, medicamentos, etc. (32,33). El tratamiento con antioxidante durante la regeneración hepática normalizó el estado funcional de estos dos sistemas

de transporte hepático involucrados en la transferencia a bilis de aniones orgánicos colefilicos.

Otros mecanismos no estudiados por nosotros en este trabajo pueden estar involucrados. Así, recientemente, ha sido demostrado (26), que hepatocitos aislados de ratas con altos niveles de vitamina E inhibieron las alteraciones de grupos tioles proteicos ocasionadas por tratamiento con t-butil hidroperóxido.

Finalmente, sugerimos que el tratamiento con Vit E, antes y durante la regeneración hepática, podría modular el grado de estrés oxidativo y a través de la misma, prevenir las alteraciones en la función transportadora hepática.

Si bien el presente trabajo contribuye al conocimiento de los potenciales efectos protectores de la Vit E en animales hepatectomizados, son requeridos otros estudios para poder esclarecer completamente los mecanismos responsables de esta prevención.

Tabla 1: Flujo biliar en ratas con hepatectomía parcial y tratadas con vitamina E simultáneamente

	HP(-)	HP(+)	HP(-) E(+)	HP(+ E(+)
Flujo biliar (ml/min/ 100g pc)	6.60 ± 0.20 ^a	4.25 ± 0.56 ^b	6.42 ± 0.16 ^a	6.51 ± 0.18 ^a

Nota: El flujo biliar fue recolectado y medido bajo condiciones basales. Los resultados fueron expresados como la media ± ESM (6 animales / grupo). Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

Tabla 2: Efectos de la vitamina E sobre los cambios inducidos por la hepatectomía parcial en las constantes de velocidad derivadas del análisis bicompartamental del decaimiento plasmático del colorante Rosa de Bengala (RB)

	HP(-)	HP(+)	HP(-) E(+)	HP(+ E(+)
r_{12} (min ⁻¹)	0.120 ± 0.008 ^a	0.045 ± 0.007 ^b	0.110 ± 0.009 ^a	0.105 ± 0.009 ^a
r_{21} (min ⁻¹)	0.016 ± 0.001 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.014 ± 0.003 ^a	0.015 ± 0.003 ^a
r_3 (min ⁻¹)	0.029 ± 0.003 ^a	0.005 ± 0.0001 ^b	0.027 ± 0.007 ^a	0.025 ± 0.006 ^a

Nota: Las velocidades intrínsecas de transferencia, r_{12} (captación hepática), r_{21} (eflujo sinusoidal) y r_3 (excreción canalicular) de RB fueron deducidas a partir del análisis de decaimiento plasmático biexponencial de acuerdo a fórmulas estándar para modelo abierto de dos compartimientos. Los resultados fueron expresados como la media ± ESM (6 animales / grupo). Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

Figura 1: Incorporación de ^3H -Timidina al ADN en hígados regenerantes. Los resultados fueron expresados como la media \pm ESM (4 animales / grupo). Valores que no comparten el mismo supraindice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

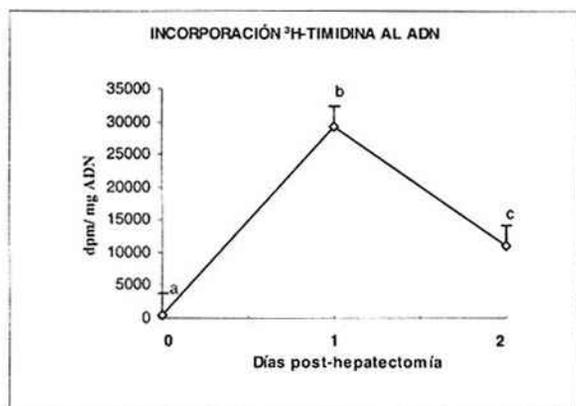


Figura 2: Lipoperoxidación (LPO) en tejido hepático en los grupos de ratas HP(-), HP(+), HP(-)E(+), HP(+E(+). Los resultados fueron expresados como la media \pm ESM (6 animales / grupo). Valores que no comparten el mismo supraindice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

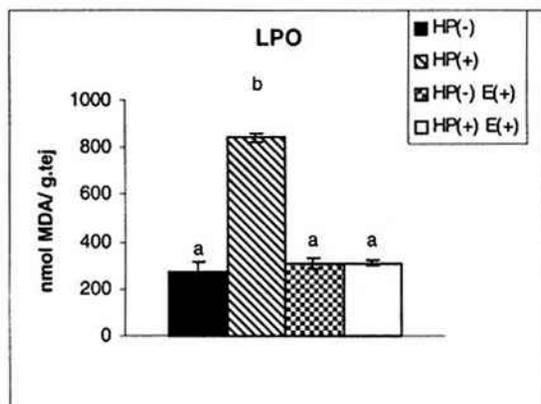


Figura 3: Contenido de Glutacion (GSH) en los grupos de ratas HP(-), HP(+), HP(-)E(+), HP(+)E(+). Los resultados fueron expresados como la media \pm ESM (6 animales / grupo). Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

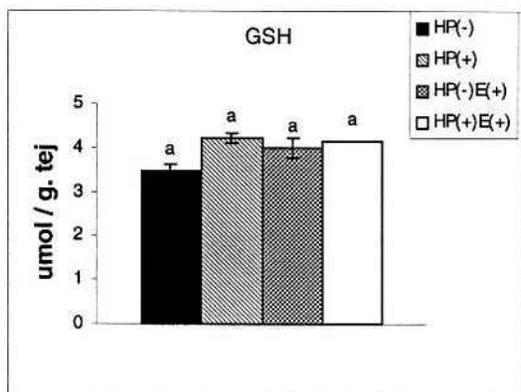
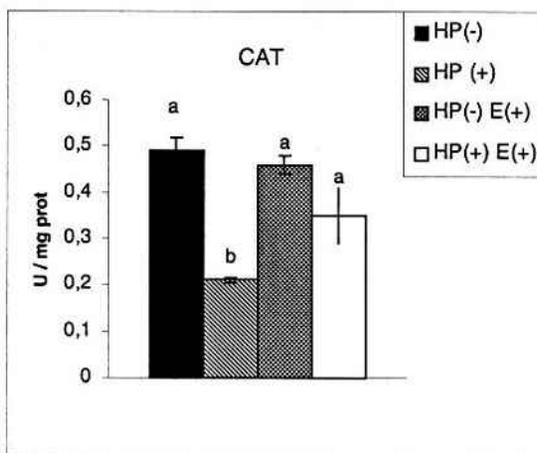


Figura 4: Actividades de las enzimas hepáticas Catalasa (CAT) y Glutacion Peroxidasa (GSH-Px) en los grupos de ratas HP(-), HP(+), HP(-)E(+), HP(+)E(+). Los resultados fueron expresados como la media \pm ESM (6 animales / grupo). Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.



Bibliografía

- 1- Higgins, G. M. and Anderson, R. M. 1931. Arch. Pathol. **12**: 186-202
- 2- Gordon, G; Coleman, W and Gisham, J. 2000. Bax-mediated apoptosis in the livers of rats after partial hepatectomy in the retrorsine model of hepatocellular injury. Hepatology. **32**:312-320.
- 3- Rhoades R. and Tamer G.1980." Fisiología Humana". Ed. Masson-Little Brown, S.A.. 1997. I:613-675
- 4- Shen, H-M; Shi, C-Y; Lee, H-P and Ong, C-N. 1994. "Aflatoxin B1 induced lipid peroxidation in rat liver". Toxicol. Appl. Pharmacol. **127**: 145-150.
- 5- Pinkus, R; Weiner, L and Daniel, V;. 1997. "Role of antioxidants and oxidants in the induction of ap-1, NFIB, and the glutation s-transferase gene expresión. J.Biochem. Chem. **271**: 13422-13429.
- 6- Ronco, MT; Alvarez, ML; Monti, J; Carrillo, MC; Pisani, G; Lugano, MC and Carnovale, CE. 2002. "Modulation of balance between apoptosis and proliferation by lipid peroxidation during rat liver regeneration". Molecular Medicine. **8**: 808-817.
- 7- Burton, GW and Traber, MG.1990. "Vitamin E, Antioxidant Activity, Biokinetics and Bioavailability".Ann. Rev. Nutr. **10**: 357.
- 8- Yamaoka, K; Nakagawa, T and Uno, T.1978. "Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. J Pharmacokinet Biopharm. **6**: 165-175.
- 9- Richards, TG; Tindell, VR and Young, A. 1959. A modification of the bromosulphthalein liver function test to predict the dye content of the liver and bile.Clin Sci. **18**: 499-511.
- 10- Beers, RF; and Sizer, LW. 1952. "A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. **195**:133-140.
- 11- Paglia, D.E and Valentine W.N. 1967."Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase". J. Lab. Clin. Med. **70**: 158-169
- 12- Lowry, O. H. Rosobrough, N. J., Farr , A. L. And Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Biol. Chem. **193**: 265- 275.
- 13- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archs Biochem. Biophys. **82**: 70- 73.
- 14- Ohkawa, H; Ohishi, N; and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. **95** : 351-358
- 15- Oleaga, A; González, J; and Esteller, A. 1987. " Effects of two-thirds hepatectomy on sulfobromophthalein handling by the rat liver Comp Biochem Physiol **87** :13-19
- 16- Carnovale, CE; Monti, JA; Favre, C; Scapini, C; and Carrillo, MC.1995 "Is intestinal cytosolic glutathione S-transferase an alternative detoxification pathway in two-thirds hepatectomized rats?"Life Sci, Jan; **57** (9): 903-10.
- 17- Halliwell, B and Gutteridge, JMC. 1989. Free radicals in biology and medicine, 2^{da} edn. Clarendon Press, Oxford New York.
- 18- González, MA; Contini, MC; Mahieu, S; Carrillo, MC and Bernal, C. 2004. Efecto de la exposición crónica al aluminio sobre indicadores de estrés oxidativo en hígados regenerantes. FABICIB. **8** : 153-161.
- 19- Carnovale, CE; Scapini, ML; Alvarez, C; Favre, J; Monti, J and Carrillo, MC. 2000. Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regenerating rat liver. J. Hepatol. **32**: 798-804.
- 20- Alexandris, IH; Assimakopoulos SF; Vagianos, CE; Patsukis, N; Georgiou, C; Mikolopoulou, V and Scopa, CD. 2004. Oxide state in intestine and liver after partial hepatectomy in rats. Effect of bombesin and neurotensin. Clin. Biochem. **37**: 350-356.
- 21- Horvát, M; Gonzalez-Cabello, R; Blázovics, A; Van der Looij, M; Barta, I; Muzes, G; Gergely, P and Feher, J. 2001. Effect of silibinin and vitamin E on restoration of cellular immune response after partial hepatectomy. J. Ethnopharmacol. **77** : 227-232.
- 22- Factor, V; Laskowska, D; Rugaard, Jm and Thorgeirsson Snorri, S. 2000. Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembrane potencial and of the cytosolic release of cytochrome c occurring during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. Free Radic. Biol. Med. **28** :743-753.
- 23- Niki, E. 1991. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. Am. J. Clin. Nutr. **54** : 1119S-1124S.
- 24- Ray, SD and Fariss, MW. 1994. Role of cellular energy status in tocopheryl hemisuccinate cytoprotection against ethyl methanesulfonate-induced toxicity. Arch. Biochem. Biophys. **311** : 180-190.
- 25- Dean, RT; Hunt, JV; Grant, AJ; Yamamota, Y and Niki, E. 1991. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. Free Radic. Biol. Med. **11**: 161-168.
- 26- Jyh-Huang, K; Haw-Wen, Ch; Rong-Ghi, R et al.1997. Vitamin E protection of cell morphology under oxidative stress is related to cytoskeletal proteins in rat hepatocytes.**71** : 231-237.
- 27- Sohal, RS; and Allen, RG.1990. Experimental Gerontology. **25** : 499.

- 28- Uesegi, T; Bognacki, J; and Levine, WG. 1976. "Biliary excretion of drugs in the rat during liver regeneration. *Biochem. Pharmac.* **25** : 1187-1193
- 29- Aguilar-Delfin, I; Lopez-Barrera, F and Hernandez-Muñoz, R. 1996. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrana in two experimental models for liver regeneration: partial hepatectomy and a cute CCl4 administration. *Hepatology.* **24** : 657-662.
- 30- Kanashima, R; Nagasue, N ;Furusawa, M and Inokuchi, K. 1983." Inhibitory effect of cimetidine on liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats". *An J Surg* **146** : 293-298
- 31- Tanaka, Y; Nagasue, N; Kanashima, R; Inokuchi, K ;and Shirota, A.1982. " Effect of doxorubicin on liver regeneration and host survival after two-thirds hepatectomy in rats ". *Cancer* **49**: 19-23
- 32- Takikama, H. 2002." Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions". *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **9** : 443-447.
- 33- Factor, VM; Laskowska, D, Michael RJ, Joseph T. Weitach, Nicholas C. Popescu and Snorri, S. Thorgeirsson.2000."Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model". *PNAS*; **97**: 2196 - 2201.