

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Medicina
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Farmacología Molecular y Clínica

INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE PARAMETROS DE ESTRES OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA.

Trabajo de investigación presentado en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de
Tecnólogo Médico. Mención: Laboratorio Clínico, Hematología y Banco de sangre.

Pamela Cornejo Zamorano.

Tutoras: Dra. Virginia Fernández A. Dra. Gladys Tapia O.

CALIFICACIONES . .	1
..	7
LISTA DE ABREVIATURAS .	9
RESUMEN .	11
INTRODUCCIÓN .	13
1.- Aspectos generales del estrés oxidativo hepático. .	13
2.- El estrés oxidativo hepático en el hipertiroidismo. .	15
3.- Efecto del hipertiroidismo sobre la NOS hepática .	17
4.- Aspectos generales del almacenamiento y transporte de hierro .	18
5.- Algunas alteraciones en el metabolismo del hierro . .	18
6.- Propuesta experimental .	20
HIPOTESIS .	23
OBJETIVO GENERAL . .	25
OBJETIVOS ESPECIFICOS .	27
MATERIALES Y MÉTODOS .	29
1.- Animales de experimentación .	29
2.- Tratamiento de los animales . .	30
3.- Evaluación del estado hipertiroidico .	30
4.- Evaluación de los niveles séricos y hepáticos de hierro. .	31
5.- Evaluación de los parámetros de estrés oxidativo hepático. .	31
5.1.-Evaluación de la lipoperoxidación hepática .	31
5.2.-Evaluación de la oxidación de proteínas hepáticas .	31
6.-Medición de la actividad de la NOS hepática . .	32
6.1.-Preparación del homogeneizado hepático .	32
6.2.-Medición de la síntesis de •NO .	32
7.- Determinación de proteínas .	33
8.- Reactivos .	33

9.- Tratamiento estadístico de los datos experimentales .	33
RESULTADOS . .	35
1.- Parámetros generales en animales control y tratados. .	35
2.- Evaluación de la condición hipertiroídea. . .	35
3.- Evaluación de los niveles séricos y hepáticos de hierro . .	37
4.- Evaluación de parámetros de estrés oxidativo hepático . .	39
4.1.-Evaluación de la lipoperoxidación hepática .	39
4.2.- Evaluación de la oxidación de proteínas hepáticas . .	40
5.- Evaluación de la actividad de la NOS hepática . .	41
DISCUSION .	45
1.- Efecto del hipertiroidismo y una sobrecarga aguda de hierro sobre parámetros de estrés oxidativo. .	45
2.- Efecto del hipertiroidismo y una sobrecarga aguda de hierro sobre la actividad de la NOS hepática. .	47
3.- El •NO puede actuar como un agente prooxidante o como un agente protector a nivel hepático. . .	48
CONCLUSIONES . .	51
FINANCIAMIENTO .	53
BIBLIOGRAFIA .	55

CALIFICACIONES



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

EVALUACIÓN FINAL

La Tesis Profesional para obtener el Título Profesional de Tecnólogo Médico en la Mención Bioanálisis Clínico, Hematología y Banco de Sangre, titulada: "INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA", así como el desempeño de la alumna que la realizó, Sra. Pamela Cornejo Zamorano, ha sido calificado con nota final 7,0 (siete punto cero).

M. Soledad Herms
Prof. T. M. Soledad Herms
Presidente Comité Académico
de Tesis Profesional



M. Soledad Herms
Prof. T. M. Soledad Herms
Directora
Escuela de Tecnología Médica

Santiago, Septiembre 27 de 1999

**INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE
PARAMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA.**

Santiago, 23 de Julio de 1990


Prof. T.M.
Salvador Berríos
Presidenta Comité Académico
de Tesis Profesional
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Presente

Estimada Prof. Berríos:

Por intermedio de la presente hago llegar a Ud la evaluación del desempeño de la alumna Sra PAMELA CORNEJO ZAMORANO durante el desarrollo de su Tesis Profesional.

La Sra Cornejo desarrolló el proyecto "INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE PARAMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA", y durante todo el período de trabajo su desempeño fue excelente, por lo cual la calificación que le corresponde es una nota siete (7).

Saluda atentamente a Ud


Prof. Gladys Talpa O.
Tutor Tesis Profesional
Programa de Farmacología
Molecular y Clínica
ICBM

c.c. Prof. T.M. Puricío Vega, Director Escuela de Toxicología Médica

Santiago, 13 de Julio de 1999

Prof. T.M.
Salvador Berríos
Presidente Comité Académico
de Tesis Profesional
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Presente:

Estimado Prof. Berríos:

Por intermedio de la presente hago llegar a Ud la evaluación del desempeño de la alumna Sra PAMELA CORNEJO ZAMORANO durante el desarrollo de su Tesis Profesional.

La Sra. Cornejo desarrolló el proyecto "INFLUENCIA DEL HIPERTRIGLICIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE PARAMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA", y durante todo el período de trabajo su desempeño fue excelente, por lo cual la calificación que le corresponde es una nota siete (7).

Saluda atentamente a Ud



Dra. Virginia Fernández A.
Tutor Tesis Profesional
Programa de Farmacología
Molecular y Clínica
ICBM

c.c. Prof. T.M. Patricio Vega, Director Escuela de Tecnología Médica

**INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE
PARAMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA.**



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA - ICSM
PROGRAMA DE FARMACOLOGIA MOLECULAR Y CLINICA
Casilla 70.000 - Santiago 7 - CHILE - FAX: (562) 2344 1177

Santiago, 16 de Agosto de 1999.

Prof. Y.M. Soledad Berríos
Presidente Comité Académico
De Teoría Profesional
Presente

Estimada Prof. Berríos:

Con mucho agrado e interés he tenido el gusto de leer tanto el Proyecto, como la versión final del Trabajo de Investigación "Influencia del hipertiroidismo y una sobrecarga aguda de hierro sobre parámetros de estrés oxidativo y hepatotoxicidad en la rata", realizado por la alumna Pamela Cornejo Z., de la mención Bionálisis Clínico de la Carrera de Tecnología Médica.

Estimo que la realización de este trabajo constituye un valioso aporte al conocimiento del efecto sinérgico producido por dos condiciones, que si bien son experimentales, tienen una clara proyección clínica. Junto a lo anterior, la calidad de la metodología empleada y la claridad en la presentación de los resultados, me permiten si lo expone mis felicitaciones a la alumna y un reconocimiento especial a las Tareas, Dnas. Fernández y Tapia. Asimismo, espero que a la brevedad los apuntes derivados de este trabajo se vean referendados en una publicación científica.

Por lo anteriormente expuesto, me permito calificar este Trabajo de Investigación con nota siete (7,0).

Sin otro particular, saluda atentamente a usted,

Eduardo Guzmán C.
PROFESOR ASISTENTE
Programa de Farmacología
Molecular y Clínica
Instituto de Ciencias Biomédicas

Santiago, 22 de Septiembre de 1999.

Sra. Soledad Berrios,
Presidenta Comité Académico
de Tesis Profesional.
Presenta.

Estimada Sra. Berrios:

Después de revisar la Tesis Profesional de la Sra. Pamela Cornejo Z., titulada "Influencia del hipertiroidismo y una sobrecarga aguda de hierro sobre parámetros de estrés oxidativo y hepatotoxicidad en la rata", cumpla con emitir mi informe.

Aparte de una impecable presentación, esta Tesis está muy bien realizada tanto en la forma como en el fondo. Cumple con los objetivos propuestos y discute los resultados en forma adecuada. Por estas razones la apruebo con la nota máxima (7).



Myriam Corollana Bawn.

ICBM, Programa de Farmacología Molecular y Clínica,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70016, Santiago 7, Chile.
Phone (56)-(2) 6796666. Fax (56)-(2) 9355885. e-mail: morellan@mach.med.uchile.cl

Dedicada a mis padres, a mi hermana y a Omar...

LISTA DE ABREVIATURAS

BH4	: tetrahidrobiopterina
DNPH	: 2, 4 dinitrofenilhidrazina
EDTA	: ácido etilendiaminotetracético
EROS	: especies reactivas derivadas del oxígeno
FAD	: dinucleótido de flavina y adenina oxidado
FMN	: mononucleótido de flavina
GdCl3	: cloruro de gadolinio
GSH	: glutatión reducido (gamaglutamil-cisteinil-glicina)
Hepes	: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2 etanolsulfónico
HO·	: radical hidroxilo
H2O2	: peróxido de hidrógeno
i.p.	: intraperitoneal
MDA	: malondialdehído
NADPH	: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
·NO	: óxido nítrico
NOS	: óxido nítrico sintasa
O2	: oxígeno molecular
O2 ·-	: radical superóxido
ONOO-	: peroxinitrito

PMSF

: difenilmetilsulfonilfluoruro

QO2

: consumo de oxígeno

RR

: respuesta respiratoria

S.E.M.

: error estándar de la media

SOD

: superóxido dismutasa

TBA

: ácido tiobarbitúrico

TBARS

: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA

: ácido tricloroacético

T3

: L-3, 3', 5 triiodotironina

RESUMEN

El estrés oxidativo es un desbalance entre la velocidad de generación de especies prooxidantes y su velocidad de consumo por los sistemas de defensa antioxidante, en favor de los primeros, constituyendo un importante mecanismo inductor de citotoxicidad. El hipertiroidismo y la sobrecarga aguda de hierro son dos condiciones que inducen estrés oxidativo hepático en la rata. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la asociación del hipertiroidismo experimental con la sobrecarga aguda de hierro y su efecto sobre parámetros de estrés oxidativo hepático. Se utilizaron seis grupos experimentales: (a) controles, (b) tratados por 1 día con L-3, 3',5 triiodotironina (T_3 , 0.1 mg/Kg de peso), (c) tratados con T_3 por 2 días consecutivos, (d) tratados con hierro-dextrano (200 mg/Kg de peso por 4 horas), (e) tratados conjuntamente con T_3 1 día y hierro, y (f) tratados con T_3 2 días y hierro.

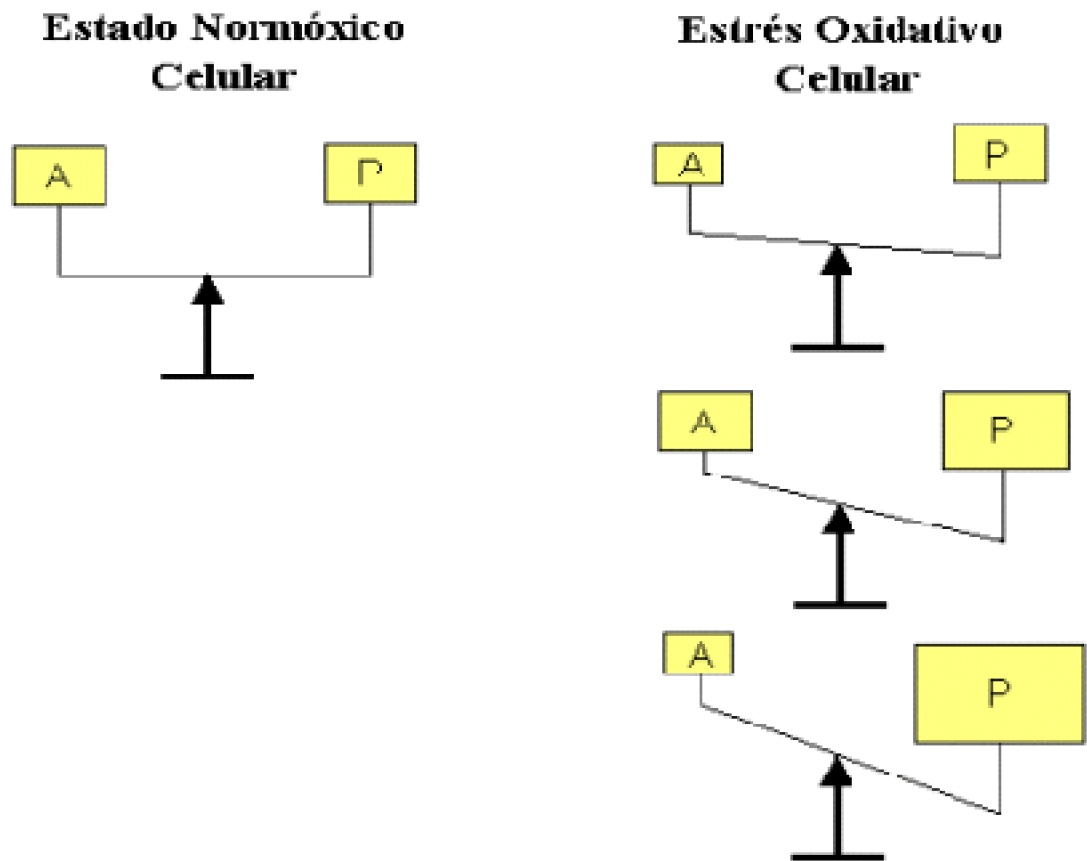
La administración de T_3 produjo un aumento progresivo en los niveles séricos de la hormona, y paralelamente se produjo una respuesta calorigénica, aumentando la temperatura rectal y el consumo de oxígeno hepático de los animales, efectos que no fueron alterados por el tratamiento con hierro. Por otra parte, la administración de hierro produjo incrementos significativos en los niveles séricos y hepáticos del metal, que no fueron afectados por el tratamiento con T_3 . El tratamiento con T_3 por 1 y 2 días consecutivos produjo un aumento en la lipoperoxidación hepática, medida por la velocidad de formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (396 y 317 %, respectivamente). La administración de hierro a ratas eutiroideas y a ratas hipertiroideas (1 y 2 días de T_3) también produjo un aumento en este parámetro (348, 489 y 217 %, respectivamente). El tratamiento con hierro aumentó la oxidación de proteínas hepáticas, medida por el contenido de derivados carbonilos en un 210 %. Con respecto a la evaluación de la actividad de la óxido nítrico sintasa hepática, la administración de T_3 por 2 días y la administración de hierro produjeron incrementos significativos en la actividad de esta enzima (63 y 103 %, respectivamente) y la administración de hierro a ratas hipertiroideas (1 y 2 días de T_3) produjo un efecto sinérgico, en relación a lo observado con ambos tratamientos por separado. Se concluye que la asociación del hipertiroidismo experimental con la intoxicación aguda con hierro en la rata induce una potenciación de la actividad de la óxido nítrico sintasa.

INTRODUCCIÓN

1.- Aspectos generales del estrés oxidativo hepático.

Debido a la naturaleza aeróbica del metabolismo celular, se generan especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. La interacción de estas especies con biomoléculas esenciales, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, conducen a alteraciones en su estructura y función (Tapia, 1996). Por otro lado, los sistemas biológicos poseen mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. En los mecanismos enzimáticos participan la superóxido dismutasa (SOD) e hidroperoxidasas, como la catalasa, la glutatión peroxidasa y otras peroxidasas hemoproteicas (Fernández y col, 1996). Los sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos incluyen a moléculas hidrofílicas, como el glutatión reducido (GSH) y el ácido ascórbico (vitamina C) y a moléculas lipofílicas, como el α -tocoferol (vitamina E) y los carotenoides (β -caroteno y licopeno) (Fernández y col, 1996). Estos mecanismos de defensa antioxidante se complementan con los sistemas celulares de reparación y reemplazo, que en forma coordinada y acoplados al metabolismo intermediario, logran mantener un nivel bajo de especies prooxidantes, compatible con la vida celular aeróbica (Fernández y col, 1996). Cuando se produce un desbalance entre la velocidad de generación de especies prooxidantes y su velocidad de consumo por los sistemas de defensa antioxidante, en favor de los primeros, se establece una condición de estrés

oxidativo, la cual puede conducir al daño y muerte celular (Sies, 1986). La intensidad del estrés oxidativo dependerá del tipo de mecanismo alterado y de la magnitud del cambio producido, pudiendo ser condicionado por una disminución de los mecanismos de defensa, un incremento en la generación de especies prooxidantes, o ambos a la vez (Tapia, 1996) (Esquema 1).



Esquema 1. Concepto de estrés oxidativo.

Balace entre los mecanismos celulares de defensa antioxidante (A), y las especies prooxidantes (P) que determinan el estado normóxico celular. El estrés oxidativo resulta de un desbalance en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor de las especies prooxidantes, conduciendo a daño celular.

En el hígado, el estrés oxidativo constituye un importante mecanismo inductor de citotoxicidad, a través de distintos mecanismos moleculares, que dependen del agente causal y que involucran aumentos en el nivel de especies prooxidantes y la disminución de antioxidantes. Diversos xenobióticos, tales como el etanol, el lindano, el acetaminofeno y otros, además de algunos estados patológicos como el hipertiroidismo y el aumento del depósito intracelular de hierro, pueden provocar una condición de estrés oxidativo hepático (Videla y col., 1988). Los mecanismos involucrados en esta condición se desencadenan principalmente en los hepatocitos, sin embargo las células no parenquimáticas como las células endoteliales y las células de Kúpffer, también contribuyen a la generación de especies prooxidantes. Estas últimas, al ser estimuladas, manifiestan su función fagocítica y respuesta respiratoria (RR), que corresponde a un

aumento del consumo de oxígeno principalmente asociado a la actividad de la NADPH oxidasa (Tapia, 1996), constituyendo así una fuente alternativa de especies reactivas, que aumentan la susceptibilidad del hígado a procesos citotóxicos (Tapia y col., 1997; Tapia y col., 1998).

2.- El estrés oxidativo hepático en el hipertiroidismo.

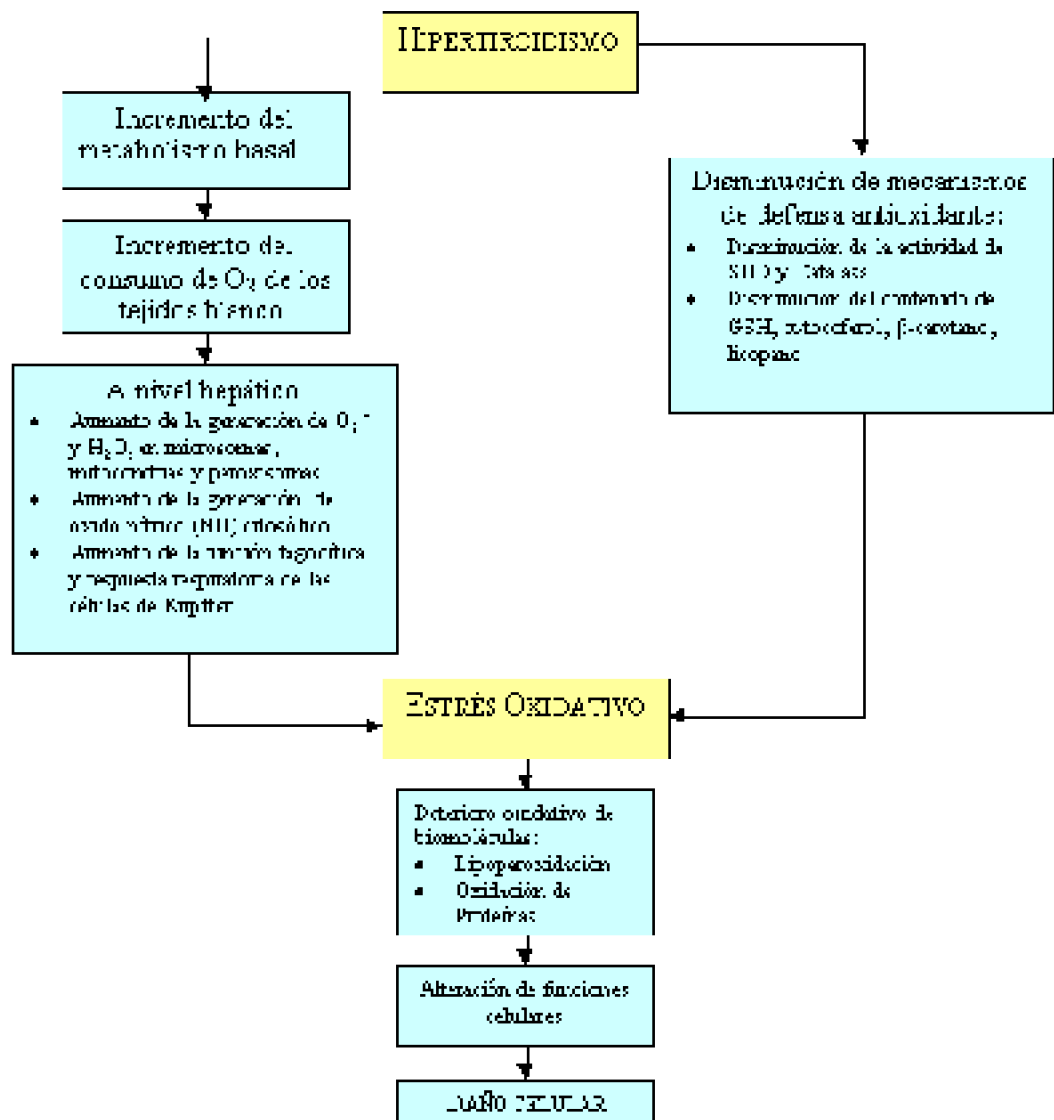
Las hormonas tiroideas desempeñan un rol esencial en la mantención del metabolismo energético en el organismo. La L-3, 3', 5 triiodotironina (T_3) interactúa con receptores ubicados en la membrana plasmática como también con receptores ubicados en la membrana interna mitocondrial, siendo responsables estas interacciones de los efectos tempranos de la hormona tiroidea (dentro de 6 hrs). Las interacciones de la T_3 con receptores nucleares son las que gatillan los efectos más tardíos de la hormona (después de 24 hrs) (Oppenheimer y col., 1996) y conducen a la expresión de actividades enzimáticas relacionadas, entre otras, con el desencadenamiento de diversos procesos de oxidoreducción (Fernández y col., 1997). El desarrollo de un estado hipertiroideo en mamíferos conduce a un aumento significativo de su metabolismo basal, caracterizado por un aumento en el consumo total de oxígeno de los tejidos blanco, efecto conocido como calorigénesis tiroidea (Oppenheimer y col., 1996). La inducción de hipertiroidismo experimental en la rata por la administración de dosis diarias de T_3 (0,1 mg/Kg de peso), produce incrementos en la actividad de enzimas hepáticas involucradas en procesos de oxidoreducción. A nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal, aumenta la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROS), como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y/o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y a nivel citoplasmático aumenta la generación de especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERNS), como el óxido nítrico ($\cdot NO$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Fernández y col., 1985; Fernández y col., 1993; Fernández y col., 1997). Concomitantemente con este incremento en la generación de EROS y de ERNS, se produce una importante disminución de la actividad de algunos sistemas de defensa antioxidante, como la SOD, la catalasa y los contenidos totales de equivalentes de GSH (Fernández y col., 1988; Fernández y col., 1991), de α -tocoferol, de licopeno y de b-caroteno (Simon y col., 1998). Este aumento en el nivel de las moléculas prooxidantes junto a la disminución de la actividad antioxidante, condicionan un estrés oxidativo hepático que conduce a daño celular, mediante un incremento en la respuesta lipoperoxidativa (Fernández, 1992), acompañado de alteraciones de diversas funciones hepáticas (Esquema 2) y potenciación de la toxicidad inducida por algunos xenobióticos (Videla y col., 1995) (Esquema 2). Se ha descrito que el hipertiroidismo en la rata aumenta el estrés oxidativo y la injuria hepatocelular, inducidos por la intoxicación con lindano, lo que señala una potenciación de los efectos de T_3 y lindano (Videla y col., 1995).

Se ha observado además que el hipertiroidismo experimental conduce a un aumento significativo en la función de las células de Kúpffer, asociado a incrementos tanto en la RR como en el número de estos macrófagos hepáticos, evidenciado histológicamente

(Tapia y col., 1997) (Esquema 2). Esta modificación de las células de K upffer conduciría la inducción de enzimas relacionadas con procesos de oxidoreducción, tales como la NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintasa (NOS), por lo cual estas células constituirían una fuente alternativa para la generación de especies prooxidantes, como la que se evidencia en el hipertiroidismo experimental (Tapia y col., 1997). En esta condición podría existir un incremento en la susceptibilidad del hígado a los efectos tóxicos de distintos agentes injuriantes (Tapia y col., 1997).

Además de los efectos que provoca el estado hipertiro deo a nivel hepático, se han observado alteraciones de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en diferentes tejidos extrahepáticos, tales como el músculo esquelético, el corazón (Asayama y col., 1987), los nódulos linfáticos mesentéricos (Pereira y col., 1994) y el cerebro de ratas recién nacidas (Adamo y col., 1989).

En el hombre, el hipertiroidismo conlleva a un aumento en algunos indicadores de lipoperoxidación asociados al estrés oxidativo, tanto a nivel circulante como urinario, el cual es eliminado luego de una terapia antitiro dea (Videla y col., 1988; Wilson y col., 1989; Lissi y col., 1992 (1)).



Esquema 2. Hipertiroidismo y estrés oxidativo celular.

El estado hipertiroideo en vertebrados, aumenta el metabolismo basal, evidenciado por un aumento en la velocidad de consumo de O_2 (QO_2) en los tejidos blancos. Este aumento en el QO_2 lleva a un incremento en la generación de especies reactivas del O_2 , y junto a esto se produce una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante, lo que condiciona un estado de estrés oxidativo, que conduce a daño celular.

3.- Efecto del hipertiroidismo sobre la NOS hepática

El óxido nítrico ($\bullet NO$) es un radical libre inorgánico que actúa como factor de relajación endotelial, participando además como neurotransmisor en el sistema nervioso central (Zentella y col., 1996) y en la respuesta fagocítica de algunos macrófagos (Knowles, 1994). La síntesis de $\bullet NO$ es catalizada por la NOS, para la cual se han descrito tres

isoenzimas presentes en diferentes tipos de células. Las isoenzimas nNOS, presente en tejido neuronal y eNOS, presente en células endoteliales vasculares, son constitutivas y dependientes de calcio. La isoenzima iNOS, identificada en macrófagos, hepatocitos y células de pulmón, es inducible por endotoxinas o citocinas y es independiente de calcio (Knowles y col., 1990; Knowles y col., 1994). La síntesis hepática de •NO es catalizada por una iNOS y ocurre en hepatocitos, en células endoteliales y en células de Kúpffer donde se ha descrito una baja actividad (Knowles y col., 1990; Fernández y col., 1997). Para la síntesis de •NO la NOS utiliza L-arginina y NADPH, generando •NO y citrulina. Esta reacción requiere además de oxígeno, cuatro cofactores [Protoporfirina IX, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (BH₄)] y la presencia de calmodulina (Knowles y col., 1994).

Utilizando el modelo de hipertiroidismo experimental en la rata, se ha observado que la administración de dosis diarias de T₃ provoca un aumento progresivo y significativo en la actividad de la NOS hepática, luego de 2 (47%) y 3 (70%) días de tratamiento, efecto reversible cuando se suspende el tratamiento (Fernández y col., 1997). El pretratamiento de los animales con cloruro de gadolinio (GdCl₃), supresor específico de las células de Kúpffer (Hardonk y col., 1992), disminuye parcialmente (20%) la activación de la NOS, lo que indicaría la participación de dichos macrófagos, además de los hepatocitos, en el aumento de la actividad de la NOS hepática inducida por T₃ (Fernández y col., 1997).

Un aumento significativo en la generación de O₂^{-•}, asociado al incremento en la producción de •NO, conducirían a la formación del poderoso agente oxidante peroxinitrito (ONOO⁻) (Beckman y col., 1994). Esto contribuiría al incremento en la condición prooxidante hepática, además de las EROS generadas en los hepatocitos y células de Kúpffer en el hipertiroidismo experimental (Fernández y col., 1985; Fernández y col., 1993; Tapia y col., 1997).

4.- Aspectos generales del almacenamiento y transporte de hierro

El hierro es un metal de transición, químicamente reactivo y potencialmente tóxico, constituyente esencial del organismo. Entre el 70-90 % del total de hierro presente en el organismo, se encuentra formando parte de la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos y enzimas dependientes de hierro. Entre el 10 y el 30 % del total del hierro almacenado se encuentra en el hígado, el bazo, la médula ósea y el músculo, en forma férrica (Fe⁺³) unido a ferritina y hemosiderina, formas no tóxicas para el organismo. Un pequeño porcentaje de hierro ferroso (Fe⁺²) circula en el plasma unido a una proteína transportadora, la transferrina, constituyendo otra forma no tóxica para el organismo (Britton y col., 1987; Searle y col., 1987).

5.- Algunas alteraciones en el metabolismo del hierro

Existen alteraciones en que se produce un aumento en el depósito de hierro en algunos tejidos, entre las cuales se encuentran defectos primarios como la hemocromatosis, y defectos secundarios, como la beta-talasemia, la anemia sideroblástica, la cirrosis alcohólica y la sobrecarga transfusional de hierro (Bacon y col., 1990). En estas condiciones, el hierro puede promover la formación de radicales libres mediante las reacciones de Fenton [$\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$] y de Haber-Weiss [$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$] que es catalizada por Fe^{+2} , con la generación de radical hidroxilo (HO^\bullet) (Aust y col., 1985). Este potente agente oxidante puede provocar daño oxidativo a biomoléculas esenciales, como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, así como alteraciones funcionales de organelos subcelulares, con pérdida de la viabilidad celular (Britton y col., 1987; Aust y col., 1985; Britton, 1996). Estas alteraciones se han observado en los distintos tejidos que almacenan hierro, principalmente en el hígado donde se deposita un tercio del exceso del hierro circulante (Searle y col., 1987), el cual se distribuye en los hepatocitos (98 %) y en las células de Kupffer, células endoteliales, lipocitos, y fibroblastos (2%) (Searle y col., 1987). En las dos mayores alteraciones del metabolismo del hierro (hemocromatosis genética y beta-talasemia), el hierro se deposita principalmente en las células parenquimáticas del hígado, mientras que en la sobrecarga transfusional de hierro, éste se almacena principalmente en las células del sistema retículo endotelial (Halliday y col., 1996).

En pacientes que tienen una sobreacumulación de hierro, se ha observado fibrosis y cirrosis hepáticas (Searle y col., 1987; Britton y col., 1987; Halliday y col., 1996). Los efectos hepatotóxicos de la sobreacumulación de hierro pueden ser causados por un aumento en la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de membranas de los diferentes organelos, ya que se observa un incremento en el contenido hepático de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) o de los conjugados diénicos y en la producción de etano en homogeneizados hepáticos, fracciones mitocondrial y microsomal, en hepatocitos aislados (Ungemach, 1985) o *in vivo* (Tapia y col., 1998). Este efecto lipoperoxidativo conduciría a un aumento en la fragilidad lisosomal, con alteraciones en la integridad y fluidez de membrana, liberándose enzimas hidrolíticas al citosol que causan daño celular (Britton, 1996). A nivel microsomal se produce una disminución en la concentración de citocromo P-450. En las mitocondrias se ha observado una disminución en la actividad respiratoria, asociada a una significativa disminución en la actividad de la succinato citocromo-c-reductasa y de la citocromo oxidasa (Britton, 1996). Esta última se afectaría, ya que es dependiente de cardiolipina, un fosfolípido con un alto porcentaje de ácidos grasos poli-insaturados susceptibles a la lipoperoxidación (Bacon y col., 1990). A pesar que se ha observado una asociación entre la sobreacumulación de hierro y la lipoperoxidación, no se conocen los mecanismos mediante los cuales el hierro iniciaría este proceso *in vivo* (Britton, 1996). En condiciones de sobreacumulación, se ha postulado que el hierro presente en las proteínas de almacenamiento ferritina y transferrina, sería el responsable de iniciar el daño peroxidativo, ya que más del 99% del exceso de hierro se acumula en estas proteínas (Bacon y col., 1990). Estudios *in vitro* han demostrado que tanto el Fe^{+3} de la ferritina como el de la hemosiderina pueden estimular la lipoperoxidación a pH neutro al adicionar agentes reductores, como el ascorbato y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, los cuales reducirían el Fe^{+3} a Fe^{+2} , con la consecuente liberación de Fe^{+2} , el cual provocaría las reacciones de Fenton y

Haber-Weiss y la generación de HO• (Bacon y col.,1990). A nivel intralisosomal, el hierro de ambas proteínas también estimula la lipoperoxidación, en ausencia de agentes reductores, y este efecto es inhibido por agentes quelantes de hierro (Bacon y col., 1990). A pesar de lo que se ha encontrado *in vitro*, no se sabe si estos mecanismos ocurren *in vivo* (Bacon y col., 1990).

Aparte de los efectos descritos, en la sobreacumulación de hierro se produce una disminución en los niveles de algunos antioxidantes, alteraciones en la homeostasis del calcio, reducción de los niveles de ATP, y daño al DNA, lo que contribuye al daño hepatocelular que se produce (Britton, 1996).

Estudios realizados en fibroblastos humanos sugieren un rol fibrogénico para el hierro, ya que la lipoperoxidación inducida en condiciones de sobreacumulación del metal, aumenta la transcripción del gen que codifica para el colágeno estimulando la biosíntesis de esta proteína, lo que podría conducir al desarrollo de fibrosis hepática (Bacon y col., 1990; Pietrangelo y col., 1994) (Esquema 3).

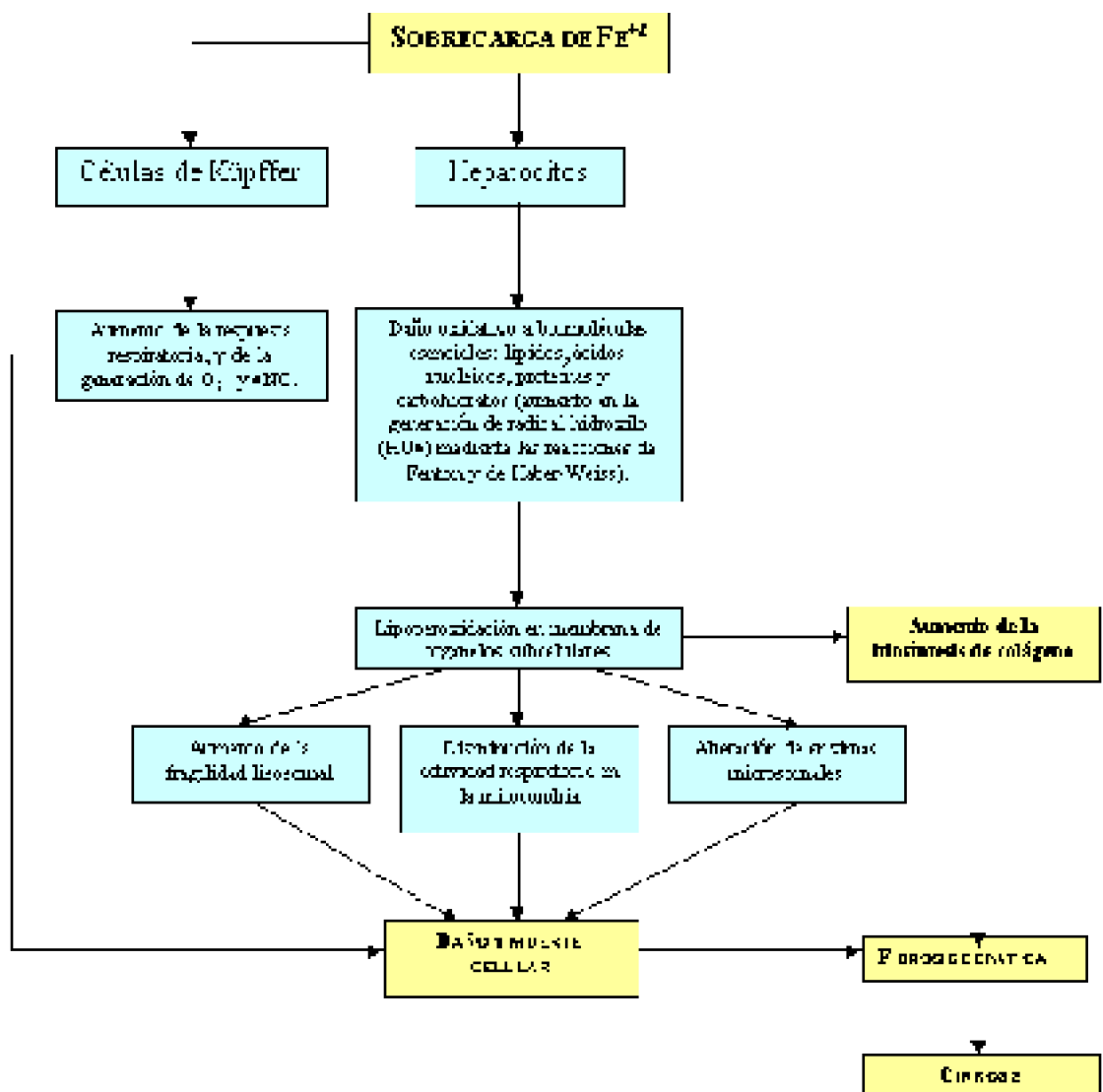
Además se ha observado que la sobrecarga de hierro produce alteraciones en la función de las células de Kúpffer, aumentando la RR por aumento en la actividad de la NADPH oxidasa y de la NOS, con la generación de O₂⁻ y •NO, respectivamente (Tapia y col., 1998).

La intoxicación aguda con hierro en la rata, en dosis de 200 mg/Kg, produce un aumento significativo en el índice de estrés oxidativo hepático (TBARS/GSH), observándose un aumento de 670% luego de 4 hrs del tratamiento, indicando que esta sobrecarga de hierro representa una condición prooxidante para el hígado de la rata, que podría contribuir a la hepatotoxicidad inducida en esta condición (Boisier y col., 1997).

Además del daño que provoca la sobrecarga de hierro a nivel hepático, se ha observado apoptosis o necrosis celular en el corazón, el bazo y el páncreas (Whittaker y col., 1996).

6.- Propuesta experimental

Con estos antecedentes, se estudió la posible interacción de los mecanismos productores de estrés oxidativo hepático, en el hipertiroidismo experimental y en la intoxicación aguda con hierro, en relación a parámetros de estrés oxidativo (lipoperoxidación y oxidación de proteínas), como también a la actividad de la NOS hepática.



Esquema 3. Sobrecarga de hierro y daño celular a nivel hepático.

HIPOTESIS

La interacción de los mecanismos de estrés oxidativo hepáticos que subyacen en el hipertiroidismo y en la sobrecarga aguda de hierro en la rata, condicionan un aumento en parámetros de estrés oxidativo, relacionados ya sea por aditividad o mediante sinergismo de los efectos producidos por los tratamientos individuales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la asociación del hipertiroidismo experimental con la intoxicación aguda con hierro induce un aumento en parámetros relacionados con el estrés oxidativo hepático tales como la lipoperoxidación, la oxidación de proteínas y la actividad de la NOS, y la naturaleza de estos cambios, en relación a los tratamientos individuales y al grupo control.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar parámetros de control de los tratamientos: peso corporal, peso del hígado, relación peso hígado/ peso corporal, temperatura rectal, consumo basal de O₂ hepático, niveles séricos de T₃ y niveles séricos y hepáticos de hierro en animales (a) hipertiroideos, (b) con sobrecarga aguda de hierro, (c) hipertiroideos con sobrecarga de hierro y (d) controles.
2. Evaluar la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de lipoperoxidación hepática asociada al estrés oxidativo en los grupos experimentales ya citados.
3. Evaluar el contenido de derivados carbonilos, como indicador de la oxidación de proteínas asociada al estrés oxidativo hepático en todos los grupos experimentales.
4. Determinar la actividad de la NOS hepática, como mecanismo prooxidante asociado al estrés oxidativo en todos los grupos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague Dawley (Instituto de Salud Pública), con un peso corporal de 200 a 300 g, alimentadas *ad libitum* con una dieta sólida estándar (Alimentos Champion S. A.), mantenidas a temperatura ambiental controlada, con períodos constantes y alternados de 12 horas de luz y oscuridad.

El diseño experimental incluye seis grupos formados por 4 a 13 animales:

Control (NaOH 0,1 N)- Control (NaCl 0,9 % p/v).	1.
T3 1 día-Control (NaCl 0,9 % p/v).	2.
T3 2 días-Control (NaCl 0,9 % p/v)	3.
Control (NaOH 0,1 N)- hierro dextrano.	4.
T3 1 día-hierro dextrano.	5.
T3 2 días-hierro dextrano.	6.

2.- Tratamiento de los animales

- **Hipertiroidismo** La inducción del estado hipertiroidéico se efectuó mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de T_3 (0,1 mg por kg de peso corporal) por uno y dos días consecutivos. Los animales control recibieron volúmenes equivalentes de NaOH 0,1 N (vehículo de la hormona), y los estudios se realizaron 24 h después de la última inyección.
- **Sobrecarga aguda de hierro** Las ratas fueron inyectadas i.p. con una dosis de 200 mg de hierro-dextrano/ kg de peso corporal y el grupo control recibió volúmenes equivalentes de NaCl 0,9%. Los estudios se realizaron después de 4 horas de la administración del hierro-dextrano o del NaCl 0,9 % p/v.
- **Experimentos de interacción** El modelo de interacción utilizó dos grupos experimentales (a) ratas tratadas con T_3 (0,1 mg/Kg) que recibieron 200 mg/Kg de hierro-dextrano a las 20 horas del tratamiento hormonal; (b) ratas tratadas con T_3 (0,1 mg/Kg) por 2 días consecutivos que recibieron 200 mg/Kg de hierro-dextrano a las 20 horas de la última dosis de T_3 .

3.- Evaluación del estado hipertiroidéico

La condición hipertiroidéica se evaluó de acuerdo a tres criterios, que debían cumplirse simultáneamente:

- a.- Temperatura rectal medida con una termocupla. 1.
- b.- Niveles séricos de T_3 determinados con un kit de radioinmunoensayo. 2.
- c.- Velocidad de consumo basal de O_2 (QO_2) hepático, medido polarográficamente en la preparación de hígado perfundido. 3.

La perfusión hepática se realizó según lo descrito por Sies (1978), para lo cual las ratas fueron anestesiadas con Nembutal sódico (50 mg/kg. i.p.). El hígado fue expuesto y aislado de sus ligamentos mediante técnica quirúrgica, se inyectó heparina (250 U) en el bazo y posteriormente se infundió en el hígado, mediante una cánula conectada a la vena porta, el líquido de perfusión que contenía NaCl 118 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, $NaHCO_3$ 25 mM y glucosa 10 mM, equilibrado con una mezcla de O_2/CO_2 (19/1, v/v) a pH 7,4. Las perfusiones se realizaron a un flujo constante (3,5-4,0 ml/ min/ g de hígado) y a una temperatura de 36 a 37°C, sin recirculación del perfusado. La velocidad de QO_2 de cada preparación fue así determinada en el efluente del perfusado, vía una cánula conectada a la vena cava, la cual se hizo pasar a través de un electrodo de O_2 (Estabrook, 1967).

4.- Evaluación de los niveles séricos y hepáticos de hierro.

Se realizó determinando espectrofotométricamente los niveles séricos de hierro mediante la formación de un complejo hierro-ferrozina. El contenido total de hierro hepático fue medido por espectrofotometría utilizando batofenantrolina, después de la digestión ácida de las muestras (Galleano y col, 1992).

5.- Evaluación de los parámetros de estrés oxidativo hepático.

Para realizar estos estudios, los animales fueron anestesiados con nembutal sódico (50 mg/ Kg peso corporal i.p.). Para remover la sangre los hígados fueron perfundidos *in situ* utilizando un buffer fosfato de potasio 10 mM a pH 7,4 que contenía KCl 140 mM. Luego los hígados fueron lavados en la solución anterior, secados en papel filtro, pesados y picados, para ser homogeneizados.

5.1.-Evaluación de la lipoperoxidación hepática

Se midió la velocidad de formación de TBARS como indicador de lipoperoxidación utilizando el método descrito por Buege y Aust (1978), que determina la absorbancia a 535 nm del producto de la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con derivados aldehídicos que provienen de la ruptura de ácidos grasos poliinsaturados por la acción radicalaria, principalmente malondialdehído (MDA). Las mediciones se efectuaron en homogeneizados de hígados provenientes de ratas de cada uno de los grupos experimentales señalados anteriormente, en un buffer que contenía KCl 150 mM y Tris 5 mM, pH 7,4. El homogeneizado hepático se centrifugó a 10.000x g durante 15 min en una centrífuga refrigerada Sorvall RC.2B. Se descartó el precipitado y se trató 1 ml del sobrenadante obtenido con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% (p/v). Luego de centrifugar a 2.000x g por 10 min. a temperatura ambiente, 1 ml del sobrenadante se trató con 1 ml de TBA 0,67% p/v, se calentó a 100°C durante 20 min para, luego de enfriar, leer la absorbancia del producto de esta reacción a 535 nm. La concentración de TBARS se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del MDA que es de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en nmoles de MDA/mg proteína/hora.

5.2.-Evaluación de la oxidación de proteínas hepáticas

Se midió la formación de derivados carbonilos como índice de oxidación de proteínas,

utilizando el método descrito por Reznick y Packer (1994), que corresponde a un método espectrofotométrico que detecta la reacción de la 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) con derivados carbonilos de las proteínas, para formar derivados proteína- hidrazona. Para las mediciones se utilizaron 200 mg de hígado, homogeneizados con 3ml de un buffer que contenía 50 mM de fosfato de potasio pH 7,4, 0,1 % de digitonina, 40mg/ml de difenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y 1 mM de EDTA. Luego de incubar por 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 6.000x g por 20 min. Un ml de sobrenadante se trató con 4 ml de DNPH 10 mM (tubo 1) y otro volumen equivalente de sobrenadante se trató con 4 ml de HCl 2,5 M (tubo 2). Ambos tubos se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación cada 15 min. Se adicionó 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% por 10 min y se centrifugó a 6.000x g por 10 min. Los precipitados fueron sometidos nuevamente a la acción del TCA por dos veces más y los precipitados resultantes fueron lavados 3 veces con 4 ml de etanol-etilacetato (1/1 v/v) para remover DNPH libre y lípidos contaminantes, centrifugando por 5 min a 6.000x g. El precipitado final se suspendió con 2 ml de clorhidrato de guanidina 6 M, pH 2,3. El contenido de derivados carbonilos se calculó utilizando la absorbancia máxima obtenida del espectro de absorción (350-390 nm) de las muestras tratadas con DNPH, utilizando el coeficiente de extinción molar del DNPH de $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en nanomoles de carbonilos/mg de proteína. El contenido de proteínas de las muestras (precipitado) se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm de muestras precipitadas con HCl 2,5 M y disueltas en guanidina 6 M pH 2,3, utilizando como estándar una solución de albúmina de bovino (1 mg/ml).

6.-Medición de la actividad de la NOS hepática

6.1.-Preparación del homogeneizado hepático

Un gramo de hígado, previamente perfundido *in situ*, fue homogeneizado con 5 ml de un buffer a pH 7,4 que contenía Hepes 10 mM, sacarosa 0,32 mM, EDTA 0,1 mM, ditiotreitól 1mM, 10 mg/ml de inhibidor de tripsina del poroto de soya, 10 mg/ml de leupeptina, 2 mg/ml de aprotinina y 1 mg/ml de PMSF, ajustado a pH 7.4 con NaOH. El homogeneizado fue centrifugado a 100.000x g por una hora, y el sobrenadante obtenido, que corresponde a citosol fue dejado en hielo para luego ser utilizado en la medición de la actividad de la NOS. Las determinaciones se realizaron dentro de 4 horas desde la obtención del homogeneizado hepático.

6.2.-Medición de la síntesis de •NO

La actividad de la NOS fue determinada en el citosol, mediante el método descrito por Knowles y col.(1990), que se basa en la oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina por •NO. Se preparó un medio de reacción a pH 7,2 que contenía

oxihemoglobina 1,6 μM , MgCl_2 1 mM, fosfato de Potasio 40 mM y 100 μl de sobrenadante, preincubando a 37°C por 5 minutos. La reacción se inició adicionando L-arginina (1mM) y NADPH (1 mM) y se midió la producción de $\bullet\text{NO}$ por los cambios en las diferencias de absorbancia a 401 nm menos la absorbancia a 411 nm detectadas, durante 2 minutos, a 37°C. Se utilizó el coeficiente de extinción de 38.600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para la metahemoglobina, para cuantificar la producción de $\bullet\text{NO}$ en nanomoles/mg de proteínas/min o nanomoles/g hígado/min.

7.- Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas presentes en las distintas muestras analizadas mediante el método descrito por Lowry y col. (1951), utilizando como estándar una solución de albúmina de bovino que contiene 1 mg de proteína/ml.

8.- Reactivos

El nembutal sódico se obtuvo de Laboratorio Abbott de Chile. La heparina se obtuvo de Prolabo. Todos los ácidos y sales utilizados y el reactivo de Folin provenían de Merck Química Chilena. Los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich Co.

9.- Tratamiento estadístico de los datos experimentales

Los resultados obtenidos en los experimentos se expresaron como el promedio de al menos 4 determinaciones, más menos el error estándar de la media. Para determinar si las diferencias entre los distintos grupos experimentales eran estadísticamente significativas se aplicaron las pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls', ambas con un nivel de significación de 5%.

RESULTADOS

1.- Parámetros generales en animales control y tratados.

La administración de T_3 (0.1 mg por Kg de peso corporal) por 1 y 2 días consecutivos a ratas alimentadas no produjo cambios significativos en el peso corporal, en el peso del hígado y en la relación peso del hígado/peso corporal ($\times 100$), comparados con los valores observados en los animales control, como tampoco en el contenido de proteínas citosólicas expresadas como mg/g de hígado (Tabla 1). La administración de hierro (200 mg/Kg de peso corporal por 4 horas) y la administración conjunta de T_3 y hierro tampoco produjeron cambios significativos en estos parámetros (Tabla 1).

2.- Evaluación de la condición hipertiroidea.

Los criterios que se utilizaron para evaluar la condición hipertiroidea de las ratas fueron las mediciones de la temperatura rectal, de los niveles séricos de T_3 y del QO_2 hepático, realizadas 24 horas después de la administración de la última dosis de T_3 . En la figura 1

INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE PARAMETROS DE ESTRES OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA.

se presentan los niveles séricos de T_3 en animales tratados por 1 y 2 días consecutivos con la hormona. Se puede observar que los niveles circulantes de T_3 aumentan significativamente en ambos grupos de animales tratados, presentando una concentración máxima después de 2 días de tratamiento.

Tabla 1: Parámetros generales en animales control y tratados. Grupo Experimental

Parámetros	Ratas Control (a)	Ratas T_3 1 día (b)	Ratas T_3 2 días (c)	Ratas hierro (d)	Ratas T_3 1 día hierro (e)
Peso Corporal (g)	236 ± 7 (8)	227 ± 7 (9)	211 ± 4 (8)	231 ± 6 (10)	228 ± 9 (11)
Peso hígado (g)	8.86 ± 0.42 (8)	8.18 ± 0.36 (9)	8.45 ± 0.43 (8)	8.87 ± 0.37 (10)	8.02 ± 0.35 (9)
Peso hígado/peso corporal (g/100g)	3.77 ± 0.18 (8)	3.62 ± 0.15 (9)	3.99 ± 0.14 (8)	3.87 ± 0.19 (10)	3.54 ± 0.13 (9)
mg prot citosólicas/ g hígado	65.01 ± 4.31(4)	71.89 ± 5.99 (5)	76.38 ± 2.52 (6)	70.92 ± 4.01 (6)	70.68 ± 4.5 (5)
Temperatura rectal (°C)	36.92 ± 0.03 (13)	38.02 ± 0.02 (12) (a,d)	38.30 ± 0.04 (8) (a,d)	36.95 ± 0.02 (13) (b,c,e,f)	38.05 ± 0.03 (12) (a,d)

Los valores mostrados corresponden al promedio ± S.E.M. para el número de ratas por grupo experimental en paréntesis. La significancia de las diferencias entre los valores promedios fue determinado por las pruebas de significancia unidireccional y el test de Newman-Keuls' ($p < 0.001$), se muestra con las letras entre paréntesis que identifican los grupos comparados.

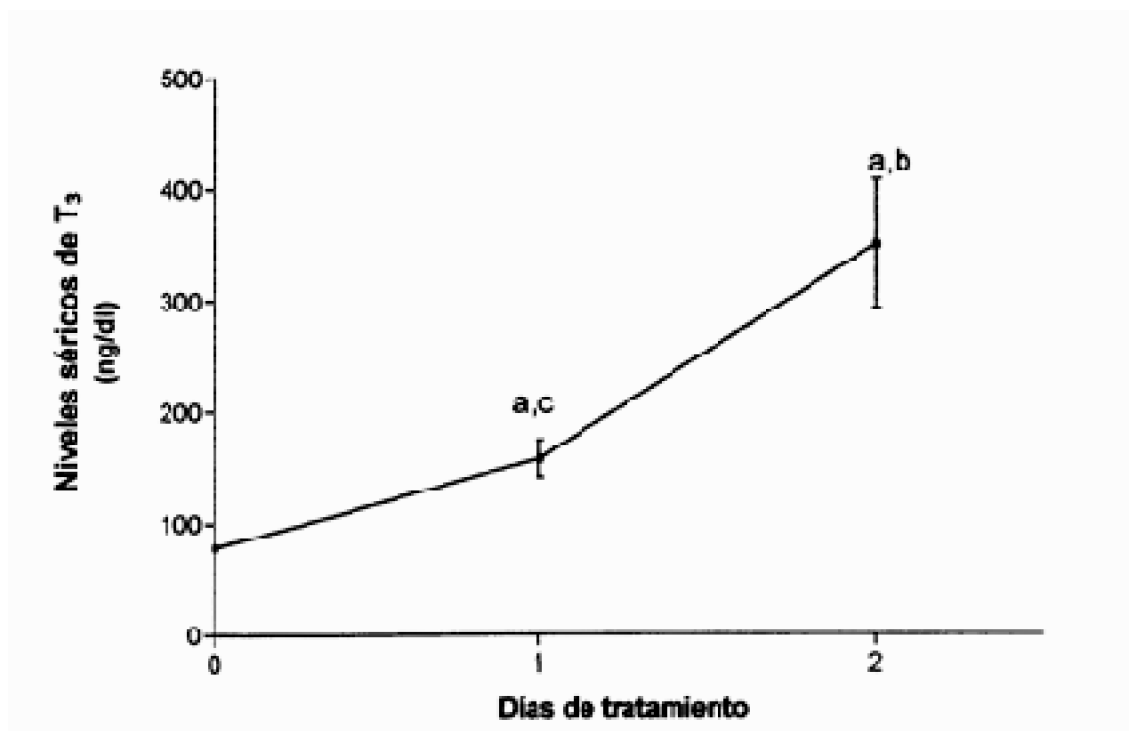


Figura 1. Efecto del tratamiento con T_3 sobre los niveles séricos de la hormona en ratas.

Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 4 a 5 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre valores promedios de ratas controles y tratadas con T_3 fue determinado por la pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls` ($p < 0.05$), se muestra sobre cada punto, indicando los grupos comparados, (a) controles ; (b) T_3 1 día (c) T_3 2 días.

Paralelamente al incremento en los niveles séricos de T_3 , aumentó significativamente la respuesta calorigénica a la hormona, estimada tanto por el aumento en la temperatura rectal de los animales, resultados presentados en la Figura 2, como por el aumento del QO_2 hepático (Figura 3), en relación a los controles que recibieron dosis diarias del vehículo de la hormona (NaOH 0.1 N).

El tratamiento con hierro alteró la respuesta calorigénica (medida por el aumento en la temperatura rectal) observada con la administración de T_3 (Tabla 1).

De acuerdo a estos criterios, podemos decir que el modelo experimental utilizado induce una condición hipertiroidea en las ratas, con un aumento concomitante de la calorigénesis.

3.- Evaluación de los niveles séricos y hepáticos de hierro

En la tabla 2 se muestran los resultados de la medición de estos parámetros. Se puede apreciar que la administración de hierro produjo un aumento significativo en los niveles séricos y hepáticos de este metal.

El tratamiento con T_3 no alteró los niveles séricos de hierro [431 ± 36 mM (n=3)] como tampoco los niveles hepáticos [832 ± 82 mg/g peso seco (n=3)].

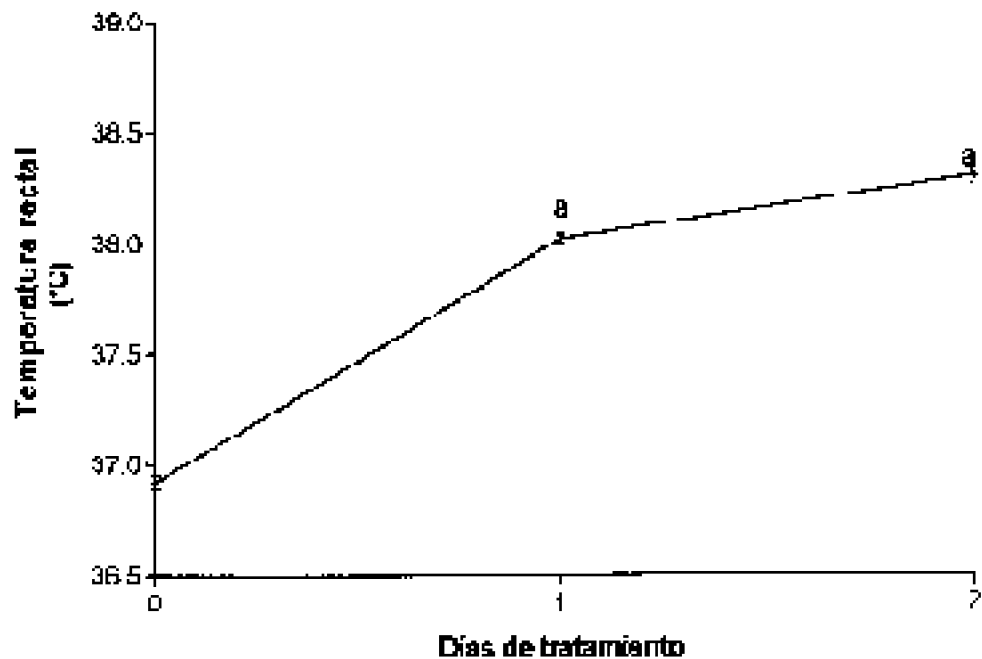


Figura 2. Efecto del tratamiento con T_3 sobre la temperatura rectal de las ratas.

Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 8 a 13 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre los valores promedios de ratas controles y tratadas con T_3 fue determinado por las pruebas de ANOVA unidireccional e el test de Newman-Keuls ($p < 0.001$), se muestra sobre cada punto, indicando los grupos comparados, (a) controles; (b) T_3 1 día; (c) T_3 2 días

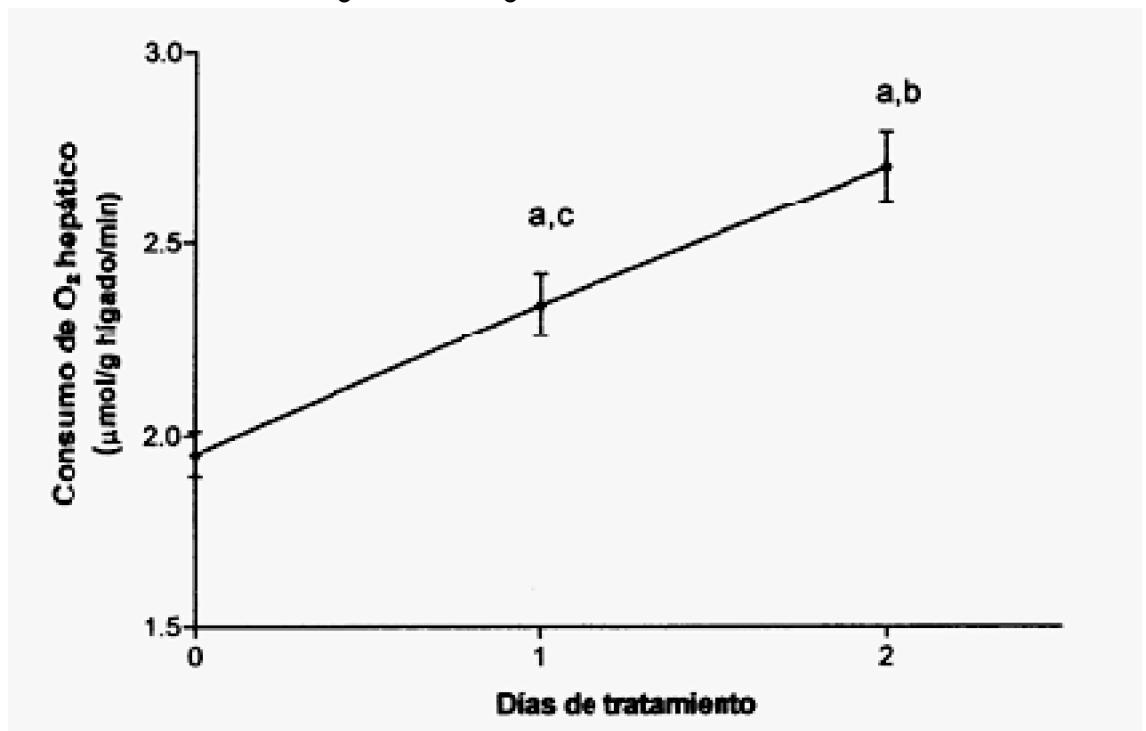


Figura 3. Efecto del tratamiento con T_3 sobre QO_2 hepático en la rata.

Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 7 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre valores promedios de ratas controles y tratadas con T_3 fue determinado por la pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls' ($p < 0.05$), se muestra sobre cada punto, indicando los grupos comparados, (a) controles; (b) T_3 1 día (c) T_3 2 días.

Tabla 2 : Niveles séricos y hepáticos de hierro de ratas control y ratas con una sobrecarga aguda de hierro.

Parámetro	Ratas Control	Ratas con sobrecarga de hierro	p
Niveles séricos de hierro (mM)	38 \pm 5 (8)	356 \pm 43 (8)	< 0.05
Contenido total de hierro hepático (mg/g peso seco)	358 \pm 57 (6)	731 \pm 55 (6)	< 0.05

Los valores mostrados corresponden al promedio \pm S.E.M. para el número de animales señalado entre paréntesis. La significancia de las diferencias entre los valores promedios de ratas controles y tratadas con hierro (200 mg/Kg de peso corporal por 4 horas) fue determinado por las pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls'.

4.- Evaluación de parámetros de estrés oxidativo hepático

4.1.-Evaluación de la lipoperoxidación hepática

Para evaluar la lipoperoxidación hepática se midió la velocidad de formación de TBARS. La figura 4 muestra los resultados de la medición de este parámetro en los diferentes grupos experimentales. La administración de T_3 por 1 y 2 días consecutivos aumentó en forma significativa la velocidad de formación de TBARS (396 % y 317 %, respectivamente), en relación a los animales control. La administración de hierro también aumentó significativamente la velocidad de formación de TBARS (348 % respecto a los controles) y el tratamiento conjunto de hierro y T_3 (1 día) produjo un aumento significativo de este parámetro (489 % con respecto a los controles). Por otra parte, la administración de hierro a ratas tratadas con T_3 por 2 días produjo también un incremento significativo en este parámetro, aunque ligeramente menor (217 % con respecto a los controles).

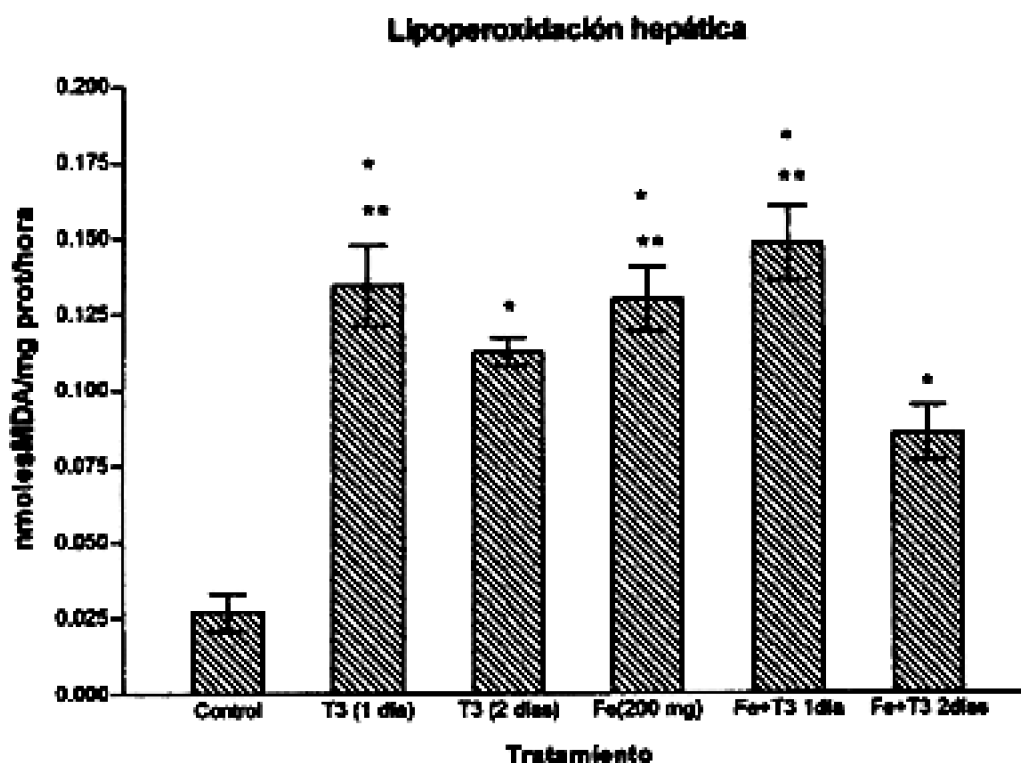


Figura 4. Efecto de los tratamiento con T_3 y hierro sobre la velocidad de formación d TBARS en hígado de rata..

Los valores representan el promedio \pm S.E.M. para 4 a 11 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre valores promedios del grupo control y de las ratas tratadas fue determinado por la pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls` (*) indica $p < 0.001$, con respecto al valor control y (**) indica $p < 0.05$ con respecto al grupo Fe+ T_3 2 días

4.2.- Evaluación de la oxidación de proteínas hepáticas

Para estimar la oxidación de proteínas, se utilizó la medición de la formación de derivados carbonilos de ciertos aminoácidos. En la figura 5 se puede observar, que las ratas sometidas a 1 y 2 días de tratamiento con T_3 no presentaron diferencias significativas en este parámetro, con respecto a los animales control. Sin embargo, las ratas que recibieron una sobrecarga aguda de hierro presentaron un incremento significativo en el contenido de derivados carbonilos (210 %, con respecto a los controles). Resultados similares se observaron en animales que recibieron ambos tratamientos [hierro y T_3 (1 día), hierro T_3 (2 días)] con incrementos significativos con respecto a los controles en ambos casos (170 % y 159 %, respectivamente) (Figura 5).

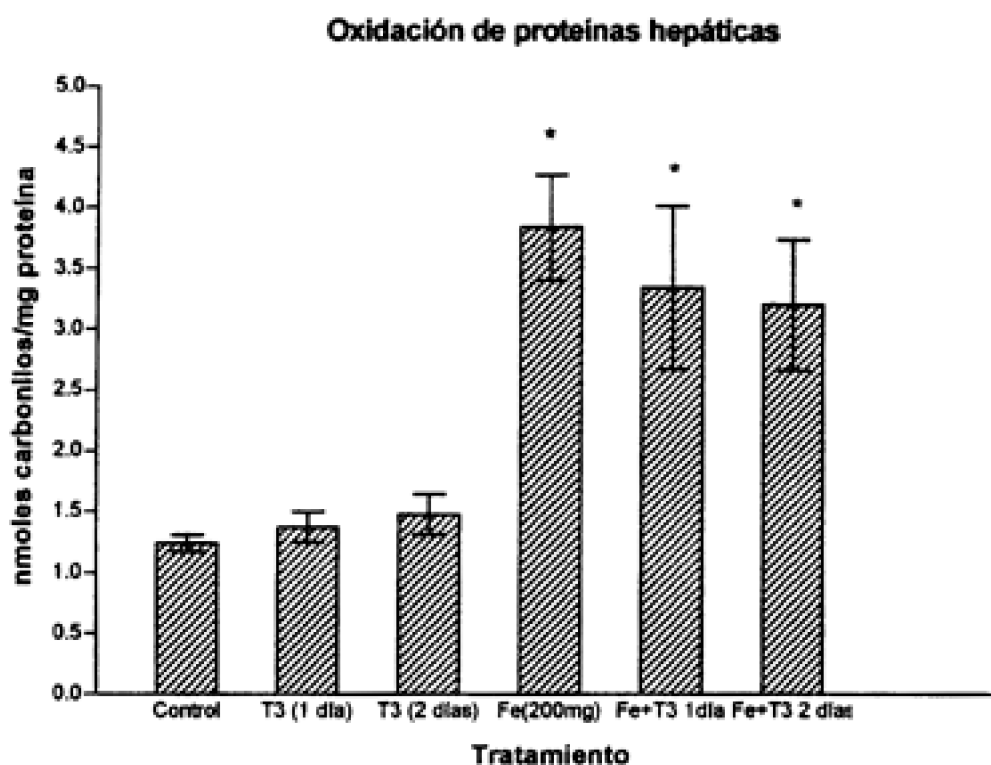


Figura 5. Efecto de los tratamientos con T_3 y hierro sobre la oxidación de proteínas hepáticas en la rata.

Los valores representan el promedio \pm S.E.M. para 4 a 9 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre valores promedios de los animales controles y los tratados fue determinada por las pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls` (*) indica $p < 0.01$, con respecto al valor control

5.- Evaluación de la actividad de la NOS hepática

Para medir la actividad de la NOS hepática se utilizó un método basado en la oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina por el \bullet NO, reacción que es monitoreada espectrofotométricamente. La actividad específica de la NOS hepática (nmoles \bullet NO/min/mg proteína) no se modificó por el tratamiento con T_3 por un día, con respecto a los controles (Figura 6). No obstante, tanto el tratamiento con T_3 por 2 días como el tratamiento con hierro (200 mg/Kg por 4 horas) produjeron aumentos significativos en la actividad de esta enzima (63 % y 103 %, respectivamente), en relación a los controles. En el tratamiento conjunto [hierro y T_3 (1 día)] se observó un incremento de un 137 % en la actividad de la NOS, con respecto a los controles, efecto que fue mayor en el tratamiento con hierro y T_3 (2 días) (269 % respecto a los controles). En la figura 7 se presenta el efecto neto de los tratamientos con T_3 y hierro sobre la actividad específica de la NOS hepática, observándose una potenciación de los efectos de ambos tratamientos.

Al expresar la actividad de la NOS hepática por unidad de tejido (nmoles \bullet NO/min/ g hígado), se observó efectos similares a los anteriores para todos los grupos experimentales (Figura 8). En relación a los controles, la actividad de la NOS aumentó un 82% en el tratamiento con T_3 por 2 días, y un 131 % en el tratamiento con hierro. Los tratamientos conjuntos hierro y T_3 (1 día) y hierro y T_3 (2 días) produjeron aumentos de 167 % y 333 %, respectivamente. En la figura 9 se presentan los efectos netos de los tratamientos con T_3 y hierro sobre la actividad de la NOS hepática por unidad de tejido, observándose, en forma similar a lo anterior, una potenciación de los efectos de ambos tratamientos.

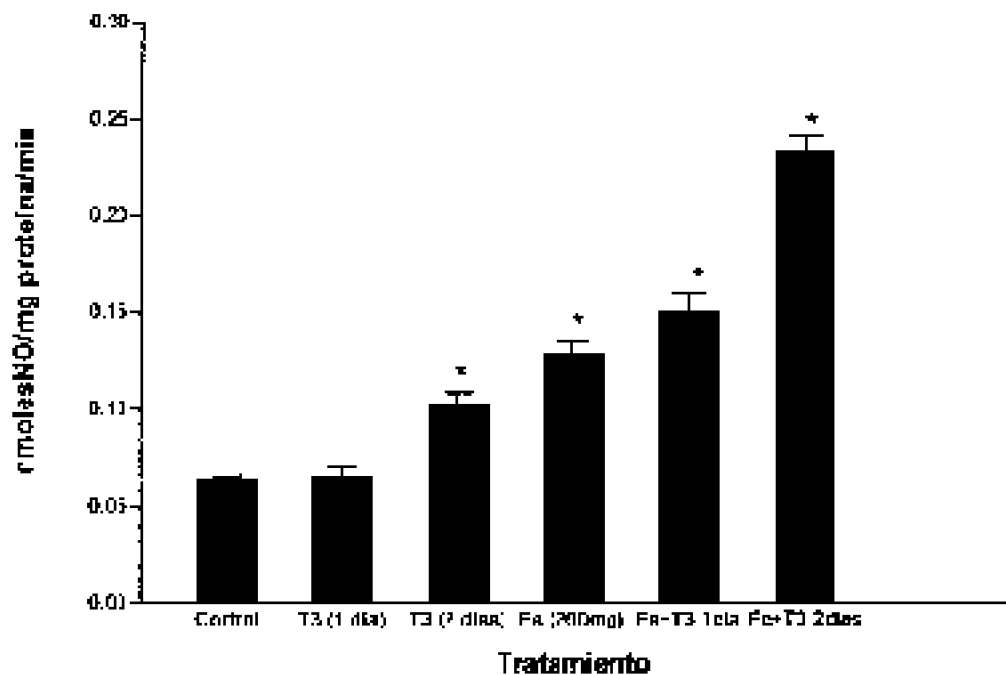


Figura 6. Efecto de los tratamiento con T_3 y hierro sobre la actividad específica de la NOS hepática en la rata.

Los resultados corresponden al promedio \pm S.E.M. para 4 a 7 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre valores promedios de las ratas controles y de las tratadas fue determinado por la pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls` (*) indica $p < 0.05$, con respecto al valor control .

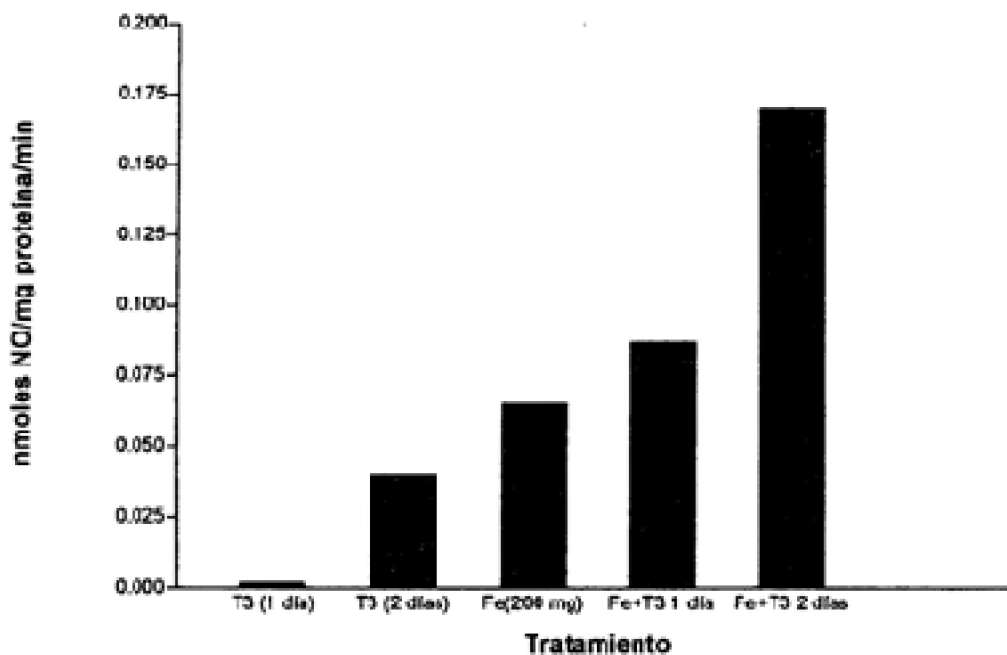


Figura 7. Efecto neto (grupo tratado-grupo control) de los tratamiento con T_3 y hierro sobre sobre la actividad específica de la NOS hepática, calculados a partir de los valores promedio indicados en la figura 6.

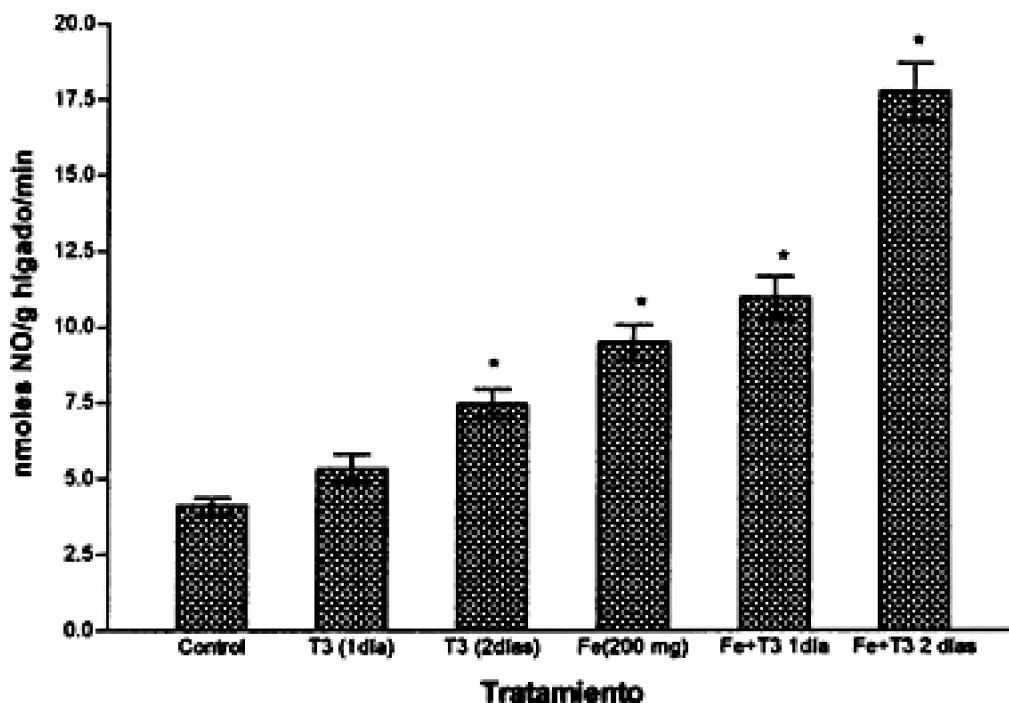


Figura 8. Efecto de los tratamiento con T_3 y hierro sobre la actividad específica de la NOS hepática por unidad de tejido.

INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO Y UNA SOBRECARGA AGUDA DE HIERRO SOBRE PARAMETROS DE ESTRES OXIDATIVO Y HEPATOTOXICIDAD EN LA RATA.

Los resultados corresponden al promedio \pm S.E.M. para 4 a 6 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre valores promedio de las ratas controles y de las tratadas fue determinado por la pruebas de ANOVA unidireccional y el test de Newman-Keuls` (*) indica $p < 0.01$, con respecto al valor control .

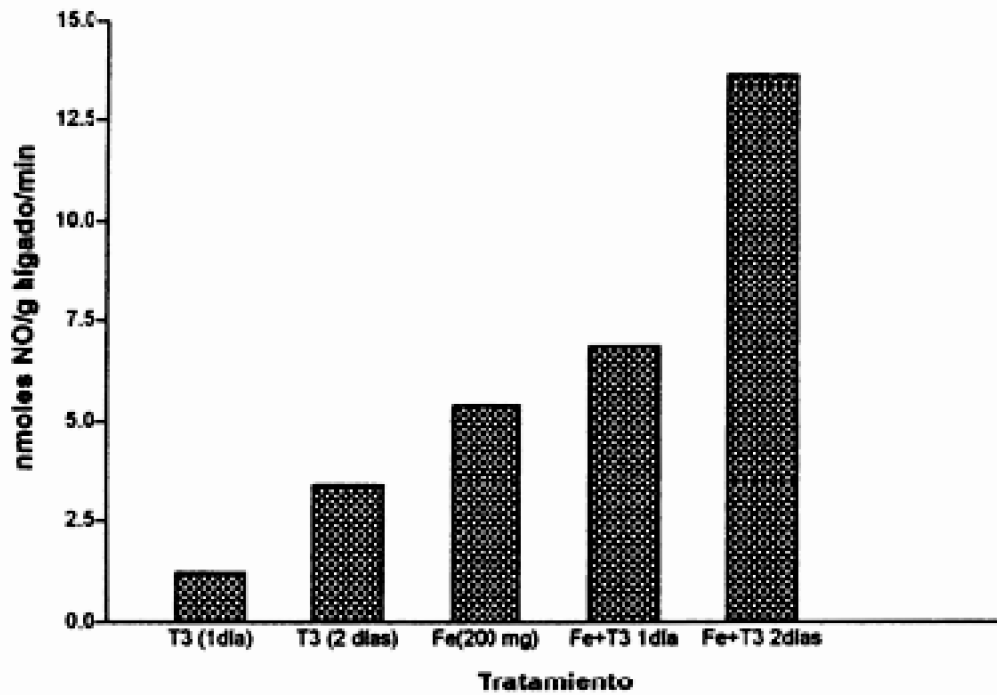


Figura 9. Efecto neto (grupo tratado-grupo control) de los tratamiento con T_3 y hierro sobre sobre la actividad específica de la NOS hepática por unidad de tejido, calculados a partir de los valores promedio indicados en la figura 8.

DISCUSION

1.- Efecto del hipertiroidismo y una sobrecarga aguda de hierro sobre parámetros de estrés oxidativo.

Se ha establecido que una condición de estrés oxidativo se produce cuando hay un desbalance entre la velocidad de generación de especies prooxidantes y su velocidad de consumo por los mecanismos de defensa antioxidante, a favor de los primeros (Sies, 1986). Esta condición lleva al deterioro oxidativo de moléculas esenciales, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, que conducen a alteraciones estructurales y funcionales (Tapia, 1996).

En este estudio, se observó que la administración de T_3 a ratas induce una respuesta calorigénica, evidenciada por el aumento significativo de la temperatura rectal de los animales y de la velocidad de consumo de O_2 hepático. Esto último conduce a un aumento en la generación de EROS, alterándose el estado normóxico celular en el hígado, estableciéndose un estado de estrés oxidativo en este órgano (Esquema 1). Se puede visualizar que la administración de T_3 por 1 y 2 días consecutivos produjo un aumento en la lipoperoxidación hepática medida por la velocidad de formación de TBARS (Figura 4). Este hallazgo concuerda con los resultados de otros estudios, en los que además se ha encontrado aumentos en el contenido de TBARS en la bilis y en los

microsomias, y en la quimioluminiscencia espontánea (indicador de lipoperoxidación) en hígado tanto *in vivo* como *in vitro* (Fernández, 1992). Este efecto de T_3 estaría relacionado con el incremento en la velocidad de QO_2 inducido por la hormona, el cual conduciría a un aumento en la generación de EROS a nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal, los que producirían oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados de los fosfolípidos de membrana (Fernández, 1992).

La velocidad de formación de TBARS también incrementó significativamente luego de 4 horas de la administración de 200 mg de hierro/kg de peso, resultado que concuerda con estudios que utilizaron la misma dosis de hierro, en los cuales se observó un aumento significativo del índice de estrés oxidativo hepático (contenido de TBARS/contenido de GSH) (Boisier, 1997). Estudios realizados en cultivos de hepatocitos suplementados con hierro señalan un aumento en la lipoperoxidación, medida por los niveles de malondialdehído y de conjugados diénicos (Sergent y col., 1996). Este efecto del hierro podría deberse a que este metal promueve la formación de $HO\bullet$, mediante las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss, siendo éste un potente oxidante que provocaría daño oxidativo a los ácidos grasos poli-insaturados de los fosfolípidos de membrana y concomitantemente alteraciones de organelos subcelulares y pérdida de la viabilidad celular (Aust y col., 1985; Britton y col., 1987; Britton, 1996). A pesar de la asociación encontrada entre sobrecarga de hierro y lipoperoxidación, no se conoce el mecanismo por el cual ocurre este proceso *in vivo* (Bacon y col., 1990; Britton, 1996).

La administración de hierro a ratas tratadas 1 día con T_3 , produjo un aumento significativo en la lipoperoxidación con respecto a los controles, el cual no fue significativamente diferente al producido por los dos tratamientos por separado. La administración de hierro a ratas tratadas 2 días con T_3 , produjo un aumento significativo, con respecto a los controles, en la velocidad de formación de TBARS. Sin embargo, este parámetro es significativamente menor que los encontrados tanto en el grupo experimental anterior como en los tratamientos por separado. Este último efecto se debería a que la administración de hierro a ratas con 2 días de T_3 disminuye la formación de $O_2^{\cdot-}$ mitocondriales (resultados no publicados), que son necesarios para la producción del $HO\bullet$, por lo cual se produciría menor peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados por acción de este radical. Se ha observado que al incubar hepatocitos que tienen una sobrecarga de hierro con agentes quelantes, como la deferoxamina o la apotransferrina, se produce una disminución significativa en la lipoperoxidación (Bacon y col., 1990).

Además de los efectos hepáticos que provoca la administración de hierro, se han observado aumentos en la lipoperoxidación de tejidos extrahepáticos, los que incluyen incrementos en el contenido de conjugados diénicos en el páncreas, en el bazo y en el músculo cardíaco de ratas (Whittaker y col., 1996), como también aumentos en los niveles de TBARS en el riñón, en el músculo y en la piel de ratones y ratas que recibieron hierro-dextrano (Bacon y col., 1990). Del mismo modo, en pacientes con hemocromatosis hereditaria se ha observado un incremento en los niveles circulantes de TBARS y aumento en los niveles hepáticos de MDA, lo que indica aumentos en la lipoperoxidación (Britton, 1996).

El contenido de derivados carbonilos, índice de modificación oxidativa de las

proteínas, no aumentó significativamente en las ratas que recibieron T_3 por 1 y 2 días consecutivos (Figura 5), resultados que concuerdan con estudios anteriores, en los cuales sólo se observa un aumento en la oxidación de proteínas hepáticas (88 %), con respecto a los controles, después de 3 días de tratamiento con la hormona (Tapia y col., 1999). Por otra parte, la administración de hierro produjo un aumento significativo en el contenido de derivados carbonilos (210 %) con respecto a los controles, y su administración a ratas con 1 y 2 días de T_3 produjo resultados similares, por lo cual este efecto se puede atribuir exclusivamente a la acción prooxidativa del hierro (Figura 5), que promueve la formación de radicales libres (Aust y col., 1985), los cuales provocarían daño oxidativo a las proteínas. Además la formación de derivados carbonilos, inducida por el hierro y el cobre, derivan de la unión de estos metales a proteínas y posterior transformación del grupo amino de varios aminoácidos en carbonilos, con la participación de EROS (Reznick y col., 1994). La oxidación de proteínas catalizada por metales, con incrementos en la formación de derivados carbonilos, se ha observado en cultivos de fibroblastos humanos (Reznick y col., 1994). Las consecuencias de la modificación oxidativa de las proteínas pueden ser tanto la pérdida de su función como el aumento en su degradación (Stadtman, 1990; Lissi y col., 1992(2)). La modificación oxidativa de ciertas enzimas puede llevar a una reducción de su actividad enzimática (Stadtman, 1990; Lissi y col., 1992(2)). Así, estudios *in vivo* han señalado la inactivación de enzimas antioxidantes en condiciones tales como el hipertiroidismo, en el cual hay disminución de las actividades de la SOD y de la catalasa y del contenido del citocromo P-450 y se desencadena un estrés oxidativo hepático (Fernández y col., 1985; Fernández y col., 1988). La degradación de las proteínas puede derivar de su modificación oxidativa, que las hace más susceptibles al ataque proteolítico por proteasas y/o proteinasas multicatalíticas (Stadtman, 1990). En enfermedades tales como la artritis reumatoídea, como también en el daño al músculo cardíaco inducido por la isquemia-reperfusión y en el daño al músculo esquelético inducido por el ejercicio exhaustivo, se ha encontrado un aumento en los niveles de derivados carbonilos (Reznick y col., 1994). En ciertas condiciones experimentales en las cuales aumenta el contenido de derivados carbonilos, se ha observado que antioxidantes como la vitamina E, y agentes quelantes de metales, lo reducen (Reznick y col., 1994).

2.- Efecto del hipertiroidismo y una sobrecarga aguda de hierro sobre la actividad de la NOS hepática.

El gen de la iNOS, que codifica para la NOS hepática, se expresa en los hepatocitos en diversas condiciones fisiológicas y patológicas que afectan al hígado, como el shock séptico y el shock hemorrágico (Taylor y col., 1998). La regulación de la expresión de la iNOS es compleja y ocurre a varios niveles de la vía de expresión génica (Taylor y col., 1998). La iNOS hepática es activada por endotoxinas y citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleuquina-1b y el interferon- γ , y su expresión requiere del factor de transcripción NF-kappa B (Taylor y col., 1998). La iNOS es inhibida por

esteroides, por el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), por la p-53, por el shock térmico y por el mismo \bullet NO (Taylor y col., 1998).

En este trabajo, la evaluación de la actividad de la NOS hepática en ratas tratadas por 2 días con T_3 , evidenció un aumento en la actividad de la enzima (Figura 6), hallazgo que concuerda con estudios previos (Fernández y col., 1997). Este aumento en la actividad de la NOS hepática ocurre tanto en los hepatocitos como en las células de Kúpffer, ya que se ha observado que la administración de cloruro de gadolinio, un inactivador de las células de Kúpffer, a ratas tratadas con T_3 por 3 días consecutivos, disminuye la actividad de la NOS en un 27 % (Fern andez y col., 1997). El incremento en la generación de \bullet NO puede deberse a una inducción de la NOS en hepatocitos y en las células no parenquimáticas, por la interacción de la hormona tiroidea con receptores nucleares, que lleva a la síntesis de enzimas relacionadas con procesos redox (Fern andez y col., 1997), sin embargo, se requiere de estudios adicionales para detectar si hay un aumento en la expresión del mRNA para la iNOS. En relación a las células de Kúpffer, el aumento en la actividad de la NOS, podría atribuirse, parcialmente, al aumento en el número de estos macrófagos hepáticos inducido por T_3 (Tapia y col., 1997). Alternativamente, el aumento en la expresión de esta enzima, podría derivar de la activación del NF-kappa-B inducida por el estrés oxidativo alcanzado en esta condición (Sen y col., 1996; Baeuerle y col., 1994).

La administración de hierro evidenció un drástico incremento en la actividad de la NOS (103 %) en relación a los controles. Estudios relacionados con el efecto del cobre sobre la actividad de la NOS endotelial, han revelado que este metal activa a la enzima (Plane y col., 1997; Ohnishi y col., 1997), siendo probable que el hierro la active en forma similar. Estos metales actúan de manera similar, promoviendo la formación de HO \bullet mediante la reacción de Haber-Weiss (Aust y col., 1985) y además, como fue mencionado anteriormente, catalizando la formación de derivados carbonilos como producto de la oxidación de proteínas (Reznick y col., 1994).

En ratas hipertiroideas (1 y 2 días de tratamiento) la administración de hierro evidenció un efecto potenciador sobre la actividad de la NOS hepática, expresada como U/mg de proteína o como U/g de tejido.

3.- El \bullet NO puede actuar como un agente prooxidante o como un agente protector a nivel hepático.

Además de los efectos ya discutidos sobre la actividad de la NOS hepática, en el hipertiroidismo se produce un aumento en la velocidad de formación de $O_2^{\cdot-}$ hepáticos, tanto a nivel microsomal (Fern andez y col., 1985) como a nivel mitocondrial (Fern andez y col., 1993). Por otro lado, en las células de Kúpffer se produce un aumento en la RR con incrementos en la formación de $O_2^{\cdot-}$ y de \bullet NO (Tapia y col., 1997).

El \bullet NO como agente prooxidante conduce a la formación de moléculas altamente oxidantes, ya que puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ y formar $ONOO^-$ (Beckman y col., 1994),

un potente agente oxidante, que puede ser protonado rápidamente y producir otras dos moléculas oxidantes, que son el HO• y el dióxido de nitrógeno (Sergent y col., 1997).

El ONOO⁻ puede producir daño oxidativo en lípidos, desoxirribosa, a-tocoferol, aminoácidos y proteínas (Sergent y col., 1997). Por otra parte, el •NO puede reaccionar con H₂O₂ y formar oxígeno singlete, y además aumentar la formación de HO• mediante la liberación de hierro desde la ferritina (Sergent y col., 1997).

El •NO puede ser considerado un agente antioxidante, ya que se ha descrito que este radical puede inhibir el estrés oxidativo, inducido en hepatocitos por hierro o etanol, debido a que reacciona con el hierro formando un complejo inactivo que no puede promover la formación de HO•, lo que conduce a una disminución del contenido de MDA y de conjugados diénicos, índices de lipoperoxidación (Sergent y col., 1997).

Estos hallazgos podrían explicar los resultados que se muestran en las figuras 4, 6 y 8). Al comparar los efectos de la administración de hierro a ratas tratadas con T₃ por 1 y 2 días, se observó en estos últimos una disminución del índice TBARS (Figura 4), en concomitancia con un aumento en la generación de •NO (Figuras 6 y 8). Esta menor tasa lipoperoxidativa podría derivar de una mayor formación del complejo hierro-•NO con una menor liberación de HO• y disminución del proceso lipoperoxidativo.

Otros estudios que sugieren efectos hepatoprotectores del •NO, señalan que este radical tiene un rol importante en la protección del hígado durante la sepsis y durante el fenómeno de isquemia-reperusión (Taylor y col., 1998). La adición de inhibidores de la NOS aumentó el daño hepático en una endotoxemia (Vos y col., 1997) y el daño oxidativo mediado por acetaminofeno aumenta (Kuo y col., 1997).

Además, el •NO, bloquea la apoptosis y la hepatotoxicidad inducida por el TNF- α , lo que sugiere que la iNOS hepática se expresa como respuesta adaptativa frente a un daño inflamatorio mínimo, aumentando la generación de •NO, el cual actuaría como citoprotector (Taylor y col., 1998).

CONCLUSIONES

1. El hipertiroidismo induce una respuesta calorigénica en la rata, evidenciada por un aumento en la temperatura rectal y en el consumo de oxígeno hepático.
2. El hipertiroidismo y la sobrecarga aguda de hierro inducen un estrés oxidativo hepático en la rata, conduciendo a un aumento significativo en la lipoperoxidación en este tejido.
3. La oxidación de proteínas hepáticas, aumenta luego de una sobrecarga de hierro, pero no es modificada por la condición hipertiroídea (1 y 2 días de tratamiento).
4. Tanto la administración de T3 por 2 días consecutivos como la administración de hierro (200 mg/Kg de peso) por 4 horas a ratas producen incrementos significativos en la actividad de la NOS hepática.
5. La administración de hierro a ratas hipertiroideas (1 y 2 días de tratamiento) produce una potenciación de los efectos de ambos tratamientos sobre la actividad de la NOS hepática.
6. La administración de hierro a ratas que recibieron 2 días de tratamiento con T3 produce una disminución en la velocidad de formación de TBARS, en concomitancia con el aumento en la generación de •NO.

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1970300.

BIBLIOGRAFIA

- Adamo, A. M., Llesuy, S. F., Pasquini, J. M., and Boveris, A.: "Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats". *Biochem. J.* (1989); 263, 273-277.
- Asayama, K., Dobashi, K., Hayashibe, H., Megata, Y., and Kato, K.: "Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: A possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism". *Endocrinology* (1987); 121, 2112-2118.
- Aust, S. D., Morehouse, L. y Thomas, C.: "Role of metals in oxygen radical reactions". *J. Free Radical Biol. Med.* (1985); 1, 3-25.
- Bacon, B. R. y Britton, R. S.: "The pathology of hepatic iron overload: A free radical-mediated process?". *Hepatology* (1990); 11, 127-137.
- Baeuerle, P., Henkel, T.: "Function and activation of NF-kB in the immune system". *Annu. Rev. Immunol.* (1994); 12, 141-179.
- Beckman, J., and Tsai, J.: "Reactions and diffusion of nitric oxide and peroxynitrite". *Biochemist* (1994); 16, 8-10.
- Boisier, X., Tapia, G., Videla, L. A., and Fernández, V.: "Efecto de una sobrecarga aguda de Fe sobre el índice de estrés oxidativo hepático en la rata". *R. Noticiero de Biología* (1997); 5, 95.
- Britton, R. S., Bacon, B. R. y Recknagel, R. O.: "Lipid peroxidation and associated hepatic organelle dysfunction in iron overload". *Chem Phys Lipids* (1987); 45,

207-239.

Britton, R. S.: "Metal-induced hepatotoxicity". *Semin Liver Dis* (1996); 16: 1, 3-12.

Buege, J. A. y Aust, S. D.: "Microsomal lipid peroxidation". *Methods Enzymol.* (1978); 52, 302-310.

Estabrook, R. W.: "Mitochondrial respiratory control and polarographic measurements of ADP/O ratios". *Methods Enzymol.* (1967); 10, 41-47.

Fernández, V., Barrientos, X., Kipreos, K., Valenzuela, A., and Videla, L. A.: "Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: Relation to lipid peroxidation". *Endocrinology* (1985); 117, 496-501.

Fernández, V., Llesuy, S., Solari, L., Videla, L. A., and Boveris, A.: "Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress". *Free Radicals Res. Commun.* (1988); 5, 77-84.

Fernández, V., Simizu, K., Barros, S. B. M., Azzalis, L. A., Pimentel, R., Junqueira, V. B. C., and Videla, L. A.: "Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism related enzymes' activities, efflux and turnover". *Endocrinology* (1991); 129, 85-91.

Fernández, V.: "Cambios moleculares asociados al estrés oxidativo hepático en un modelo de hipertiroidismo experimental". Tesis de Doctorado en Ciencias con Mención en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (1992).

Fernández, V., and Videla, L. A.: "Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles". *Free Radicals Res. Commun.* (1993); 18, 329-335.

Fernández, V. y Videla, L. A.: "Biochemical aspects of cellular antioxidant systems". *Biol. Res.* (1996); 29, 177-182.

Fernández, V., Cornejo, P., Tapia, G. y Videla L. A.: "Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat". *NITRIC OXIDE: Biology and chemistry* (1997); 1, 463-468.

Galleano, M. y Puntarulo, S.: "Hepatic chemiluminescence and lipid peroxidation in mice iron overload". *Toxicology* (1992); 76, 27-38.

Halliday, J. W., Searle, J.: "Hepatic iron deposition in human disease and animal models". *Biometals* (1996); 9: 2, 205-209.

Hardonk, M. J., Dijkhuis, F. W. J., Hulstaert, C. E. Y Koudstaal, J.: "Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation". *J. Leukoc. Biol.* (1992); 52, 296-302.

Knowles, R. G., Merret, M., Salter, M., and Moncada, S.: "Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat". *Biochem. J.* (1990); 270, 833-836.

Knowles, R. G.: "Nitric oxide synthases". *Biochem. J.* (1994)

Knowles, R. G., and Moncada, S.: "Nitric oxide synthases in mammals". *Biochem. J.* (1994); 298, 249-258.

Kuo, P. C., Schroeder, R. A., Loscalzo, J.: "Nitric oxide and acetaminophen-mediated

- oxidative injury: modulation of interleukin-1-induced nitric oxide synthase in cultured rat hepatocytes". *J Pharmacol Exp Ther* (1997); 282: 2, 1072-1083.
- Lissi, E. A., Salim-Hanna, M., Sir, T. Y Videla, L. A.: Is spontaneous urinary visible chemiluminescence a reflection of in vivo oxidative stress? *Free Rad. Biol. Med.* (1992 (1)); 12, 317-322.
- Lissi, E. A., Videla, L. A., González-Flecha, B., Giulivi, C., Boveris, A.: "Metabolic regulation in oxidative stress: an overview. In: Davies, K. J. A. (Ed.), *Oxidative damage and repair. Chemical, Biological and Medical Aspects*. Pergamon Press. New York, pp. 444-448 (1992 (2))
- Lowry, O., Resebrough, N., Farr, A. y Randall, R.: "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* (1951); 193, 265-275.
- Ohnishi, T., Ishizaki, T., Sasaki, F., Ameshima, S., Nakai, T., Miyabo, S., Matsukawa, S.: "The effect of Cu^{+2} on rat pulmonary arterial rings". *Eur J Pharmacol* (1997); 319 (1), 49-55.
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L. y Strait, K. A.: "The molecular basis of thyroid hormone action". En *Werner and Ingbar's the thyroid. A Fundamental and Clinical Text*. Editado por L. E. Braverman y R. D. Utiger. New York: Lippincott-Raven Publishers, pp. 162-184, 1996.
- Pereira, B., Costa Rosa, L. F. B. P., Safi, D. A., Bechara, E. J. H., and Curi, R.: "Control of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat lymphoid organs by thyroid hormones". *J. Endocrinol.* (1994); 140, 73-77.
- Pietrangelo, A., Gualdi, R., Casalgrandi, G., Geerts, A., De Bleser, P., Montosi, G., Ventura, E.: "Enhanced hepatic collagen type I mRNA expression into fat-storing cells in a rodent model of hemochromatosis". *Hepatology* (1994); 19, 714-721.
- Plane, F., Wigmore, S., Angelini, G. D., Jeremy, J.Y.: "Effect of copper on nitric oxide synthase and guanylyl cyclase activity in the rat isolated aorta". *Br J Pharmacol* (1997); 121 (2): 345-350.
- Reznick, A. Z. y Packer, L.: "Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay". *Methods Enzymol.* (1994); 233, 357-363.
- Searle, J. W., Kerr, J. F., y Halliday, J. W., y Powell, L. W. Iron storage disease, en *Pathology of the Liver*. Editado por R. N. M. MacSween, y P. Anthony. New York. Churchill Livingstone, pp. 181-201, 1987.
- Sen, C., Packer, L.: "Antioxidant and redox regulation of gene transcription". *FASEB* (1996); 10, 709-720.
- Sergent, O., Griffon, B., Morel, I., Chevanne, M., Dubos, M., Cillard, P., Cillard, J.: "Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture". *Hepatology* (1997); 25:1, 122-127.
- Sies, H.: "The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems". *Methods Enzymol.* (1978); 52, 48-59.
- Sies, H.: "Biochemistry of oxidative stress". *Angew. Che. Int. Ed. Engl.* (1986); 25, 1058-1071.
- Simon, K., Rodrigues, L., Rodrigues, T., Junqueira, V., Videla, L. A.: "Liver microsomal

- parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment". *Free Rad. Res.* (1998); 29, 35-42.
- Stadtman, E. R.: "Metal ion-catalyzed oxidation of protein: biochemical mechanism and biological consequences". *Free Rad. Biol.* (1990); 9, 315-325.
- Tapia, G.: "Evaluación de la actividad oxidativa en la función fagocítica de las células de K upffer en el hígado perfundido de rata: Influencia del hipertiroidismo". Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas Mención en Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (1996).
- Tapia, G., Cornejo, P., Ferreira, J., Fernández, V., Videla, L.: "Acetaminophen-induced liver oxidative stress and hepatotoxicity: influence of K upffer cell activity assessed in the isolated perfused rat liver". *Redox Report* (1997); 3, 213-218.
- Tapia, G., Pepper, I., Smok, G., and Videla, L. A.: "K upffer cell function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat". *Free Rad. Res.* (1997); 26, 267-279.
- Tapia, G., Troncoso, P., Galleano, M., Fernández, V., Puntarulo, S., and Videla, L. A.: "Time course study of the influence of acute iron overload on K upffer cell functioning and hepatotoxicity assessed in the isolated perfused rat liver". *Hepatology* (1998); 27, 1311-1316.
- Tapia, G., Cornejo P., Fernández V., Videla L.A.: "Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation". *Toxicol. Lett.*(1999).
- Taylor, B., Alarcon, L., Billiar, T.: "Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function". *Biochemistry (Mosc)* (1998); 63: 7, 766-81.
- Ungemach, F. R.: "Plasma membrane damage of hepatocytes following lipid peroxidation: involvement of phospholipase A₂". In Poli G., Cheeseman K. H., Dianzani, M. U., Slater, T. F., eds. *Free Radicals in Liver Injury*. Oxford, IRL (1985); 127-134.
- Videla, L. A. y Fernández V.: "Biochemical aspects of cellular oxidative stress". *Arch. Biol. Med. Exp.* (1988); 21, 85-92.
- Videla, L. A., Sir, T. Y Wolff, C.. "increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: supression by propylthiouracil treatment". *Free Rad. Res. Commun.* (1988); 5, 1-10.
- Videla, L. A., and Fernández, V.: "Thyroid calorigenesis and oxidative stress: modification of the respiratory burst activity in polymorphonuclear leukocytes". *Brazilian J Med Biol Res* (1994); 27, 2331-2342.
- Videla, L.A., Fernández, V., Carri n Y., Azzalis L., Bairy, A., Junqueira. V.: "Biochemical mechanisms in hepatotoxicity: Oxidative stress induced by xenobiotics and hormonal changes". *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* (1995); 47, 385-394.
- Vos, T. A., Gouw, A. S., Klok, P. A., Havinga, R., van Goor, H., Huitema, S., Roelofsen, H., Kuipers, F., Jansen, P., Moshage, H.: "Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced liver damage in rats". *Gastroenterology* (1997); 113: 4, 1323-1333.
- Whittaker, P., Hines, F., Robl, M., Dunkel, V.: "Histopathological evaluation of liver,

pancreas, spleen, and heart from iron overloaded Sprague-Dawley rats". *Toxicol Pathol* (1996); 24:5, 558-563.

Wilson, R., Chopra, M., Bradley, H., Mckillop, J. H., Smith, W. E. Y Thomson, J. A.: "Free radicals and Graves' disease: the effects of therapy". *Clin. Endocrinol.* (1989); 30, 429-433.

Zentella, M. y Saldaña, Y.: "Papel fisiológico de los radicales libres". *Bol Educ Bioq* (México, 1996); 15, 152-161.