

UCH-FC
DOC-B
F 363
C.1

**CAMBIOS MOLECULARES ASOCIADOS AL ESTRES OXIDATIVO HEPATICO
EN UN MODELO DE HIPERTIROIDISMO EXPERIMENTAL.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias



por

Virginia Fernández Arancibia

Agosto, 1992

Director de Tesis: Profesor Dr. Luis A. Videla

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

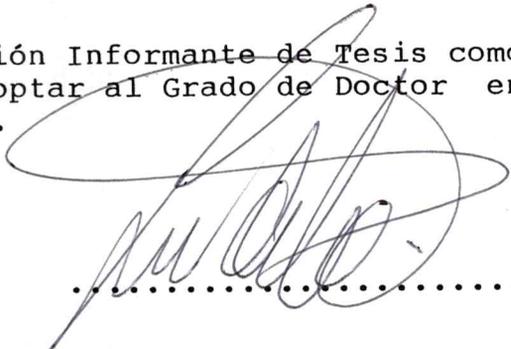
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad
de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada
por la Candidata

VIRGINIA FERNANDEZ ARANCIBIA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como
parte de los requisitos para optar al Grado de Doctor en
Ciencias con Mención Biología.

Director de Tesis:

Dr. Luis Videla



Comisión Informante:

Dr. Miguel Bronfman



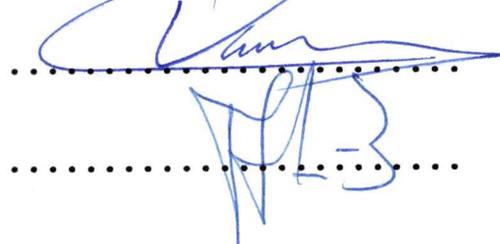
Dr. Lionel Gil



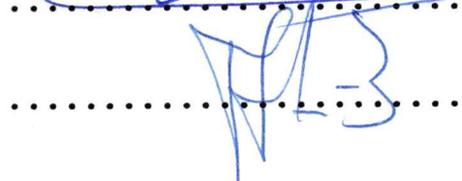
Dr. Octavio Monasterio



Dr. Alfonso Valenzuela



Prof. Fernando Zambrano



Esta tesis fue realizada en la Unidad de Bioquímica del Departamento de Ciencias Biológicas, División de Ciencias Médicas Occidente, Universidad de Chile, siendo financiada por los proyectos DTI B-1860 y B-3241, y FONDECYT 987/1989 y 1109/1991.

A mi esposo Luis

A mis hijos Patricia y Rodrigo

A la memoria de mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

Al Dr Luis Videla por su valiosa entrega de conocimientos y experiencia y por su constante labor formativa.

Al Dr Alberto Boveris por consejos y críticas, y a sus colaboradores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

A las Dras Virginia Junqueira y Silvia de Moraes-Barros, por su amistad, apoyo y valiosas críticas, y a sus colaboradores del Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad de Sao Paulo.

A los Drs Myriam Lorca, Yolanda Repetto y Jorge Ferreira por su disposición para el uso de instrumentos en sus laboratorios.

A la Sra Teresa Millán por su gran ayuda en el uso y manejo del computador.

Especialmente a la Sra Carmen Almeyda y al Sr Manuel Suárez por su valiosa colaboración en el desarrollo de todos los experimentos de esta Tesis y por el desinteresado apoyo que siempre me brindaron.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
SUMMARY.....	xxi
INTRODUCCION.....	1
A. ACCIONES BIOLOGICAS Y CELULARES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	1
1. Aspectos generales.....	1
2. Efecto calorigénico de las hormonas tiroideas.....	5
3. Otras acciones de las hormonas tiroideas.....	8
3.1. Acciones sobre la neurotransmisión.....	8
3.2. Síntesis proteica.....	8
3.3. Interacción con otras hormonas.....	8
B. EL ESTADO HIPERTIROIDEO.....	9
1. Descripción y cambios metabólicos.....	9
2. Interacción de las hormonas tiroideas con el hígado.....	12
C. ASPECTOS BIOQUIMICOS DEL ESTRES OXIDATIVO CELULAR	19
1. Reducción univalente del oxígeno.....	19
2. La lipoperoxidación en sistemas biológicos.....	21
3. Mecanismos celulares de defensa antioxidante.....	29
3.1. Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante....	30
3.2. Sistemas no enzimáticos de defensa antioxidante	32
4. Concepto de estrés oxidativo.....	37
OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y METODOS.....	44

A. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	44
1. Animales.....	44
2. Reactivos.....	44
B. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	45
C. TECNICA DE PERFUSION HEPATICA.....	46
D. OBTENCION DE BILIS.....	48
E. PREPARACION DE HOMOGENEIZADOS HEPATICOS Y FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	48
1. Homogeneizados hepáticos.....	48
2. Fraccionamiento subcelular.....	49
2.1. Obtención de mitocondrias.....	49
2.2. Obtención de partículas submitocondriales.....	50
2.3. Obtención de microsomas.....	51
F. EVALUACION DE INDICES DE LIPOPEROXIDACION.....	52
1. Medición de la quimioluminiscencia.....	52
1.1. Estudios in vivo.....	52
1.2. Estudios in vitro.....	53
2. Medición del índice TBAR.....	55
G. MEDICIONES DE RESPIRACION HEPATICA.....	56
1. Respiración microsomal.....	56
2. RSA en hígado perfundido.....	56
H. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PROOXIDATIVA MITOCONDRIAL.....	57
1. Producción de H ₂ O ₂	57
1.1. Estudios en mitocondrias intactas.....	57
1.2. Estudios en partículas submitocondriales.....	58
2. Producción de O ₂ ⁻	59
I. MEDICION DE SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE HEPATICOS.....	60
1. Sistemas enzimáticos.....	60
1.1. SOD citosólica (CuMnSOD).....	60
1.2. SOD mitocondrial (MnSOD).....	61
1.3. Catalasa.....	63
1.4. Glutación peroxidasa.....	64
2. Niveles de GSH.....	65

3. Sistemas auxiliares.....	67
3.1. Glutación reductasa.....	67
3.2. Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa.....	68
3.3. Síntesis de glutación.....	69
4. Evaluación de parámetros celulares asociados al metabolismo del glutación.....	72
4.1. Actividad de enzimas que utilizan GSH.....	72
4.1.1 Glutación transferasas.....	72
4.1.2. Gama-glutamyl-transferasa.....	73
4.2. Recambio de GSH in vivo.....	74
4.3. Eflujo de GSH.....	76
4.3.1. Eflujo sinusoidal.....	76
4.3.2. Eflujo bibliar.....	77
J. DETERMINACION DE PROTEINAS.....	78
K. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.....	78
RESULTADOS.....	80
A. EVALUACION DE LA CONDICION HIPERTIROIDEA DE LOS ANIMALES.....	80
B. EVALUACION DE PARAMETROS CELULARES ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD PROOXIDATIVA HEPATICA.....	82
1. Evaluación de la respiración, lipoperoxidación y quimioluminiscencia hepáticas.....	84
1.1. RSA hepática.....	84
1.2. Índice TBAR.....	87
1.3. Mediciones de quimioluminiscencia.....	87
1.3.1. Estudios in vivo.....	87
1.3.2. Estudios in vitro.....	91
2. Evaluación de la lipoperoxidación y de las respuestas respiratoria y quimioluminiscente de fracciones subcelulares.....	95
2.1. Estudios microsomales.....	95
2.1.1. Mediciones del índice TBAR.....	95
2.1.2. Mediciones de respiración microsomal.....	97
2.1.3. Mediciones de quimioluminiscencia.....	99
2.2. Estudios mitocondriales.....	102
2.2.1. Mediciones de quimioluminiscencia.....	102
2.2.2. Evaluación de la generación de O ₂ ⁻ . por particulas submitocondriales.....	102
2.2.3. Mediciones de la generación de H ₂ O ₂	103
C. EVALUACION DE SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE HEPATICOS.....	120

1. Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante.....	120
1.1. Actividad de SOD.....	121
1.1.1. Evaluación de la SOD citosólica.....	121
1.1.2. Evaluación de la SOD mitocondrial.....	121
1.2. Actividad de catalasa.....	124
1.3. Actividad de glutatión peroxidasa.....	124
1.3.1. Evaluación de la actividad de glutatión peroxidasa total.....	126
1.3.2. Evaluación de la actividad de glutatión peroxidasa soluble.....	126
2. Niveles de glutatión hepático.....	126
3. Sistemas enzimáticos auxiliares de defensa antioxidante.....	131
3.1. Síntesis de glutatión.....	131
3.2. Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	132
3.3. Actividad de la glutatión reductasa.....	135
 D. ESTUDIO DE PARAMETROS CELULARES ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL GLUTATION.....	 135
1. Enzimas que utilizan GSH.....	136
1.1. Evaluación de glutatión transferasas.....	136
1.2. Evaluación de la gama-glutamil transferasa.....	139
2. Eflujo de glutatión.....	143
2.1. Evaluación del eflujo sinusoidal de glutatión.....	143
2.2. Eflujo canalicular de glutatión.....	149
3. Recambio de GSH in vivo.....	151
 DISCUSION.....	 156
A. RELACION DE LA CONDICION HIPERTIROIDEA CON LA ACTIVIDAD PROOXIDATIVA HEPATICA.....	156
B. ROL DE LA MODIFICACION DE LAS ACTIVIDADES CELULARES ANTIOXIDANTES EN EL DESENCADENAMIENTO DEL ESTRES OXIDATIVO HEPATICO.....	165
C. POSIBLE ROL DE CAMBIOS EN EL METABOLISMO DEL GSH EN EL DESENCADENAMIENTO DEL ESTRES OXIDATIVO Y EN LA CALORIGINESIS TISULAR.....	170
 CONCLUSIONES.....	 177
 PROYECCIONES.....	 179
 BIBLIOGRAFIA.....	 181

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Efecto del hipertiroidismo sobre la RSA en hígado aislado y perfundido.....	85
TABLA 2. Efecto del hipertiroidismo sobre el índice y la excreción biliares de TBAR.....	89
TABLA 3. Efecto del hipertiroidismo sobre la quimioluminiscencia espontánea de homogeneizados hepáticos.....	92
TABLA 4. Efecto del hipertiroidismo sobre la quimioluminiscencia, inducida por t-BOOH, de homogeneizados hepáticos.....	94
TABLA 5. Efecto del hipertiroidismo sobre la quimioluminiscencia, inducida por t-BOOH, de fracciones subcelulares hepáticas.....	101
TABLA 6. Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad prooxidativa de mitocondrias hepáticas: generación de $O_2^{\cdot -}$ por partículas submitocondriales.....	104
TABLA 7. Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto/mg de proteína mitocondrial): efecto de succinato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción basal.....	111
TABLA 8. Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto/g hígado): efecto de succinato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción basal...	112
TABLA 9. Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto/mg de proteína mitocondrial): efecto de urato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción basal.....	113

TABLA 10.	Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto g hígado): efecto de urato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción basal...	114
TABLA 11.	Efectos netos de succinato de sodio y de urato de sodio sobre la generación de H_2O_2 mitocondrial (nmoles/minuto/mg de proteína mitocondrial).....	116
TABLA 12.	Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto /mg de proteína) por partículas submitocondriales.....	119
TABLA 13.	Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad de la SOD mitocondrial hepática.....	123
TABLA 14.	Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad de la glutatión peroxidasa hepática soluble.....	128
TABLA 15.	Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad de sistemas auxiliares de defensa antioxidante.....	133
TABLA 16.	Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal del GSH hepático en el hipertiroidismo experimental.....	145
TABLA 17.	Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal de LDH y proteínas hepáticas en el hipertiroidismo experimental.....	147
TABLA 18.	Efecto del hipertiroidismo sobre el eflujo biliar de GSH.....	150
TABLA 19.	Efecto del hipertiroidismo sobre las velocidades de recambio y eflujo fraccional de GSH hepático <i>in vivo</i>	154

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	Pág.
Esquema I. Reducción univalente del oxígeno y efectos deletéreos de las especies activas generadas.....	20
Esquema II. Proceso de lipoperoxidación.....	24
Esquema III. Mecanismos celulares de defensa antioxidante.....	31
Esquema IV. Reacciones auxiliares y mantención de niveles óptimos de los sistemas antioxidantes.....	33
Esquema V. Mantención de la viabilidad celular por integración de los sistemas defensivos, el metabolismo intermediario y el aporte dietario.....	36
Esquema VI. Balance entre mecanismos antioxidantes (A) y factores prooxidantes (P) que determinan el estado normóxico celular. Concepto de estrés oxidativo.....	39
Esquema VII. Correlación directa entre las velocidades de autooxidación y las velocidades de metabolismo basal de diversas especies de mamíferos.....	41
Esquema VIII. Equipo para estudios que utilizan la técnica de perfusión hepática.....	47
Esquema IX. Contador de fotones utilizado para la medición de la quimioluminiscencia hepática <i>in situ</i>	54
Figura 1. Efecto del hipertiroidismo sobre los niveles séricos de T ₃ en ratas.....	81
Figura 2. Efecto del hipertiroidismo sobre la temperatura rectal de la rata.....	83

Figura 3.	Relación entre ΔQO_2 (QO_2 ratas control- QO_2 ratas tratadas) y ΔRSA (RSA ratas control-RSA ratas tratadas) en hígado perfundido en el hipertiroidismo experimental.....	86
Figura 4.	Efecto del hipertiroidismo sobre el índice TBAR de homogeneizados hepáticos de ratas tratadas con T_3 durante 3 días.....	88
Figura 5.	Quimioluminiscencia del hígado <i>in situ</i> de ratas tratadas con T_3 durante 1 a 7 días.....	90
Figura 6.	Efecto del hipertiroidismo sobre el índice TBAR de microsomas hepáticos de ratas tratadas con T_3 durante 1 a 7 días.....	96
Figura 7.	Respiración microsomal hepática, en presencia de NADPH o de t-BOOH, de ratas tratadas con T_3 durante 1 y 2 días. Efecto de CN-3.....	98
Figura 8.	RMSA, en presencia de NADPH o de t-BOOH, en el hígado de ratas tratadas con T_3 durante 1 y 2 días.....	100
Figura 9.	Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de succinato de sodio 4 mM y de antimicina-A 0,18 μM	106
Figura 10.	Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de succinato de sodio 4 mM y de azida de sodio 1,3 μM	107
Figura 11.	Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de urato de sodio 30 μM y de antimicina-A 0,18 μM	108
Figura 12.	Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de urato de sodio 30 μM y de azida de sodio 10,3 μM	109

Figura 13.	Generación de H ₂ O ₂ por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T ₃ durante 3 días. Efecto neto de los inhibidores mitocondriales antimicina-A y azida de sodio.....	117
Figura 14.	Estudio cinético de los cambios en la actividad de la SOD citosólica hepática en el hipertiroidismo experimental.....	122
Figura 15.	Estudio cinético de los cambios en la actividad de la catalasa hepática en el hipertiroidismo experimental.....	125
Figura 16.	Estudio cinético de los cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa hepática en el hipertiroidismo experimental.....	127
Figura 17.	Estudio cinético de los cambios en el contenido de glutatión hepático en el hipertiroidismo experimental.....	129
Figura 18.	Estudio cinético de los cambios en las actividades específicas de las glutatión-S-transferasas, arilo y epoxi, en el hipertiroidismo experimental.....	137
Figura 19.	Estudio cinético de los cambios en las actividades totales de las glutatión-S-transferasas, arilo y epoxi, en el hipertiroidismo experimental.....	140
Figura 20.	Estudio cinético de los cambios en la actividad de la gama-glutamil transferasa en el hipertiroidismo experimental.....	141
Figura 21.	Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal de GSH hepático en el hipertiroidismo experimental.....	144
Figura 22.	Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal de LDH y proteínas hepáticas en el hipertiroidismo experimental.....	148

Figura 23. Efecto del hipertiroidismo experimental sobre la velocidad de recambio del GSH hepático..... 152

LISTA DE ABREVIATURAS

A	: absorbancia
ADP	: adenosina 5'-difosfato
Amediol	: 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol
ATP	: adenosina 5'-trifosfato
ATPasa Na ⁺ /K ⁺	: ATP fosfohidrolasa; EC 3.6.1.3.
CN-3	: cianidanol-3
cpm	: cuentas por minuto
cps	: cuentas por segundo
DFO	: desferrioxamina
DO	: densidad óptica
DTNB	: 5,5'-ditiobis(2-ácido2-nitrobenzoico)
DTT	: ditiotreitól
EDTA	: ácido etilendiaminotetracético
GSH	: glutatión reducido (gamaglutamil- cisteinil-glicina)
GSSG	: glutatión oxidado o disulfuro
h	: hora
Hepes	: ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2 etanolsulfónico
HO·	: radical hidroxilo

H ₂ O ₂	: peróxido de hidrógeno
HPLC	: cromatografía líquida de alta presión.
HRP	: peroxidasa de rábano picante
i. p.	: intraperitoneal
kV	: kilo volt
L·	: radical libre de ácido graso
LDH	: deshidrogenasa láctica
LH	: ácido graso insaturado
LO·	: radical alcoxi de ácido graso
LOO·	: radical peroxilo de ácido graso
LOOH	: mono hidroperóxido de ácido graso
MDA	: malondialdeido
MSE	: amortiguador de manitol (225 mM), sacarosa (75 mM), EDTA (0,2 mM) y Tris- HCl (5 mM) a pH 7,2
MSH	: amortiguador de manitol (220 mM), sacarosa (700 mM), Hepes (2 mM) y albúmina de bovino (0,5 g/l) a pH 7,4
MST	: amortiguador de manitol (225 mM), sacarosa (75 mM) y Tris-HCl (20 mM) a pH 7,3
NADH	: nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP	: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH	: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
N.S.	: no significativo
$O_2^{\cdot -}$: radical superóxido
1O_2	: oxígeno singlete
QO_2	: consumo de oxígeno
R^{\cdot}	: radical libre de hidrocarburo
RH	: hidrocarburo
RMSA	: respiración microsomal sensible a antioxidantes
RSA	: respiración sensible a antioxidantes
SOD	: superóxido dismutasa (superóxido: superóxido óxidoreductasa; EC 1.15.1.1)
TBA	: ácido tiobarbitúrico
TBAR	: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
t-BO $^{\cdot}$: radical terbutoxi
TCA	: ácido tricloroacético
TNB	: 5-tio-2-nitrobenzoato
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tris-HCl	: clorhidrato de Tris
T_3	: 3,5,3'-triodotironina
T_4	: 3,5,3',5'-tetraiodotironina
t-BOOH	: hidroperóxido de terbutilo
X^{\cdot}	: especie radicalaria

RESUMEN

La administración de hormona tiroidea a ratas induce una respuesta calorigénica orgánica, con incrementos en la respiración hepática, en la reducción univalente del oxígeno a nivel microsomal y en la lipoperoxidación celular. Con estos antecedentes, en esta tesis se estudian los cambios moleculares hepáticos, asociados al hipertiroidismo en la rata, que desencadenan un estrés oxidativo para el órgano.

Todos los estudios se efectúan en el hígado de ratas macho, alimentadas *ad libitum*, tratadas con dosis diarias de 0,1 mg/Kg de triiodotironina sódica durante 1 a 7 días consecutivos.

La evaluación de la respiración hepática sensible a antioxidantes y de las respuestas quimioluminiscente y lipoperoxidativa del tejido, muestran una alteración del estado normóxico celular con incrementos del índice tiobarbitúrico y de la luminiscencia tanto en el órgano *in situ*, como en la bilis y en homogeneizados del tejido. Estos cambios derivarían de incrementos drásticos, tanto del consumo de oxígeno y de la respiración microsomal sensible a antioxidantes, como de la generación peroxisomal de

peróxido de hidrógeno y de la actividad prooxidativa mitocondrial, manifestada a través de la producción de superóxidos y de peróxido de hidrógeno en este organelo.

La evaluación de la actividad celular de defensa antioxidante, señala que el tratamiento hormonal no modifica la actividad de la pareja enzimática glutatión peroxidasa-glutatión reductasa, incrementando drásticamente el aporte de NADPH al sistema, vía glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. A los 3 días de tratamiento se observa una significativa disminución de las actividades de la catalasa y de la superóxido dismutasa citosólica, que podría derivar de modificaciones de residuos esenciales y/o degradación de estas enzimas por las especies prooxidativas hepáticas incrementadas. En oposición la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial aumenta en estos animales, lo que puede representar un mecanismo de adaptación al incremento de dichas especies. En forma paralela, se observa una drástica depleción del contenido intracelular del glutatión reducido y oxidado, lo que sumado a las disminuciones de las enzimas señaladas, constituiría un factor determinante para el desencadenamiento de un estrés oxidativo hepático en estos animales.

En relación a los mecanismos responsables de la depleción hepática del glutatión reducido, el tratamiento hormonal durante 3 días incrementa en un 86% el eflujo

sinusoidal del tripéptido y en un 112% la actividad de la gama-glutamil transferasa, sin alterar el eflujo canalicular de glutatión ni las velocidades de utilización y de reposición de la biomolécula vía la pareja glutatión peroxidasa-glutatión reductasa. En concomitancia, la utilización del glutatión reducido vía glutatión-S-transferasas (arilo y epoxi) disminuye drásticamente en estos animales. Estos resultados sugieren que la depleción hepática del glutatión reducido sería mediada por aumentos del eflujo sinusoidal y de su degradación, la cual es iniciada por la gama-glutamil transferasa.

La velocidad de síntesis del tripéptido, estimada a través del recambio in vivo del mismo, aumenta significativamente, sin compensar la pérdida del metabolito por los mecanismos señalados. Debido a esto, en los animales hipertiroideos se establece un nivel de glutatión reducido intracelular de estado estable mucho más bajo que el de los animales control.

En suma, en el estado hipermetabólico hepático inducido por el hipertiroidismo, se producen cambios moleculares que conllevan el desarrollo de un estrés oxidativo para el órgano, debido al incremento de la capacidad prooxidativa hepática y a disminuciones de mecanismos clave de defensa antioxidante, entre los cuales la depleción del glutatión reducido tendría un rol crítico.

SUMMARY

Thyroid hormone administration to rats induces a calorogenic response in the animals, in parallel with increments of the hepatic respiration, microsomal univalent reduction of oxygen and cellular lipid peroxidation. In view of these considerations, the present thesis evaluates the molecular changes elicited by a hyperthyroid state in rat liver, which might trigger an oxidative condition in the organ.

The studies were carried out in livers from male rats, fed ad libitum, treated with daily doses of 0.1 mg/kg of weight of sodium triiodothyronine for 1 to 7 consecutive days.

Assessments of the hepatic antioxidant sensitive respiration and the chemiluminescent and lipid peroxidative responses of the tissue, evidence a significant alteration in the cellular normoxic state, with increments in the thiobarbituric acid index and in the luminescence of the *in situ* organ, bile samples and tissue homogenates. These changes could derive from the drastic enhancements both in the oxygen consumption and microsomal antioxidant sensitive

respiration, as well as in the peroxisomal generation of hydrogen peroxide and mitochondrial prooxidant activity, with generation of superoxides and hydrogen peroxide by this organelle.

The evaluation of the cellular antioxidant capacity shows that the hormonal treatment does not modify the activity of the enzymatic pair glutathione peroxidase/glutathione reductase, enhancing the NADPH availability to this system via glucose-6-phosphate dehydrogenase. Three days after hormone treatment, the animals show significant decrements in liver catalase and cytosolic superoxide dismutase activities, possibly resulting from modifications of essential residues and/or enzyme degradation by the enhanced generation of prooxidant species. Contrarily, mitochondrial superoxide dismutase activity is increased, a finding which could represent an adaptative mechanism to the enhanced levels of prooxidant species. In parallel, a drastic depletion of the intrahepatic content of reduced and oxidized glutathione was observed which, in addition to the decreased activities of antioxidant enzymes, could constitute a determinant for the development of an oxidative stress in the liver of these animals.

In relation to the mechanisms leading to hepatic reduced glutathione depletion, hormone treatment for 3 days

elicited an 86% enhancement in the sinusoidal efflux of the tripeptide and a 112% increase in gamma-glutamyl transferase activity, without changes in the canalicular efflux of glutathione and in the processes of utilization and reposition of the biomolecule via the enzymatic pair glutathione peroxidase/glutathione reductase. In concomitance, reduced glutathione utilization via glutathione-S-transferases (aryl and epoxide) is drastically decreased in these animals. These results are suggesting that the depletion of liver reduced glutathione could be mainly ascribed to increments in the sinusoidal efflux and in the tripeptide degradation, which is initiated by gamma-glutamyl transferase. Although the rate of hepatic glutathione synthesis, estimated in *in vivo* experiments, is drastically increased, no compensation of the metabolite depletion is attained. Thus, a significantly lower intracellular steady state level of glutathione is established in the hyperthyroid animals.

In summary, hyperthyroidism-induced liver hypermetabolic state, elicits molecular changes leading to the development of an oxidative stress in the tissue. This deleterious condition is the result of an enhancement in the prooxidant capacity of the organ, as well as the diminution of key antioxidant mechanisms, among which glutathione depletion seems to play an important role.

INTRODUCCION

A. ACCIONES BIOLÓGICAS Y CELULARES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

1. Aspectos generales.

Las hormonas tiroideas, T_4 y T_3 , han sido descritas en casi todos los vertebrados, determinándose que ellas juegan roles importantes en el desarrollo fetal, neonatal y en el de organismos adultos, modulando el metabolismo de diversos nutrientes, el transporte de aminoácidos y electrolitos dentro de la célula e incrementando la fosforilación oxidativa (Shambaugh, 1986). Los efectos de T_3 y T_4 sobre organismos fetales y neonatales están relacionados con el crecimiento, proliferación y diferenciación celulares, en tanto que los efectos sobre organismos adultos son notablemente diferentes y se relacionan con la producción de energía (Shambaugh, 1986).

Pese a que no ha sido posible describir una acción celular única de las hormonas tiroideas que permita explicar las diversas alteraciones funcionales que ocurren cuando un tejido es expuesto a ellas, se ha postulado que su

interacción con "células blanco", conducente a la expresión final de sus efectos, implicaría los siguientes eventos (De Nayer, 1987):

- i) Captación e ingreso de las hormonas tiroideas a las células.
- ii) Conversión enzimática de T_4 a T_3 por deiodinación.
- iii) Unión de T_3 a receptores nucleares específicos.
- iv) Modulación de la expresión génica.

Se ha sugerido que el ingreso de T_3 a una "célula blanco" involucraría mecanismos de transporte dependientes de energía, y que habría un intercambio rápido entre la T_3 intracelular y la T_3 extracelular (Oppenheimer, 1985; De Nayer, 1987). Por otro lado, los efectos celulares ejercidos por las hormonas tiroideas son específicos para cada tejido (Oppenheimer, 1979).

Con frecuencia se ha considerado que las acciones celulares de las hormonas tiroideas provienen de la regulación del proceso de transcripción, mediante su unión a receptores nucleares (Oppenheimer, 1979). Sin embargo, estudios más recientes apoyan la existencia de efectos extranucleares de las hormonas tiroideas, por lo que se proponen al menos 3 diferentes vías, mediadas por receptores situados en núcleo, membrana plasmática y mitocondria, las que darían cuenta de la diversidad de las acciones ejercidas por T_3 (Sterling, 1986; De Nayer, 1987).

a) Receptores nucleares: Son proteínas no histónicas presentes en la cromatina, unidas fuertemente al DNA, que presentan una alta afinidad por T_3 (constante de asociación en hígado de rata in vivo: $4,7 \times 10^{-11}$ M) y cuya síntesis puede ser regulada por la misma hormona (Shambaugh, 1986; Sterling, 1986; De Nayer, 1987). Existen receptores nucleares para T_3 , tanto en tejidos que responden calorigénicamente a ella, como el hígado, músculo esquelético y riñón, como también en cerebro, órgano que no manifiesta dicha respuesta (Oppenheimer, 1974).

A diferencia de las hormonas esteroidales, la unión de T_3 a estos receptores sería directa, sin requerir de una interacción previa entre la hormona y su receptor en el citosol (Shambaugh, 1986). Sin embargo, el transporte de T_3 desde el citosol al núcleo no sería por simple difusión sino que requeriría de un sistema estereoespecífico de transporte, dependiente de energía (Oppenheimer, 1985).

La unión de T_3 a su receptor iniciaría la transcripción de "genes blanco", específicamente afectados por las hormonas tiroideas, lo que llevaría a incrementos en la síntesis de RNAm, con cambios en el RNAm citoplasmático y en la síntesis de proteínas específicas (Shambaugh, 1986; Sterling, 1986; De Nayer, 1987). En hígado se ha descrito que la síntesis de 19 especies de RNAm (8%) sería controlada por T_3 (De Nayer, 1987).

b) Receptores en mitocondria y en membrana plasmática: Los receptores mitocondriales son sitios saturables, componentes de la membrana interna; se ha propuesto que ellos podrían estar muy relacionados o ser idénticos a la translocasa de ADP-ATP descrita por Klingenberg (Sterling, 1986). Están presentes en tejidos que responden calorigénicamente a T_3 (hígado, músculo esquelético, pulmón, intestino y tejido adiposo) y ausentes en tejidos que no lo hacen (cerebro adulto, bazo y testículo) (Sterling, 1986; De Nayer, 1987). Tanto los efectos rápidos y directos ejercidos por T_3 en hígado sobre el metabolismo energético y la producción de glucosa, que no son modificados por inhibidores de la síntesis proteica, como su efecto estimulador temprano de la respiración mitocondrial, han sido atribuidos a interacciones de la hormona con estos receptores (Sterling, 1986; De Nayer, 1987).

La unión de T_3 a receptores en membrana plasmática podría explicar sus acciones tempranas sobre el intercambio de iones, la acumulación intracelular de aminoácidos y 2-deoxiglucosa, entre otros, la activación del eflujo de Ca^{+2} desde eritrocitos y el ingreso, dependiente de energía, de T_3 a la célula (Oppenheimer, 1985; Sterling, 1986).

También se han descrito proteínas citosólicas, capaces de unir T_3 formando complejos que están en equilibrio reversible con moléculas de T_3 libre, y que retienen a la

hormona dentro de las "células blanco" (Sterling, 1986).

Por consiguiente, habría 3 vías posibles para la acción celular de las hormonas tiroideas, siendo aquéllas que utilizan los receptores de membrana plasmática y de mitocondria las que mediarían respuestas tempranas a las hormonas (dentro de las 6 primeras horas), mientras aquélla que utiliza receptores nucleares mediaría eventos tardíos (después de 24 a 48 horas).

2. Efecto calorigénico de las hormonas tiroideas.

Luego que en 1895 Adolf Magnus-Levy estableciera que existe una relación entre las hormonas tiroideas y el consumo del oxígeno, estudios a nivel celular de Tata y colaboradores señalaron que la acción calorigénica de las hormonas tiroideas estaría mediada por una inducción en la síntesis de RNA y proteínas (Shambaugh, 1986; Sterling, 1986).

Las hormonas tiroideas estimulan el consumo de oxígeno celular en el hígado, riñón y músculo, observándose que esta respuesta calorigénica disminuye con la edad del animal (Shambaugh, 1986). Estudios de Ismail-Beigi y Edelman señalan que este efecto se lograría a través de un estímulo de la bomba de Na^+ , que opera a través de una $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ unida a la membrana plasmática, mediante un incremento en el número de unidades de ésta. El mayor consumo de ATP que ello implica incrementaría las velocidades de transporte de

electrones y de fosforilación del ADP mitocondriales, con un aumento concomitante en la velocidad de consumo de oxígeno (Ismail-Beigi y Edelman, 1970). Edelman ha descrito que existiría un paralelismo entre la inducción de la ATPasa Na^+/K^+ el grado de ocupación de los receptores nucleares para T_3 y la actividad de una enzima mitocondrial hepática, la alfa-glicero fosfato deshidrogenasa, proporcionando así un mecanismo que permitiría explicar la acción calorigénica de las hormonas tiroideas (Shambaugh, 1986; Sterling, 1986).

El efecto que manifiestan las hormonas tiroideas de incrementar el número de unidades de ATPasa Na^+/K^+ de membrana plasmática parece compatible con una acción primaria de T_3 a nivel de los receptores nucleares, lo que produciría incrementos en la síntesis de un mayor número de unidades de bomba de Na^+ (Sterling, 1986). Sin embargo, los genes que codifican para la ATPasa Na^+/K^+ de membrana en cerebro, responderían sólo transitoriamente a T_3 durante los periodos fetal y neonatal, ya que pese a existir un mayor número de receptores para T_3 en cerebro de rata adulta que en hígado, dicho tejido, al ser estimulado por T_3 , no manifiesta un incremento en el consumo de oxígeno (Shambaugh, 1986).

La secuencia de eventos desencadenada por la interacción de T_3 con receptores nucleares no parece ser la única explicación posible para el efecto calorigénico de las

hormonas tiroideas. Haber y Loeb (1984) han demostrado que habría un efecto temprano (dentro de las 6 primeras horas) sobre la permeabilidad a cationes, con incrementos del eflujo pasivo de K^+ y del influjo de Na^+ . Estos hallazgos explicarían en parte los efectos estimuladores de T_3 sobre el transporte activo de cationes, e implicarían una interacción de T_3 con sitios de unión en la membrana plasmática (Sterling, 1986).

Por otro lado, Hulbert ha propuesto que las hormonas tiroideas, a través de disminuciones en el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes de membranas biológicas, disminuirían la fluidez de éstas, con la consiguiente alteración en la actividad de sistemas enzimáticos asociados a ellas, hecho que podría explicar muchos de los efectos tisulares de T_3 , incluyendo su efecto sobre el transporte activo de cationes (Hulbert, 1978).

De acuerdo a estas observaciones, el efecto calorigénico de las hormonas tiroideas podría involucrar tanto respuestas tempranas como respuestas tardías. Las respuestas tempranas estarían mediadas por la interacción de estas hormonas con receptores de membrana plasmática (intercambio de iones) y mitocondriales (estimulación directa de la respiración mitocondrial). Los eventos tardíos se desencadenarían como resultado de la interacción de las hormonas con receptores nucleares, e involucrarían una

estimulación de la síntesis de unidades de ATPasa Na^+/K^+ , provocando así un aumento en la velocidad de recambio del ATP.

3. Otras acciones de las hormonas tiroideas.

3.1. Acciones sobre la neurotransmisión. Este proceso es modulado por las hormonas tiroideas por mecanismos diferentes que incluyen (Shambaugh, 1986):

a) Cambio en los niveles de algunos neurotransmisores y/o de sus precursores (incremento del contenido de tirosina, dopamina y triptofano, y en la síntesis de acetilcolina).

b) Modificación del contenido de receptores (aumento de receptores beta-adrenérgicos y decremento de los receptores alfa-adrenérgicos y colinérgicos).

c) Variaciones en la actividad de algunas enzimas involucradas en la neurotransmisión (colina acetil transferasa, acetil colina esterasa y monoamino oxidasa).

3.2. Síntesis proteica. Este proceso es incrementado a todo nivel, siendo afectadas prioritariamente enzimas del ciclo de la urea, del metabolismo de los carbohidratos y lípidos, las enzimas lisosomales, del metabolismo de los xenobióticos y de las mismas hormonas tiroideas, como también las RNA polimerasas I y II. T_3 aumenta además la síntesis de algunas proteínas estructurales en mitocondrias y microsomas, aumentando así la masa de estos organelos (Shambaugh, 1986).

3.3. Interacción con otras hormonas. Se ha descrito que

pueden actuar en tándem con el cortisol, la prolactina, la insulina y los glucocorticoides, y controlar la síntesis de la hormona del crecimiento (Shambaugh, 1986).

En resumen, las acciones tisulares de las hormonas tiroideas ocurren por varios mecanismos, que incluyen el transporte de biomoléculas y electrolitos hacia dentro de la célula, la síntesis o activación de enzimas específicas y el incremento de procesos intracelulares clave, como la transcripción y la traducción, conducentes todos ellos a cambios en el tamaño celular, en el número de células y en la función celular.

B. EL ESTADO HIPERTIROIDEO.

1. Descripción y cambios metabólicos.

La mantención de la actividad metabólica de la mayor parte de los tejidos corporales depende del funcionamiento normal de la glándula tiroidea, que sintetiza y libera hormonas capaces de controlar diversas actividades enzimáticas tisulares (Barker, 1951). El desarrollo de un estado hipertiroideo en vertebrados, junto con producir una amplia variedad de síntomas clínicos, aumenta significativamente la velocidad del metabolismo basal de estos animales, siendo éste su efecto más significativo (Schwartz y Oppenheimer, 1978). Esta acción, conocida como calorígenes tiroidea, se caracteriza por un aumento en la velocidad del QO_2 total, el que resulta de los incrementos

individuales en el QO_2 de los "tejidos blanco" para la acción de las hormonas (Edelman, 1974; Schwartz y Oppenheimer, 1978). Estudios de Edelman y colaboradores, señalan que el aumento en el gasto energético que involucra el transporte activo de Na^+ , es capaz de mediar una fracción significativa del incremento en el QO_2 total que se obtiene en la transición del estado eutiroides al hipertiroideo (Ismail-Beigi y Edelman, 1970; Ismail-Beigi y Edelman, 1971; Schwartz y Oppenheimer, 1978; Sterling, 1979). Estimaciones de esta contribución señalan que en hígado y músculo esquelético ella sería de más de un 90% y en riñón de un 46% (Edelman, 1974; Schwartz y Oppenheimer, 1978).

Incrementos en el transporte activo de cationes se han observado también en otras condiciones, asociadas a calorígenes e incrementos en la velocidad del metabolismo basal y en la respiración celular, tales como el tratamiento con catecolaminas, el aclimatamiento al frío, la deshidratación con hipernatremia y el consumo crónico de etanol (Edelman, 1974).

Pese a que una importante fracción del incremento en el gasto energético inducido por las hormonas tiroideas, sería utilizada por la $\text{ATPase Na}^+/\text{K}^+$ de la bomba de Na^+ , este mecanismo no da cuenta del total de la respuesta calorígenica a estas hormonas, existiendo una fracción del aumento en el QO_2 no asociado al transporte activo de Na^+

(Ismail-Beigi y Edelman, 1970; Ismail-Beigi y Edelman, 1971; Edelman, 1974). Este hecho señala que otros procesos celulares, dependientes de oxígeno, podrían contribuir a la manifestación de la respuesta calorigénica, pudiendo ser ellos dependientes o independientes de la energética mitocondrial.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se ha descrito que el efecto calorigénico de T_3 en hígado, se acompaña de la estimulación de reacciones celulares que involucran la reducción univalente del oxígeno. Es así como la administración de dosis diarias de T_3 a ratas, que determina incrementos en los niveles séricos de T_3 semejantes a los observados en el hipertiroidismo humano (Videla y col., 1988), junto con producir aumentos en la temperatura corporal y en el QO_2 hepático, incrementa la velocidad de generación de O_2^- y la actividad de la NADPH oxidasa microsomales (Fernández y col., 1985). Ambos parámetros microsomales están asociados a la reducción univalente del oxígeno, proceso a través del cual se generan radicales libres y especies activas, capaces de iniciar procesos de lipoperoxidación celular con consumo de oxígeno y generación de especies de elevada citotoxicidad (Fridovich, 1978; Kappus, 1985). Los aspectos específicos de la reducción univalente del oxígeno y de la lipoperoxidación celular serán analizados en la sección C.1.

2. Interacción de las hormonas tiroideas con el hígado.

El hígado es uno de los "tejidos blanco" para la acción de las hormonas tiroideas, las que interactúan con este tejido en forma muy específica. Las interacciones de las hormonas tiroideas con el hígado involucran no sólo su metabolismo y excreción biliar, sino que además su efecto sobre vías metabólicas específicas del hepatocito, como la síntesis de ácidos biliares, y los eventos celulares que conducen a incrementos en la respiración celular (Javitt, 1978).

La administración de T_3 a animales de experimentación, induce una condición termogénica que se evidencia por aumentos significativos en la temperatura corporal y en el QO_2 hepático (Fernández y col., 1985). Se ha descrito además que la administración de hormonas tiroideas incrementa la actividad de diversas enzimas hepáticas relacionadas con procesos celulares de óxido-reducción, a nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal (Barker, 1951; Kato y Gillette, 1965; Ismail-Beigi y Edelman, 1971; Israel y col., 1973; Israel y col., 1975; Moreno y col., 1979; Just y Hartl, 1983; Haber y Loeb, 1984), lo que representaría respuestas adaptativas conducentes al incremento en la respiración tisular (Kato y Gillette, 1965; Israel y col., 1973; Edelman, 1974).

Se ha estimado que, en condiciones normales, alrededor

de un 80% del $\dot{Q}O_2$ hepático en estado estable, está relacionado con la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, en la cual la citocromo oxidasa lleva a cabo la reducción tetravalente del oxígeno molecular sin generación de intermediarios (Fridovich, 1978). Una fracción importante del 20% restante podría representar oxígeno consumido en eventos celulares que impliquen su reducción univalente. Dichos eventos ocurren principalmente en citoplasma, mitocondria y retículo endoplásmico liso, catalizados por enzimas específicas, con la generación concomitante de especies pro-oxidantes tales como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y HO^{\cdot} .

La adición de antioxidantes con capacidad atrapadora de radicales libres, tales como CN-3, ascorbato o hidroxianisol butilado, a preparaciones de hígado perfundido de rata, determina una disminución en el $\dot{Q}O_2$ sin que se produzcan alteraciones en el patrón respiratorio mitocondrial o en la velocidad glicolítica celular (Videla, 1984a). Este hallazgo representa una RSA basal, y su magnitud corresponde a un 5 a 7% del total del oxígeno consumido (Videla, 1984a). En el estudio mencionado se sugirió que la RSA basal representaría un componente respiratorio del $\dot{Q}O_2$ hepático, que es eliminado por antioxidantes, y que podría estar relacionado con el oxígeno utilizado ya sea en reacciones de transferencia de un electrón, o en la mantención de índices

basales de lipoperoxidación, o en ambos (Videla, 1984a). La adición de agentes prooxidantes, de manifiesta toxicidad a nivel hepático, incrementa drásticamente este parámetro respiratorio, lo que estaría señalando que, como resultado de la interacción de dichos agentes con el hígado, se favorecería la producción de especies radicalarias intermediarias de la reducción univalente del oxígeno, con el concomitante incremento de la RSA (RSA químicamente inducida) (Videla, 1984b). Estos hallazgos han servido de base para postular que la interacción de T_3 con el hígado podría conducir en forma similar a incrementos en la RSA basal de este tejido, considerando los efectos estimuladores de T_3 sobre la reducción univalente del oxígeno ya descritos (Fernández y col., 1985). En teoría, el incremento en la respiración hepática observado en animales hipertiroideos, podría atribuirse a aumentos en el QO_2 mitocondrial, microsomal y peroxisomal. Estas actividades podrían involucrar una estimulación de reacciones de utilización del oxígeno mediante su reducción univalente, contribuyendo así este tipo de procesos a la respuesta calorigénica observada en los animales hipertiroideos.

a) Efectos mitocondriales de las hormonas tiroideas. Al parecer algunos de los efectos de T_3 sobre mitocondrias no requieren de incrementos en la capacidad sintética nuclear. Se ha descrito que existiría un componente en la membrana

mitocondrial que une T_3 en forma específica, con sitios saturables, de alta afinidad (constante de asociación 10^{11} M^{-1}) (Sterling, 1979). La administración de T_3 o T_4 a animales tiroidectomizados, restituye la capacidad oxidativa mitocondrial de estos animales, junto con incrementar la captación de ADP, la velocidad de metabolismo basal y el $\dot{Q}O_2$ en forma proporcional (Tata y col., 1962; Sterling, 1979). En animales hipertiroideos se observa además la síntesis de una nueva población de mitocondrias con aumento en el número, tamaño y capacidad respiratoria (Sterling, 1986), junto a incrementos en el contenido de citocromo c y en las actividades de algunas enzimas mitocondriales hepáticas como citocromo-c oxidasa y succínico oxidasa (Barker, 1951).

Se ha señalado que mitocondrias aisladas de corazón de bovino en estado 4, pueden generar O_2^- y H_2O_2 a velocidades que representan alrededor del 2% del $\dot{Q}O_2$ total en condiciones fisiológicas (Turrens y Boveris, 1980). Más aún, la perfusión de hígados de rata normal con altas concentraciones de 2,4-dinitrofenol, ha permitido visualizar un componente respiratorio mitocondrial sensible a antioxidantes, que representa un 13% del $\dot{Q}O_2$ total del órgano, lo que sugiere que el incremento en la respiración, por efecto del desacoplante, estaría mediado en parte por algún componente mitocondrial asociado a la reducción univalente del oxígeno (Videla, 1984a). Los datos obtenidos

de los trabajos señalados, permiten sugerir que el efecto de las hormonas tiroideas sobre la respiración celular podría involucrar la estimulación de reacciones mitocondriales de transferencia de un electrón.

b) Efectos peroxisomales de las hormonas tiroideas. Se ha encontrado que la administración de hormonas tiroideas a ratas induce una proliferación de estos organelos en forma de microperoxisomas, lo que implica una remodelación del compartimento peroxisomal hepático (Fringes y col., 1982; Just y col., 1982). En estas condiciones, se han descrito incrementos de 61% en la actividad de la D-aminoácido oxidasa y de 250% en actividad de la beta-oxidación peroxisomal de ácidos grasos, ambos sistemas relacionados con la generación de H_2O_2 (Chance y col., 1979; Just y col., 1982; Just y Hartl, 1983), en concomitancia con incrementos de 32% en la actividad de la catalasa (Just y col., 1982). Pese a que no se ha descrito producción de $O_2^{\cdot-}$ o de HO^{\cdot} durante la producción peroxisomal de H_2O_2 (Chance y col., 1979), se ha sugerido que estos cambios inducidos por las hormonas tiroideas en la estructura y función peroxisomal, podrían contribuir tanto al aumento en el QO_2 celular como a la producción de calor que se observan en el estado hipertiroideo (Just y Hartl, 1983).

c) Efectos microsomales de las hormonas tiroideas. El uso de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, como la

antimicina-A, ha permitido estimar que alrededor de un 20% del total de la respiración celular es insensible a éstos. Una fracción importante de esta respiración insensible a antimicina-A podría atribuirse a procesos microsomales de transferencia de electrones que implican la reducción univalente del oxígeno. Dichas reacciones están involucradas en el metabolismo de xenobióticos, proceso en el cual participan la hemoproteína citocromo P-450, desempeñando un rol central, la NADPH-citocromo P-450 reductasa, NADH-citocromo b₅ reductasa y el NADPH (Estabrook y Werringloer, 1977). Como intermediario de las reacciones microsomales de oxidación de función mixta que ocurren en el metabolismo de los xenobióticos, se forma un complejo ternario, el oxicitocromo P-450 ($\text{Fe}^{+2}-\text{O}_2\text{-xenobiótico}$) cuya disociación podría generar la forma férrica de la hemoproteína con la concomitante liberación de O_2^- de cuya dismutación, ya sea espontánea o vía SOD, se podría generar H_2O_2 (Estabrook y Werringloer, 1977). Por otro lado, H_2O_2 podría también derivar de la disociación de otro intermediario, correspondiente a la forma $\text{Fe}^{+3}-\text{O}_2^{-2}\text{-xenobiótico}$ (Estabrook y Werringloer, 1977). La proporción en que se obtendrían estas especies activas del oxígeno va a depender de la presencia de sustratos microsomales y del tipo de unión de éstos al citocromo P-450 (Estabrook y Werringloer, 1977).

En concomitancia con el desarrollo de una mayor

capacidad oxidativa hepática, en el estado hipertiroideo se produce una proliferación del retículo endoplásmico liso de este tejido, junto a una serie de alteraciones en las funciones microsomales relacionadas con reacciones de transferencia de electrones, dependientes de NADPH (Israel y col., 1973; Szilagyi y col., 1978). Es así como se han descrito incrementos drásticos en la actividad de la NADPH-citocromo P-450 reductasa (Phillips y Langdon, 1956; Tata y col., 1962; de Araujo y col., 1982), una de las enzimas clave en el metabolismo de xenobióticos (Estabrook y Werringloer, 1977), hallazgos que concuerdan con incrementos en el metabolismo de xenobióticos como la antipirina (Eichelbaum y col., 1974), la zoxazolamina y la anilina (Conney y Garren, 1961; Kato y Gillette, 1965), en el sistema microsomal que metaboliza etanol (Moreno y col., 1979) y en la reducción microsomal de delta⁴-3 cetoesteroides (McGuire y Thomkins, 1959). De la misma manera, ratas tiroidectomizadas y tratadas durante 7 días con dosis que fluctúan entre 0,05 y 0,50 mg de T₄ por Kg de peso, manifiestan incrementos en la actividad de la NADPH-citocromo P-450 reductasa y en el metabolismo de diversos xenobióticos (Rumbaugh y col., 1978). Además de estos resultados, la administración de T₃ y T₄ a ratas produce incrementos significativos en la actividad de la NADPH oxidasa microsomal (Kato y Takahashi, 1968; Israel y col.,

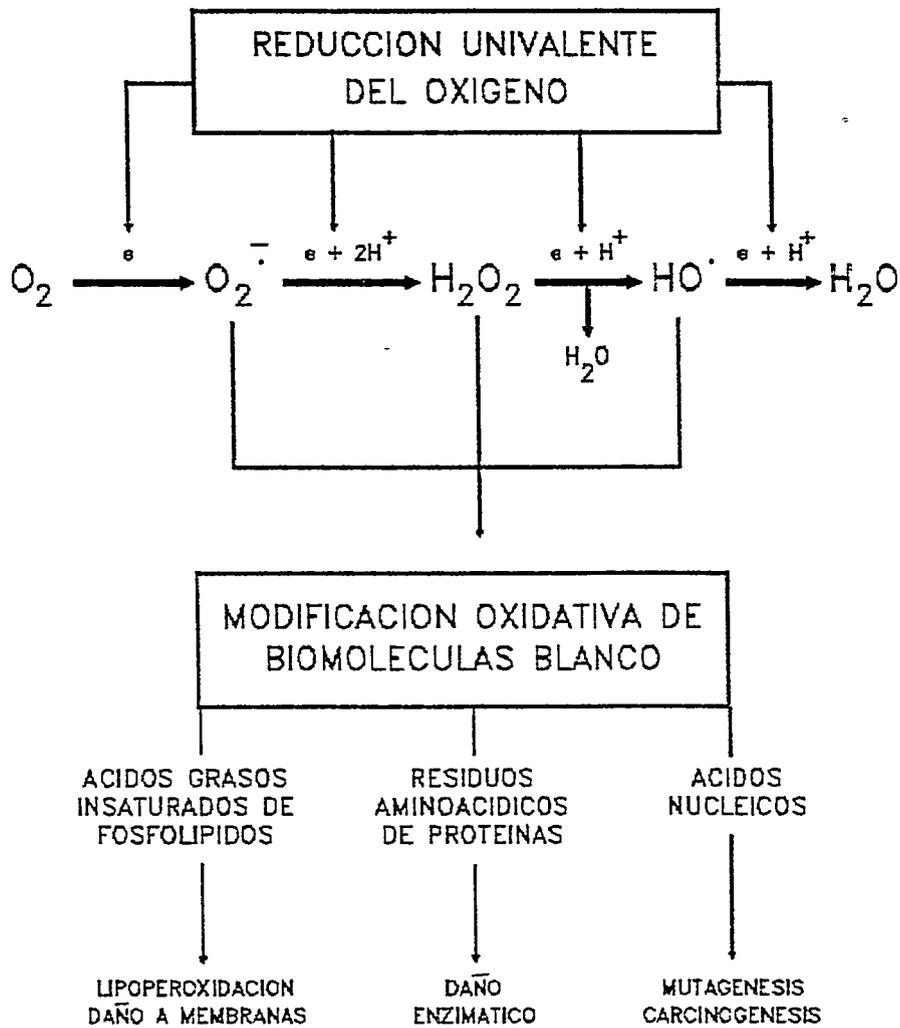
1973; Fernández y col., 1985), y en la velocidad de generación de $O_2^{\cdot -}$ por esta fracción subcelular (Fernández y col., 1985). La actividad de la NADPH oxidasa representa la capacidad máxima de la fracción microsomal hepática para oxidar aeróbicamente al NADPH, en ausencia de xenobióticos, con la generación concomitante de $O_2^{\cdot -}$ (Fong y col., 1973), lo que estaría de acuerdo con los hallazgos mencionados.

Estos resultados indican que en el estado hipertiroideo, el aumento en la respiración hepática estaría asociado a una mayor capacidad oxidativa microsomal, la que conduciría a la producción de $O_2^{\cdot -}$ y tal vez a la de otras especies activas derivadas del oxígeno, todo lo cual podría incrementar el proceso lipoperoxidativo celular.

C. ASPECTOS BIOQUIMICOS DEL ESTRES OXIDATIVO CELULAR.

1. Reducción univalente del oxígeno.

Debido a la naturaleza aeróbica del metabolismo celular, la reducción del oxígeno es un evento de gran importancia para los sistemas biológicos. De acuerdo al principio de exclusión de Pauli, la estructura electrónica del oxígeno molecular en su estado basal contempla la presencia de 2 electrones no apareados en el orbital $2p\pi$. Por esta razón, las reacciones químicas de reducción del oxígeno molecular corresponderían a etapas sucesivas de transferencia de un electrón, lo que conduciría a la formación de intermediarios de naturaleza radicalaria y no



Esquema I. Reducción univalente del oxígeno y efectos deletéreos de las especies activas generadas.

radicalaria de gran reactividad química (Esquema I) (Sies, 1986).

Las formas reactivas radicalarias del oxígeno son el $O_2^{\cdot -}$ y el HO^{\cdot} , de reconocida importancia en procesos químicos, fotoquímicos y electroquímicos, como lo es la reacción de descomposición del H_2O_2 por Fe^{+2} , según lo descrito por Haber y Weiss (Sies, 1986). El H_2O_2 corresponde a una especie reactiva del oxígeno de naturaleza no radicalaria. Estas especies son capaces de interaccionar con diversas biomoléculas provocando alteraciones estructurales y de sus funciones asociadas (Esquema I) (Kappus, 1985; Sies, 1986). Dentro del área de mayor interés en los fenómenos radicalarios, se encuentran las reacciones de oxidación de los ácidos grasos constituyentes de los fosfolípidos de las membranas biológicas, proceso conocido como lipoperoxidación (Esquema II) (Chance y col., 1979; Sies, 1986).

2. La lipoperoxidación en sistemas biológicos.

Este proceso consiste en la oxidación inespecífica de los ácidos grasos poliinsaturados, constituyentes de membranas biológicas. Una vez iniciado, él es capaz de proseguir vía mecanismos que utilizan reacciones radicalarias, con liberación de una serie de productos de degradación estables (Kappus, 1985; Sies, 1986). Se ha sugerido que este proceso sería responsable de numerosas

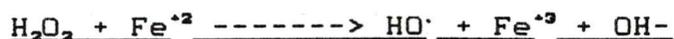
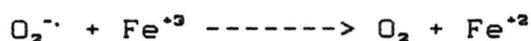
alteraciones celulares (Kappus, 1985).

Dentro de las especies radicalarias capaces de iniciar este evento, las del oxígeno son de particular importancia por cuanto ellas son producidas durante el metabolismo oxidativo en todo tipo de organismos aeróbicos (Kappus, 1985; Wills, 1985; Sies, 1986). No se han identificado las especies reactivas derivadas del oxígeno que iniciarían la lipoperoxidación a nivel celular; se supone que $O_2^{\cdot -}$ tendría un rol importante, pero su reactividad química no le permitiría abstraer un átomo de hidrógeno desde el grupo metileno de un ácido graso insaturado para así iniciar la cadena de reacciones (Kappus, 1985). Sin embargo, de acuerdo a lo descrito por Haber y Weiss, $O_2^{\cdot -}$ al interactuar con H_2O_2 , que es el producto de su dismutación, y en presencia de metales de transición (Fe^{+3} o Cu^{+2}) puede generar al radical OH^{\cdot} , especie altamente reactiva, cuya capacidad para peroxidar lípidos ha sido demostrada en sistemas químicos (Kappus, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1986). Así, las reacciones que conducirían a la obtención de una especie iniciadora del proceso lipoperoxidativo en dichos sistemas serían las siguientes:

i) Dismutación del $O_2^{\cdot -}$, espontánea o catalizada por la SOD:



ii) Reacción de Haber-Weiss, que ocurriría en 2 etapas, siendo la segunda una reacción tipo Fenton:



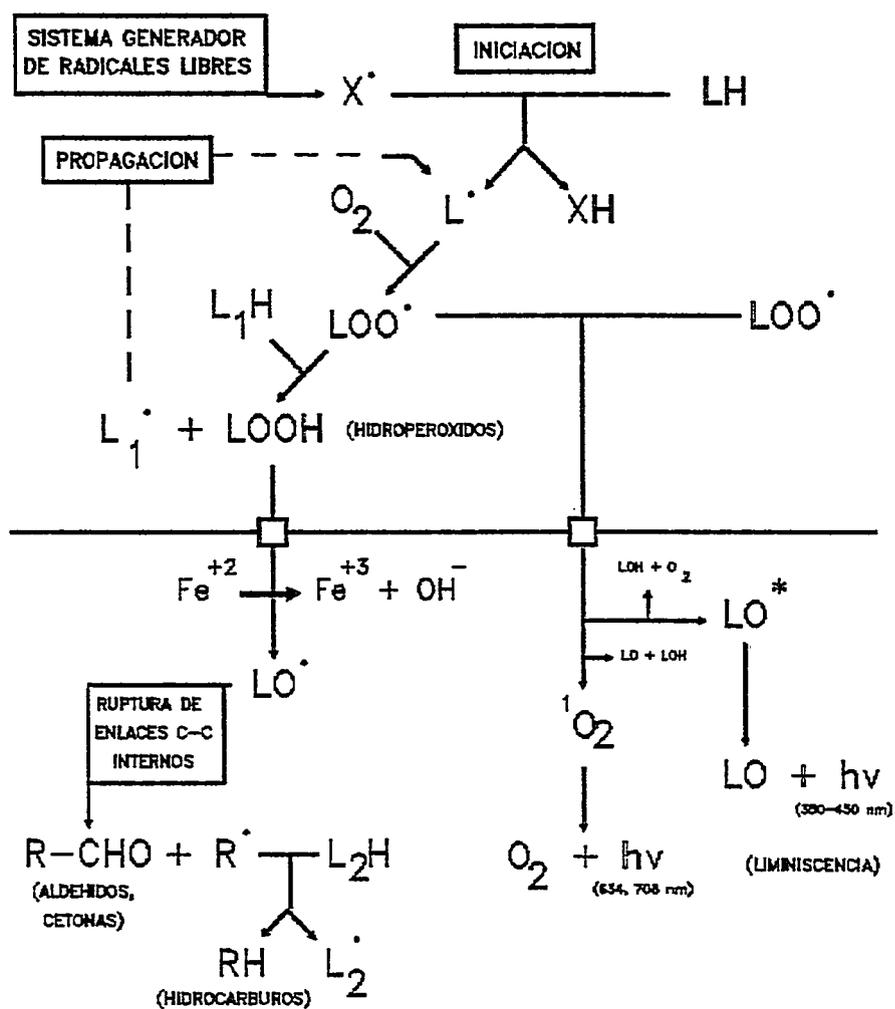
El HO[·] puede ser también producido como consecuencia de la interacción del radical semiquinona, derivado de la oxidación de compuestos quinonoides como la ubiquinona, con H₂O₂ (Kappus, 1985):



Otras especies que se han postulado como iniciadoras de la lipoperoxidación, serían el ión perferrilo o Fe⁺³O₂^{·-} y el ¹O₂. El primero es un complejo que se forma por la interacción del oxígeno con Fe⁺², posiblemente complejado, y el segundo corresponde al estado excitado del oxígeno molecular (Kappus, 1985).

Así, la cadena de reacciones radicalarias del proceso lipoperoxidativo, como lo muestra el Esquema II, es la siguiente:

- i) El proceso lo inicia una X[·], mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno desde un ácido graso insaturado (LH, L₁H ó L₂H en el Esquema II).
- ii) El L[·], así formado podría reaccionar con oxígeno molecular, generando un LOO[·] (Esquema II).
- iii) El LOO[·] obtenido, puede iniciar una cadena de reacciones radicalarias, mediante la abstracción de un hidrógeno desde otra molécula de ácido graso (L₁H), con la



Esquema II. Proceso de lipoperoxidación.

consiguiente propagación del proceso por parte de la nueva especie radicalaria formada, L_1 y la generación de LOOH (Esquema II).

iv) LOOH puede romperse espontáneamente, mediante calor o en presencia de catalizadores metálicos (Fe^{+2}), iniciando así más reacciones radicalarias en cadena con generación de $LO\cdot$ (Esquema II). Por lo tanto, los iones metálicos tienen una importante participación en este proceso, habiendo sido ella demostrada en sistemas *in vitro* (Kappus, 1985, Wills, 1985; Burton e Ingold, 1989). La descomposición de los hidroperóxidos es posiblemente la causa principal de la toxicidad celular que produce la lipoperoxidación (Wills, 1985).

v) $LO\cdot$ puede sufrir ruptura de enlaces C-C dentro de su estructura, generando así aldehídos de ácidos grasos insaturados ($R-CHO$) y $R\cdot$ (Esquema II) (Esterbauer y col. 1991); al iniciar éstos nuevas cadenas radicalarias de reacciones, pueden generar RH del tipo alcanos (etano, propano, n-butano. n-pentano) y alquenos (Esquema II) (Kappus, 1985). Tanto los aldehídos como los hidrocarburos constituyen productos finales del proceso de lipoperoxidación (Sies, 1986).

En sistemas biológicos que experimentan lipoperoxidación, se formarían radicales de endoperóxidos que darían origen, previo reordenamiento intramolecular y

posterior interacción con el oxígeno, a MDA, producto final de este proceso que se puede estimar en el laboratorio mediante técnicas espectrofotométricas (Kappus, 1985). Experimentos de autooxidación de ácidos grasos insaturados o fosfolípidos, han detectado muchos otros productos, tales como hidroxiacidos, epóxidos, cetonas, polihidroperóxidos, dímeros y polímeros de ácidos grasos, todos los cuales se formarían en diferentes reacciones de la cadena radicalaria; sin embargo no todos ellos han sido identificados en sistemas biológicos (Kappus, 1985).

Los eventos más importantes de la lipoperoxidación son las reacciones de propagación de la cadena radicalaria. El término de ésta puede producirse por la interacción de 2 radicales (Kappus, 1985), como también por la abstracción de un átomo de hidrógeno por una especie radicalaria desde alguna molécula que no sea un ácido graso, la que actuaría como un antioxidante formando compuestos estables (Kappus, 1985; Wills, 1985). Si las reacciones de propagación prosiguieran, se podría llegar a la destrucción de todas las fases lipídicas, en particular de las membranas biológicas por fragmentación de las cadenas de ácidos grasos insaturados constituyentes de fosfolípidos estructurales, con ruptura de membranas plasmáticas y de organelos (Kappus, 1985; Wills, 1985). Además, algunos de los productos finales de la lipoperoxidación, como 2-alquenes y 4-

hidroxinonales, pueden reaccionar con muchas biomoléculas que poseen grupos sulfidrilos, produciéndose así una citotoxicidad adicional (Wills, 1985; Esterbauer y col., 1991).

Por otro lado, los LOO \cdot pueden participar en reacciones de recombinación con generación de estados electrónicamente excitados, tales como el 1O_2 y los carbonilos excitados (LO * en el Esquema II) (Cadenas, 1985), el último de los cuales podría iniciar eventos lipoperoxidativos (Kappus, 1985; Sies, 1986). Estos estados excitados decaen al estado energético basal, generando luz de longitudes de onda características (Esquema II), cuya emisión puede ser detectada y correlacionada con otros parámetros lipoperoxidativos (Cadenas, 1985).

En sistemas biológicos, el retículo endoplásmico liso es el organelo más susceptible a la lipoperoxidación, tanto por ser un buen sustrato peroxidable como por poseer actividades enzimáticas que inician el proceso (Kappus, 1985). La lipoperoxidación inducida por enzimas microsomales es específica por NADPH, siendo las enzimas del sistema metabolizante de drogas las que están involucradas en la iniciación de este proceso. El sistema NADPH-citocromo P-450 reductasa, en presencia de Fe $^{+3}$ y de oxígeno, posiblemente por la reducción de Fe $^{+3}$ a Fe $^{+2}$ ya sea directamente por la enzima o por el O $_2^{\cdot-}$ liberado por el

sistema enzimático, estaría involucrado. Debido a que la adición de catalasa a preparaciones microsomales no inhibe el proceso lipoperoxidativo, se concluye que la participación de Fe^{+2} no sería a través de una reacción tipo Haber-Weiss y que los $OH\cdot$ no participarían en este procesos (Kappus, 1985). Por otro lado y como ya fuera señalado en la sección B.2.c, la cadena de reacciones del citocromo P-450 podría estar también involucrada en la lipoperoxidación microsomal, a través del fenómeno de desacoplamiento provocado por algunas drogas, conducente a la liberación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , sin la hidroxilación de aquéllas (Kappus, 1985; Estabrook y Werringloer, 1977).

La susceptibilidad del retículo endoplásmico liso a la lipoperoxidación puede ser modulada por cambios en el grado de insaturación de los ácidos grasos de membranas microsomales, siendo los ácidos grasos de la serie ómega-3 los más susceptibles a este proceso (Wills, 1985). La relación entre la composición lipídica y la lipoperoxidación microsomal explicaría la diferencia, en cuanto a sensibilidad a la peroxidación, que se manifiesta entre diversas especies, como también los distintos niveles de lipoperoxidación microsomal que se encuentran entre los órganos (Kappus, 1985).

La lipoperoxidación de la fracción mitocondrial puede ser iniciada tanto por mecanismos no enzimáticos como por

adición de enzimas que lo catalicen. La cadena transportadora de electrones está involucrada en la lipoperoxidación mitocondrial enzimática, dependiente de la presencia de iones de hierro. Sin embargo el mecanismo de iniciación no se ha estudiado en detalle. Es posible que las enzimas mitocondriales sean capaces de efectuar la reducción de Fe^{+3} en forma similar a lo que ocurre en los microsomas (Kappus, 1985).

En el citosol existe un cierto número de enzimas que podrían estar involucradas en la iniciación del proceso. El ejemplo más estudiado es el de la xantina oxidasa, que produce $O_2^{\cdot -}$ en presencia de xantina, acetaldehído u otros sustratos (Kappus, 1985).

3. Mecanismos celulares de defensa antioxidante.

Uno de los prerequisites de los organismos aeróbicos es el de poseer una capacidad para detoxificar las especies reactivas del oxígeno, contrarrestando así los efectos peroxidativos deletéreos de éstas. Tal capacidad reside en diversos sistemas de defensa, comúnmente denominados "antioxidantes", que proporcionan esta protección al actuar en distintas etapas del proceso peroxidativo, mediante las siguientes acciones (Sies, 1986; Burton e Ingold, 1989):

i) Prevención de la formación de nuevas especies radicalarias, por reducción de la velocidad de iniciación de nuevas cadenas de reacciones, lo que constituye una línea de

defensa primaria.

ii) Intercepción de una o más de las etapas de propagación del proceso lipoperoxidativo por interacción directa con los radicales, constituyendo una línea de defensa secundaria.

Dentro de los antioxidantes celulares se incluyen sistemas de defensa de carácter enzimático y sistemas no-enzimáticos, siendo estos últimos también conocidos como atrapadores de especies radicalarias.

3.1. Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. Están constituidos por las enzimas SOD y por diversas peroxidasas como la catalasa ($H_2O_2:H_2O_2$ óxidoreductasa; EC 1.11.1.6) y la glutatión peroxidasa (glutatión: peróxido de hidrógeno óxidoreductasa; EC 1.11.1.9). Son sistemas ampliamente distribuidos en la naturaleza, con una dependencia específica de metales, como cobre, manganeso hierro y selenio; presentan una localización específica, tanto a nivel de tejidos como a nivel subcelular, gracias a la cual a menudo se complementan en sus acciones defensivas (Sies, 1986).

Las enzimas SOD (CuZnSOD y MnSOD), identificadas por McCord y Fridovich, son casi ubicuas, localizándose tanto en citosol, como en mitocondria; catalizan la remoción del $O_2^{\cdot-}$, mediante su dismutación a H_2O_2 (Esquema III) previniendo así la acción tóxica de esta especie radicalaria (McCord y Fridovich, 1969; Fridovich, 1978). La mayor parte de la

Mecanismos	k (M ⁻¹ seg ⁻¹)	Ubicación
1.- Sistemas enzimáticos		
* 2 O ₂ ⁻ + 2H ⁺ $\xrightarrow[\text{DISMUTASA}]{\text{SUPEROXIDO}}$ H ₂ O ₂ + O ₂	2x10 ⁹	Citosol Mitocondria
* 2H ₂ O ₂ $\xrightarrow[\text{CATALASA}]{} \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	2,6x10 ⁷	Peroxisoma
* LOOH $\xrightarrow[\text{PEROXIDASA}]{\text{GLUTATION}}$ LOH + GSSG + 2GSH $\xrightarrow{\quad\quad\quad} \quad\quad\quad + \text{H}_2\text{O}$	2x10 ⁸	Citosol Mitocondria
2.- Atrapadores de radicales libres		
* 2GSH + 2O ₂ ⁻ + 2H ⁺ \longrightarrow GSSG + 2H ₂ O ₂	7,7x10 ⁵	Fase acuosa
* vit-E + HO [·] \longrightarrow vit-E [·] + H ₂ O	1x10 ¹⁰	Membranas
* vit-C + HO [·] \longrightarrow vit-C [·] + H ₂ O	1x10 ¹⁰	Fase acuosa
3.- Apagadores de especies excitadas		
* β-Caroteno + ¹ O ₂ \longrightarrow -C [*] + O ₂	3x10 ¹⁰	Membranas
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>-C + calor</p> <p>DECAIMIENTO</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Todo-trans- -C</p> <p>ISOMERIZACION</p> </div> </div>		

Esquema III. Mecanismos celulares de defensa antioxidante.

actividad de la CuZnSOD de hígado de rata se encuentra en el citosol, con una menor proporción en lisosomas y posiblemente entre las membranas mitocondriales interna y externa, en tanto que la actividad de la MnSOD reside en la matriz mitocondrial (Halliwell y Gutteridge, 1986).

La catalasa es una proteína hémica, presente en la mayor parte de los tejidos de los animales, concentrándose preferentemente en hígado y en eritrocitos, y a nivel subcelular en la matriz peroxisomal, donde cataliza la descomposición del H_2O_2 (Esquema III) (Sies, 1986; Halliwell y Gutteridge, 1986), posibilitando así su remoción y complementando su acción antioxidante con la de la SOD.

Las glutatión peroxidasas son seleno-enzimas que manifiestan una elevada actividad en hígado y que, utilizando como sustrato a GSH, catalizan la oxidación de este tripéptido a GSSG a expensas de H_2O_2 o de otros peróxidos, como aquéllos derivados de la lipoperoxidación (LOOH, Esquema III) (Halliwell y Gutteridge, 1986). Así, estas enzimas contribuyen a la remoción de diversos peróxidos orgánicos y a la vez complementan la acción de la catalasa en tejidos en los que esta enzima posee una baja actividad (Halliwell y Gutteridge, 1986).

3.2. Sistemas no enzimáticos de defensa antioxidante. Comprenden moléculas atrapadoras de radicales libres y de especies excitadas tales como el tripéptido GSH, la vitamina

Comentarios

1.- Procesos preventivos

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> * Enzimas de conjugación (GSH-, sulfo- y glucuronil-transferasas) * NADPH-quinona óxidoreductasa
 * Epóxido hidrolasa
 * Quelación de iones metálicos (Ferritina, metalotioneinas) | <p>Eliminación de intermediarios activos</p> <p>Reducción bivalente de quinonas que evita la formación de radicales semiquinina vía reducción univalente</p> <p>Conversión de epóxidos en derivados dihidroxidíoles estables</p> <p>Prevención de reacciones radicalarias inducidas por hierro y cobre</p> |
|---|--|

2.- Mantenición de niveles de estado estable óptimos de componentes

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> * Enzimas/proteínas
 * Glutación (GSH)
 * Suministro dietario | <p>Mantenición por síntesis continua, susceptible de adaptación en exposición prolongada a estímulos tóxicos</p> <p>a) Biosíntesis de novo por la γ-glutamilcisteinil y la GSH-sintetasas, con suministro de cisteína por la vía del cistatión, b) reducción del GSSG por la glutación reductasa, con suministro de NADPH por la vía de las pentosas y reacciones auxiliares</p> <p>Vitaminas (E, C, β-caroteno), minerales (Cu, Zn, Mn, Se, Fe), aminoácidos y ácidos grasos esenciales, y combustibles metabólicos</p> |
|---|---|

Esquema IV. Reacciones auxiliares y mantención de niveles óptimos de los sistemas antioxidantes.

E o alfa-tocoferol, la vitamina C o ácido ascórbico y el beta-caroteno.

Debido a su carácter liposoluble, el alfa-tocoferol se inserta en membranas biológicas e interactúa directamente con las cadenas insaturadas de los ácidos grasos; por tal motivo esta vitamina es considerada el principal antioxidante liposoluble atrapador de especies radicalarias tanto a nivel tisular como a nivel plasmático (Sies, 1986; Burton e Ingold, 1989). Como resultado de su acción antioxidante, la vitamina E genera a su vez un radical cromanoxilo (Esquema III) que puede ser reconvertido a vitamina E gracias a la acción atrapadora de especies radicalarias ejercida por vitamina C (Sies, 1986).

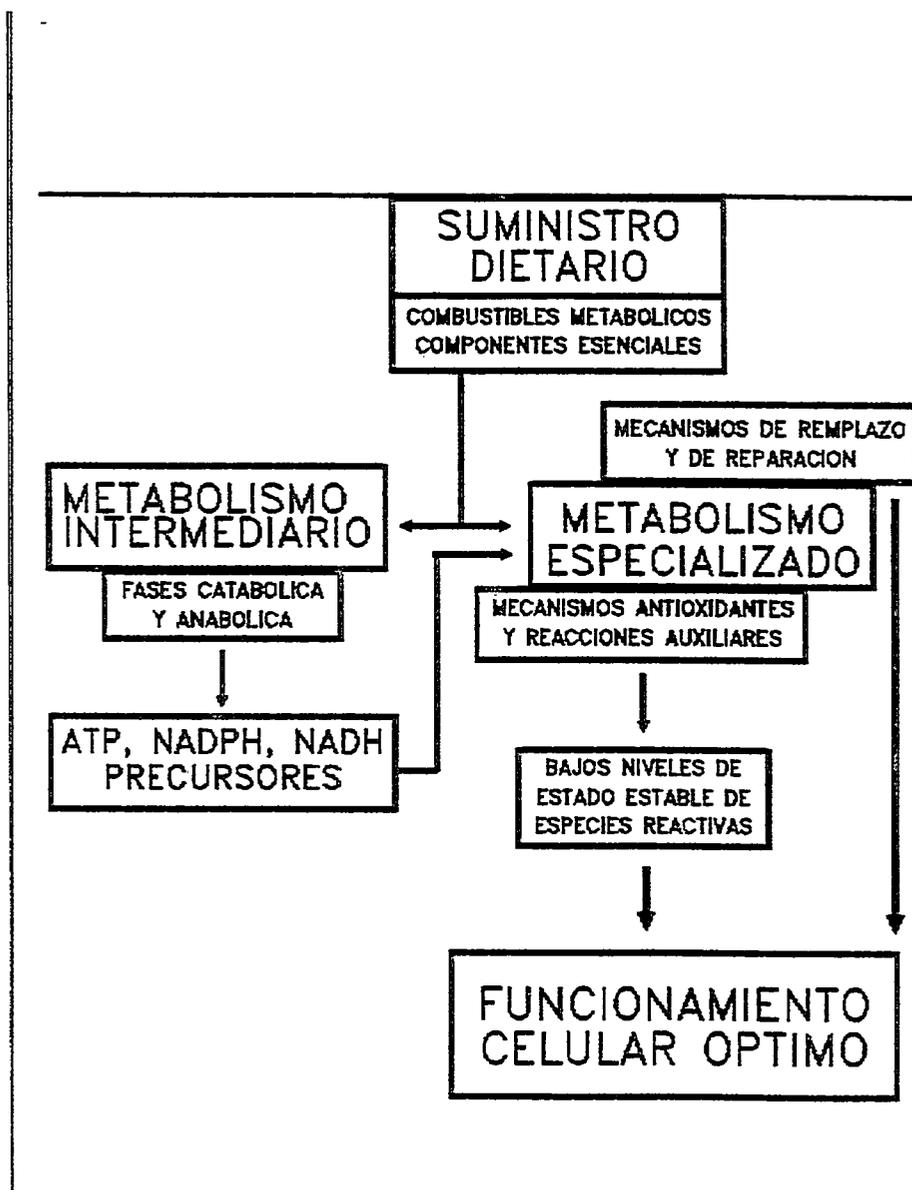
El ácido ascórbico es un compuesto hidrosoluble con carácter reductor, debido al cual puede participar *in vivo* en la detoxificación de 1O_2 , HO^{\cdot} y radicales orgánicos, como el radical cromanoxilo, generando un radical semidehidroascorbato (Esquema III), (Halliwell y Gutteridge, 1986; Sies, 1986). La recuperación del ascorbato puede ocurrir por disproporción del radical semidehidroascorbato y también por su reducción con GSH, en presencia de la dehidroascorbato reductasa (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Debido a su alta concentración intracelular, el GSH es el principal antioxidante hidrosoluble, al actuar como

sustrato de la glutatión peroxidasa (Esquema III) y de la dehidroascorbato reductasa, como también al atrapar directamente especies reactivas del oxígeno, como el $^1\text{O}_2$ y el HO^\cdot (Esquema III) (Halliwell y Gutteridge, 1986; Sies, 1986; Akerboom y Sies, 1990). Como estas reacciones involucran su oxidación a GSSG, la exposición de un tejido a altas concentraciones de H_2O_2 y/o de HO^\cdot conlleva una disminución en la relación GSH/GSSG (mayor que 10,0 en hígado de rata), y a diversas perturbaciones metabólicas, ya que el GSSG es un inhibidor de la síntesis proteica e inactivador de algunas enzimas (Halliwell y Gutteridge, 1986; Sies, 1986).

A nivel de membranas, el beta-caroteno constituye un importante apagador de especies excitadas como el $^1\text{O}_2$, capaz de formar dioxetanos inestables al adicionarse a los dobles enlaces de los ácidos grasos. El $^1\text{O}_2$ interactúa con el beta-caroteno decayendo a su nivel energético basal, y la energía transferida al beta-caroteno es liberada como calor o provoca una isomerización interna (Esquema III) (Sies, 1986; Burton e Ingold, 1989).

Los mecanismos celulares de defensa antioxidante descritos poseen dos características fundamentales: (a) tienen una ubicación subcelular complementaria a los sitios de generación de especies activas del oxígeno y (b) son extremadamente eficientes al tener constantes bimoleculares



Esquema V. Mantención de la viabilidad celular por integración de los sistemas defensivos, el metabolismo intermediario y el aporte dietario.

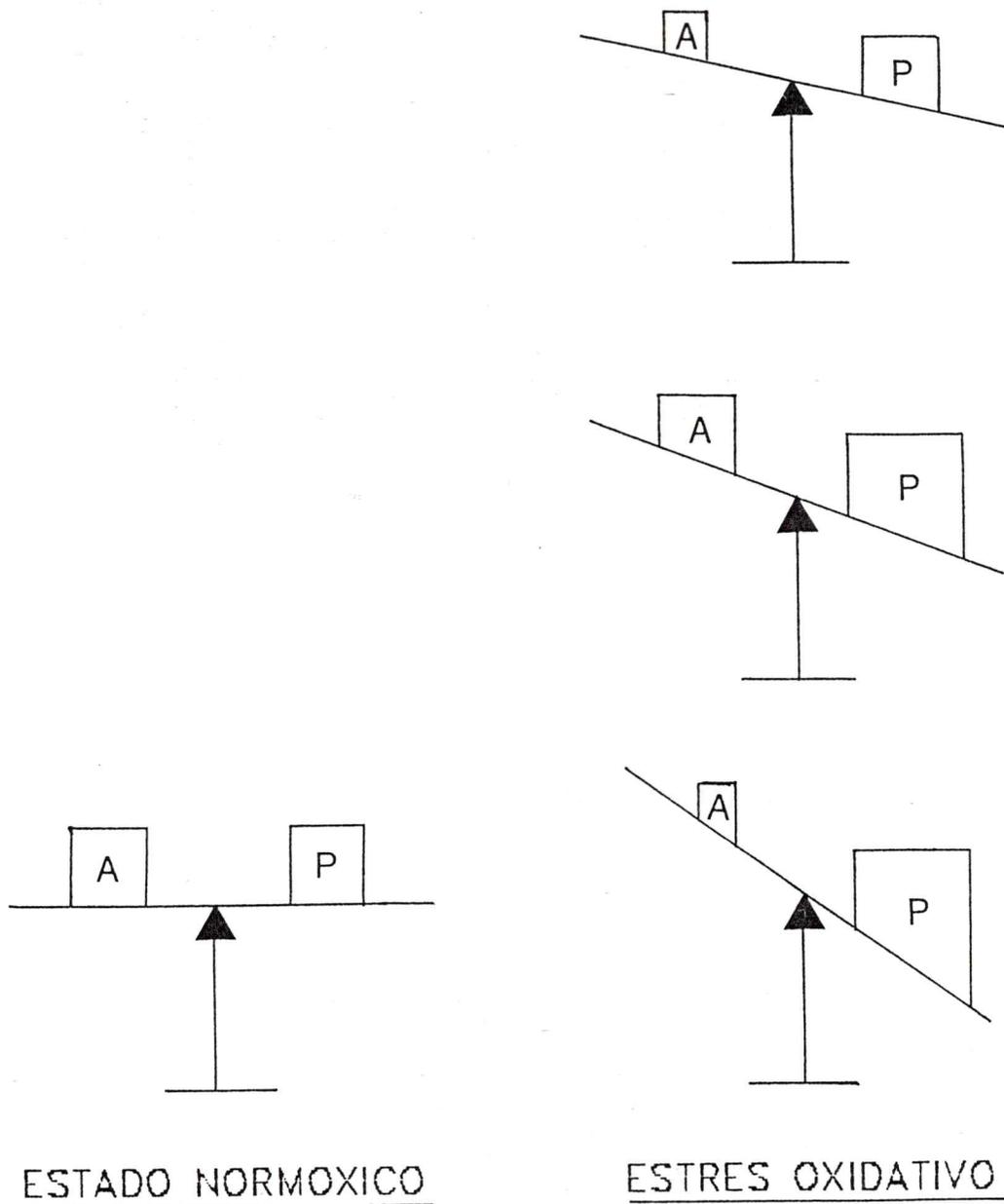
de interacción (k) altas, cercanas al límite difusional de las moléculas (Esquema III). Con el objeto de lograr una protección antioxidante óptima compatible con la vida, las células disponen de procesos preventivos adicionales, y deben ser capaces de mantener niveles de estado estable adecuados de los componentes involucrados en citoprotección (Esquema IV).

De acuerdo a todos los antecedentes discutidos sobre citoprotección, se puede concluir que la mantención de la viabilidad celular en condiciones aeróbicas depende de la integración de los sistemas defensivos y de reparación, que conforman una faceta especializada del metabolismo celular, con el metabolismo intermediario y el aporte dietario (Esquema V). Esta integración condiciona un bajo nivel de estado estable de especies activas del oxígeno, determinando así un estado normóxico celular en el cual los mecanismos prooxidantes están balanceados por aquéllos de defensa antioxidante (Esquema VI).

4. Concepto de estrés oxidativo.

Actualmente existe un considerable apoyo experimental que señala que la utilización del oxígeno por los organismos aeróbicos se asocia a procesos oxidativos de naturaleza deletérea, los que se postula serían la base para la ocurrencia de diversos procesos fisiológicos y patofisiológicos como la inflamación, el envejecimiento, la

carcinogénesis y la toxicidad de los xenobióticos, entre otros, los cuales involucrarían una alteración del estado normóxico celular (Sies, 1985). Esta alteración constituye el fenómeno de "estrés oxidativo" e implica la pérdida del balance entre los factores celulares prooxidantes (especies reactivas del oxígeno) y los antioxidantes (sistemas de defensa antioxidante), en favor de los primeros (Esquema VI) (Sies, 1985). La intensidad del estrés oxidativo depende del tipo de mecanismo alterado y de la magnitud del cambio producido, pudiendo ser condicionado por una disminución de los mecanismos defensivos, por un incremento en los factores prooxidantes, o por ambos a la vez (Esquema VI).

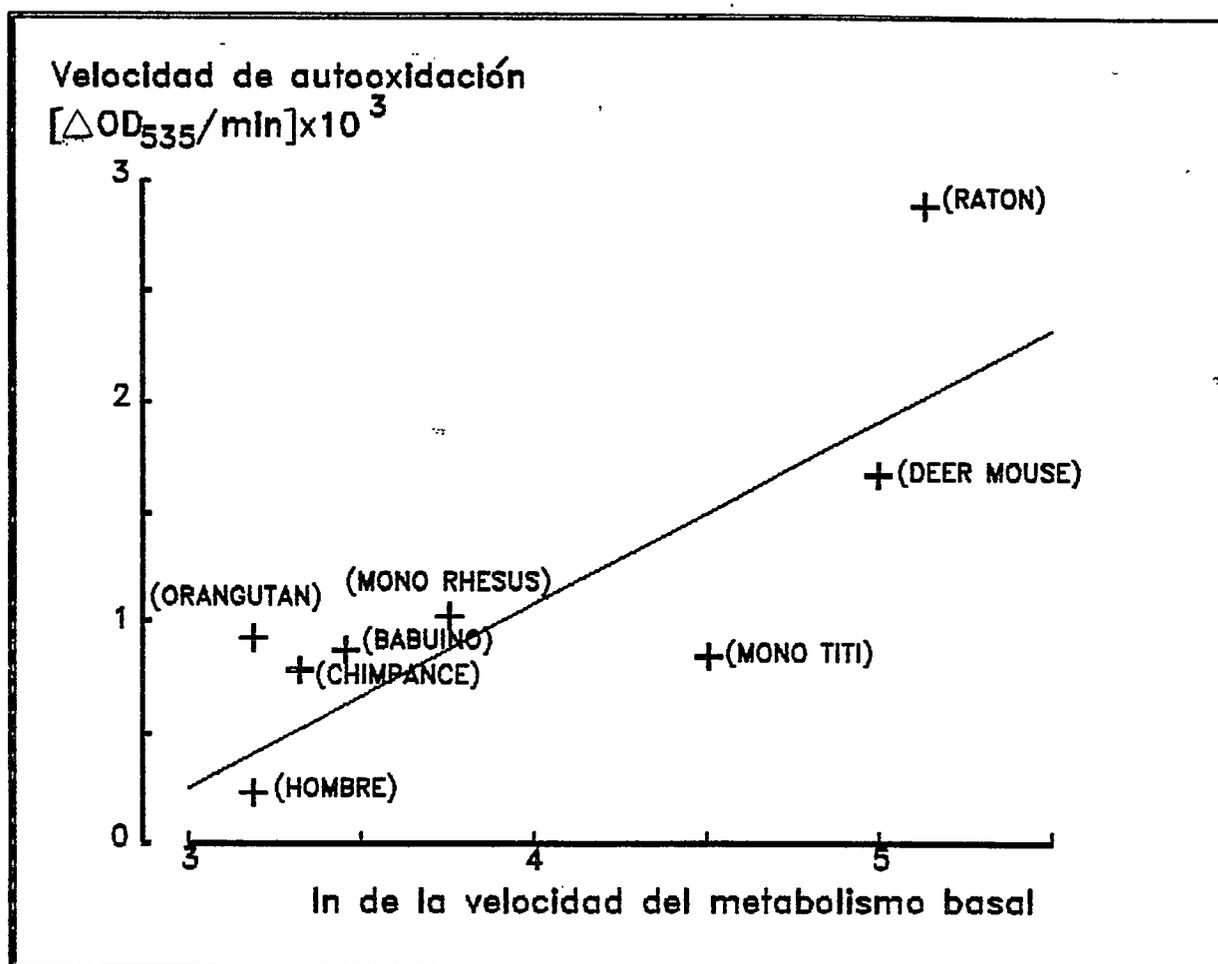


Esquema VI. Balance entre mecanismos antioxidantes (A) y factores prooxidantes (P) que determinan el estado normóxico celular. Concepto de estrés oxidativo.

OBJETIVOS

Los antecedentes presentados en la introducción, señalan que el estado hipermetabólico hepático que se manifiesta en el hipertiroidismo, podría conducir al desarrollo de un estrés oxidativo para este órgano. Los cambios moleculares que llevarían a esta condición citotóxica en hígado de rata, podrían involucrar modificaciones no sólo de la actividad de los procesos celulares asociados a la reducción univalente del oxígeno, sino que también de la capacidad de defensa antioxidante celular.

En este sentido, el estudio de Cuttler en diversas especies de mamíferos ha señalado una correlación positiva entre la concentración tisular de antioxidantes específicos, tales como SOD, carotenoides y alfa-tocoferol, y la longevidad de ellas, sugiriendo al estrés oxidativo como una causa importante del envejecimiento de estas especies (Cuttler, 1991). Más aún, utilizando los resultados de Cuttler, es posible obtener una correlación directa entre las velocidades tisulares de autooxidación y de metabolismo basal de las especies estudiadas (Esquema VII), lo que



Esquema VII. Correlación directa entre las velocidades tisulares de autooxidación y las velocidades del metabolismo basal de diversas especies de mamíferos.

Las velocidades tisulares de autooxidación fueron medidas como índice TBAR y las velocidades del metabolismo basal fueron expresadas como ln.

Calculado utilizando datos de Cutler, (1991).

sugiere la existencia de una correlación directa entre sus velocidades de lipoperoxidación espontánea y de metabolismo basal.

De acuerdo con estos antecedentes, los objetivos de esta tesis están orientados a evaluar los cambios moleculares hepáticos que se producirían en el hipertiroidismo experimental y que conllevan la producción de un estrés oxidativo y un aumento del metabolismo basal de los animales involucrando un estado calorigénico hepático, a través de los siguientes planteamientos:

1. Evaluación de parámetros celulares asociados a la actividad prooxidativa (respuestas respiratoria y quimioluminiscente hepáticas) que desencadenarían la lipoperoxidación hepática, con el propósito de relacionar la calorigénesis tiroidea con la producción de especies excitadas (quimioluminiscencia), la lipoperoxidación y la respiración hepática (microsomal, mitocondrial y RSA).
2. Estudio cinético de los cambios en la actividad de los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y del contenido de glutatión, con el fin de estimar la condición antioxidante del hígado.
3. Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal y canalicular del GSH y de las enzimas que lo utilizan, como también del recambio in vivo del tripéptido, para conocer las alteraciones moleculares que condicionan las

modificaciones en su contenido intracelular.

Parte de los RESULTADOS que se presentan en esta tesis han sido publicados (Fernández y col., 1988; Videla y Fernández, 1988; Fernández y Videla, 1989; Fernández y col., 1991).

MATERIALES Y METODOS

A. ANIMALES DE EXPERIMENTACION Y REACTIVOS.

1. Animales.

Se utilizó ratas macho (edad aproximada 12 a 15 semanas) de la cepa Wistar, provenientes del vivero de la Unidad de Bioquímica de la División de Ciencias Médicas Occidente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, alimentados ad libitum con dieta sólida (Alimentos Balanceados S.A., Santiago), mantenidos a temperaturas ambientales que fluctuaron entre los 20 y 22°C con periodos constantes y alternados de 12 horas de luz y oscuridad.

2. Reactivos.

Los siguientes reactivos, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.: T₃ sódica, NADP, NADPH, NADH, ATP, t-BOOH, TBA, CN-3, epinefrina, imidazol, albúmina de bovino, GSH, GSSG, amediol, metil glioxal, ácido glioxílico, DTNB, antimicina-A, alopurinol, hematoxilina, glucosa-6-fosfato, piruvato de sodio, azida de sodio, glicina, L-cisteína, ácido L-glutámico, L-butionina sulfoximina, 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, 1,2-epoxi-3(p-nitrofenoxi)propano, L-gama-

glutamil-p-nitroanilida, glicilglicina, glutati6n reductasa, glioxalasa I, HRP y SOD. La L-cisteina-S³⁵ fue obtenida de New England Nuclear. La DFO fue obtenida de Ciba Geigy. El nembutal s6dico fue obtenido de Laboratorio Abbot de Chile. La heparina fue obtenida de Prolabo. Todos los restantes 6cidos y sales utilizados, como tambi6n el H₂O₂, el triti6n X-100 y el reactivo Folin, fueron obtenidos de Merck Quimica Chilena. El sulfato de titanio fue una donaci6n del Dr Federico Leighton, Facultad de Ciencias Biol6gicas, Pontificia Universidad Cat6lica de Santiago.

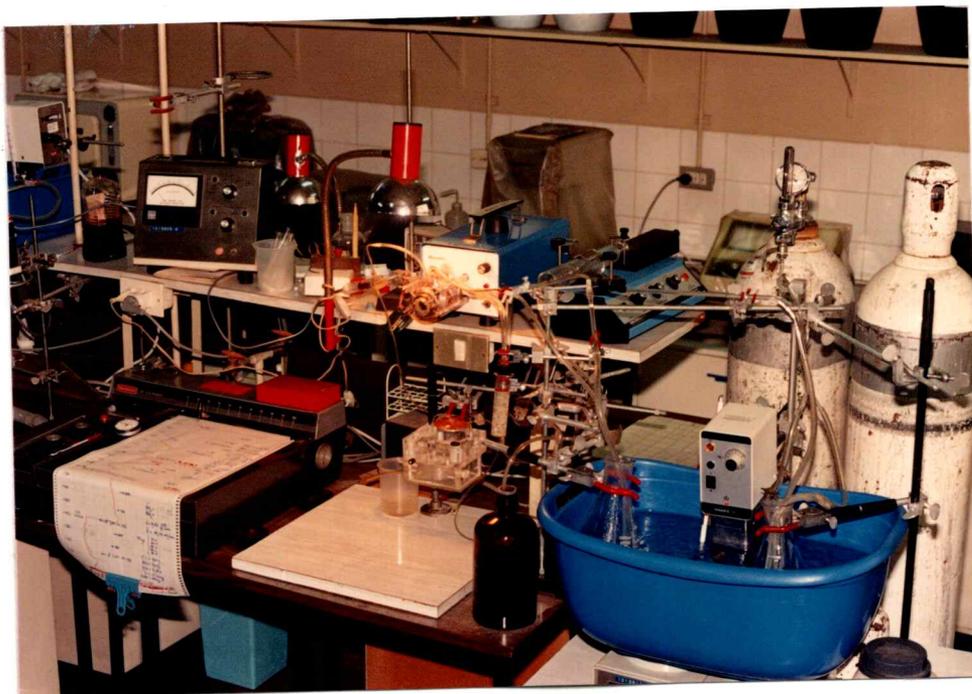
B. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.

La inducci6n del estado hipertiroideo se efectu6 mediante la inyecci6n diaria e i.p. de 0,1 mg de T₃ s6dica, por Kg de peso corporal de las ratas. Este tratamiento se llev6 a cabo en per6odos que fluctuaron entre 1 a 7 d6as consecutivos, siendo el per6odo de 3 d6as el m6s frecuentemente utilizado, por manifestar estabilizaci6n de los cambios en los par6metros bioqu6micos estudiados y que fueron modificados. Los animales control recibieron dosis isovolum6tricas de NaOH 0,1 N, ya que en este veh6culo debe ser disuelta la T₃. La condici6n hipertiroidea fue evaluada de acuerdo a 2 criterios, que comprendieron la evaluaci6n de: (a) la temperatura rectal, mediante una termocupla y (b) los niveles s6ricos de T₃, mediante un radio inmuno ensayo, efectuado en el laboratorio de Medicina Nuclear del Hospital

San Juan de Dios. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última inyección.

C. TÉCNICA DE PERFUSION HEPÁTICA.

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Sies (1978). Previamente al proceso quirúrgico, los animales fueron anestesiados con 50 mg de Nembutal sódico por Kg de peso, i.p. El hígado fue expuesto y disecado de sus ligamentos gástricos, duodenales y esplénicos. Se inyectó 250 unidades de heparina en el bazo, y se canuló la vena porta con un catéter conectado a un matraz que contiene el líquido de perfusión, cuya composición fue la siguiente: NaCl 118 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 y CO_2 (19:1, vol/vol) a pH 7,4. Las perfusiones se llevaron a cabo a temperaturas que fluctuaron entre 36 y 37°C y con velocidades de flujo constante (3-4 ml/g de hígado/minuto), sin recirculación del perfusado. Luego que el líquido de perfusión fuera recolectado por la cava, se le hizo pasar a través de un electrodo de oxígeno para evaluar la velocidad de QO_2 de cada preparación (Esquema VIII) (Estabrook, 1967). La constancia de la velocidad de QO_2 hepático durante la perfusión y la magnitud de la liberación sinusoidal de LDH (Bernt y Bergmeyer, 1974) y de proteínas (Lowry y col., 1951), fueron determinadas en cada preparación como índices de viabilidad del órgano (Sies, 1978).



Esquema VIII. Equipo para estudios que utilizan la técnica de perfusión hepática.

Al centro se observa al hígado diseccionado y conectado, vía porta, al líquido de perfusión, ubicado en un matraz dentro de un baño termoregulado (extremo inferior derecho). En la parte superior del esquema se observan, de izquierda a derecha, el oxígrafo, la bomba peristáltica, el electrodo de oxígeno y la bomba de infusión. Junto al hígado (extremo izquierdo del esquema) se observa el inscriptor que registra el CO_2 .

D. OBTENCION DE BILIS.

La recolección de muestras de bilis se efectuó en animales anestesiados con 50 mg/kg de peso de nembutal sódico, con apertura de la cavidad peritoneal para canular el conducto biliar con un catéter PE-10, colocado antes del hileo hepático, para evitar la contaminación de las muestras con el jugo pancreático. Posteriormente se cubrió la cavidad abdominal con una gasa que fue constantemente humedecida con suero fisiológico. La operación de recolección tuvo una duración de 15 minutos, durante la cual los animales fueron mantenidos a una temperatura ambiente de 28 a 30°C. Al término de cada experimento se determinó el peso total del hígado y se midió el volumen de bilis colectado. Con estos datos se pudo calcular la velocidad de flujo biliar, expresada en $\mu\text{l/g hígado/segundo}$.

E. PREPARACION DE HOMOGENEIZADOS HEPATICOS Y FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

1. Homogeneizados hepáticos.

Previo al proceso de homogeneización y estando los animales anestesiados según se ha descrito previamente (secciones C y D), se efectuó una perfusión hepática *in situ* utilizando 200 ml de una solución fría (5°C) de KCl 150 mM y Tris 5 mM, a pH 7,4. Esta perfusión tuvo por finalidad la remoción de la hemoglobina de las preparaciones posteriores. Luego que los hígados fueran lavados en la solución

anterior, secados en papel filtro, pesados y picados, se les homogeneizó en el amortiguador ya indicado en un homogeneizador de vidrio teflón, utilizando un Omni Mixer a velocidad 4,0 y efectuando 4 pases. Los homogeneizados se prepararon al 20% peso/vol, efectuando todas las operaciones indicadas sobre hielo.

2. Fraccionamiento subcelular.

2.1. Obtención de mitocondrias. Se utilizó el método de Schneider, descrito por Boveris y col. (1972) para obtener mitocondrias grandes e intactas. Para este fin, luego de anestesiar a los animales (secciones C y D) se realizó una perfusión hepática *in situ* para la remoción de la hemoglobina, utilizando 200 ml de una solución fría (5°C) de amortiguador MSE. Luego de lavar los hígados en tampón MSE, secarlos en papel filtro, pesarlos y picarlos, se les suspendió al 30% vol/vol en dicho amortiguador (1 volumen de hígado más 2 volúmenes de amortiguador) y se les homogeneizó en un homogeneizador de vidrio teflón, utilizando un Omni Mixer a velocidad 3,0 y efectuando 4 pases. El homogeneizado fue diluido al 10% vol/vol (1 volumen de hígado más 9 volúmenes de amortiguador MSE) y centrifugado a 700g por 10 minutos. Luego de descartar el pellet, se centrifugó el sobrenadante a 5.000g por 10 minutos; se descartó el sobrenadante y la capa lechosa que se ubica sobre el pellet (mitocondrias rotas); el pellet (principalmente mitocondrias

intactas) fue lavado, suspendiéndolo en la mitad del volumen utilizado en la preparación del homogeneizado al 10% y luego centrifugado a 5.000g por 10 minutos. Todas las operaciones descritas se efectuaron a 5°C y las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B.

2.2. Obtención de partículas submitocondriales. Esta fracción está constituida por vesículas de membrana mitocondrial, en la mayor parte de las cuales la membrana interna está invertida en relación a la orientación que presenta en las mitocondrias intactas; mediante ruptura por sonicación, a estas partículas se les ha removido la mayor parte de la matriz y del espacio intermembrana, reteniéndose la membrana interna y, en algunos casos, la membrana externa (Pedersen y col., 1978). Para obtener esta fracción se utilizó la metódica descrita por Pedersen y col. (1978). Se procedió de acuerdo a lo descrito en la sección E.1., excepto que los hígados fueron lavados y homogeneizados al 30% vol/vol en un amortiguador MSH, siendo el homogeneizado posteriormente diluido al 10% vol/vol y centrifugado a 600g por 15 minutos. Luego de decantado, el sobrenadante fue centrifugado a 6.800g por 15 minutos, obteniéndose un pellet que fue homogeneizado y resuspendido en la mitad del volumen de amortiguador MSH utilizado en la preparación del homogeneizado al 10%. Luego de centrifugar a 9.770g por 15 minutos y de descartar el sobrenadante y la capa lechosa

sobre el pellet, se resuspendió a éste en la mitad del volumen de amortiguador MSH utilizado en la operación anterior, centrifugándose nuevamente a 9.770g por 15 minutos, con lo cual se obtuvo un pellet constituido por mitocondrias. Esta fracción, resuspendida en amortiguador MSH a una concentración de 20 mg de proteínas/ml, fue sometida a oscilación sónica, utilizando un sonicador Branson 250, al 30% de su intensidad máxima y con un tiempo total de sonicación de 1 minuto por 20 mg de proteínas mitocondriales, dividido en periodos de 30 segundos de duración. El vástago del sonicador se mantuvo frío durante toda la operación, sumergiéndolo en hielo cada 30 segundos. Las mitocondrias que no fueron rotas por el proceso de sonicación, fueron separadas de las partículas submitocondriales mediante una centrifugación a 7.500g por 10 minutos; el sobrenadante contiene las partículas submitocondriales, las que fueron decantadas mediante una ultracentrifugación a 105.000g por 60 minutos, utilizando una ultracentrífuga Beckmann L y un rotor Ti 40. Todas las operaciones descritas fueron realizadas a 5°C y las centrifugaciones en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-2B.

2.3. Obtención de microsomas. Se utilizó técnicas convencionales (Rumbaugh y col., 1978). Los homogeneizados hepáticos, preparados según se describió en la sección E.1.,

fueron sometidos a 2 centrifugaciones a 27.000g durante 15 minutos, a fin de decantar núcleos (fracción N), mitocondrias (fracción M) y lisosomas (fracción L) y obtener un sobrenadante post-mitocondrial (fracción PS). Esta fracción fue sometida a una ultracentrifugación a 105.000g durante 60 minutos en una ultracentrifuga Beckman L2-65B usando un rotor Ti 65, para obtener un pellet correspondiente a la fracción microsomal. El sobrenadante de esta centrifugación, post-microsomal, se conoce con el nombre de fracción soluble.

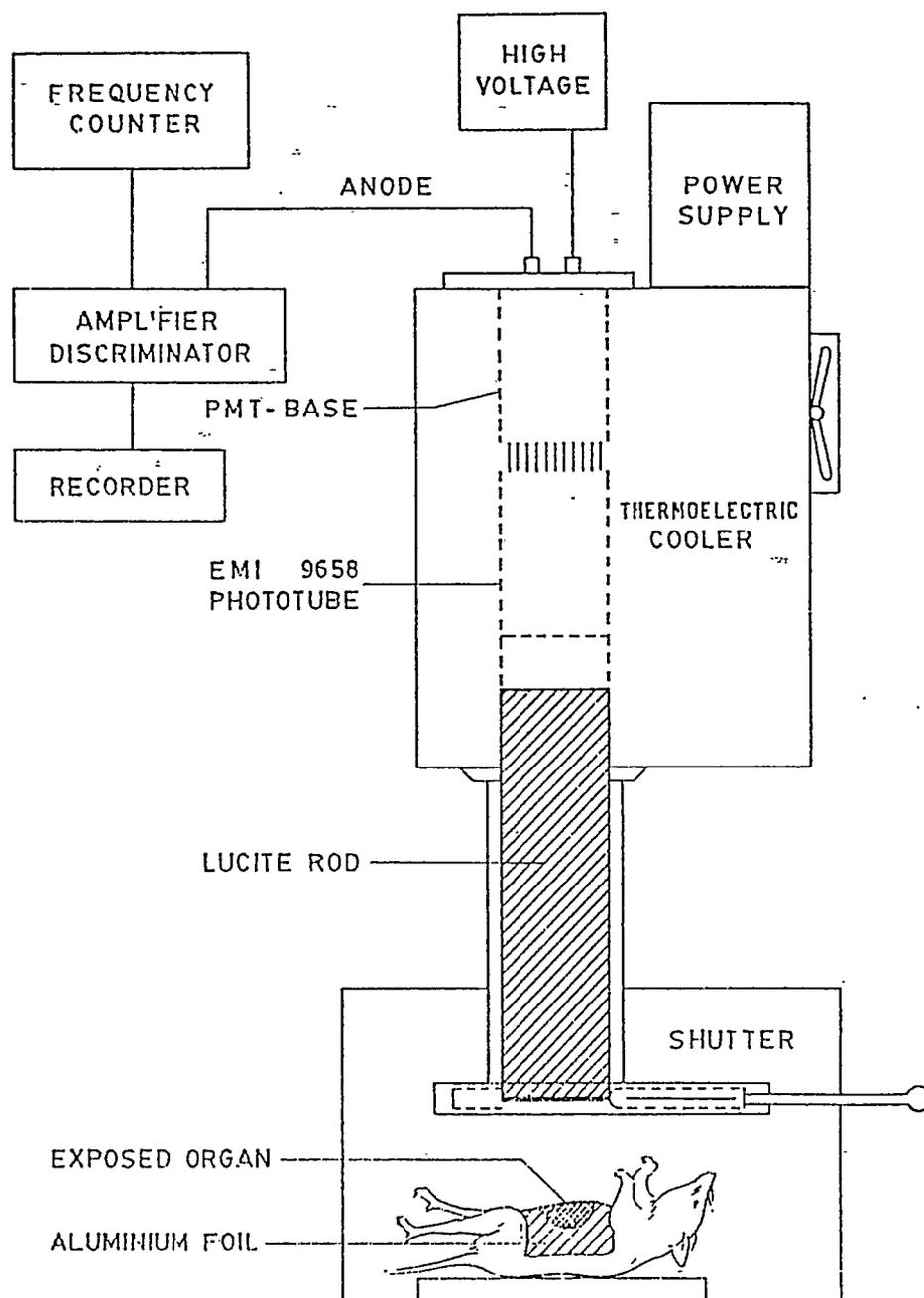
F. EVALUACION DE INDICES DE LIPOPEROXIDACION.

1. Medición de la Quimioluminiscencia.

1.1. Estudios *in vivo*. Fueron realizados en el Instituto de Química y Físico Química Biológicas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina, gracias a un Convenio CONYCIT-CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina). En ellos se evaluó la quimioluminiscencia espontánea del hígado de rata *in situ*, midiendo la emisión de fotones, de acuerdo a la metodología descrita por Videla y col. (1983). A ratas tratadas con T₂ durante 1, 3, 5 y 7 días y anestesiadas con nembutal sódico (sección C), se les abrió la cavidad abdominal. Luego se cubrió la piel y la cavidad abdominal con una lámina de aluminio que poseía un orificio de 1 cm² de superficie, hecho especialmente para

cada rata, que permitió sólo la exposición del hígado. En seguida, los animales fueron colocados en una cámara a 37°C debajo del fototubo de un contador de fotones de la Johnson Foundation (Johnson Research Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia, P.A., U.S.A.), especialmente adaptado para la medición de quimioluminiscencia de órganos. El fototubo utilizado fue un EMI 9658, sensible al rojo, con un potencial aplicado de -1 a 3 kV (Esquema IX). Los resultados de estas determinaciones se expresaron en cps/cm² de superficie hepática expuesta, previa substracción de la corriente oscura obtenida al intercalar un obturador entre el órgano y el fototubo.

1.2. Estudios *in vitro*. Se realizaron tanto en los homogeneizados como en las fracciones mitocondrial y microsomal de ratas tratadas con T₃ durante 1, 2 y 3 días. Los estudios incluyeron determinaciones de quimioluminiscencia espontánea (homogeneizados) y de quimioluminiscencia inducida por t-BOOH (homogeneizados y fracciones). Las mediciones se realizaron en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3150P, fuera de coincidencia (Videla, 1983). Previo a estos estudios, los pellets correspondientes a las fracciones mitocondrial y microsomal fueron resuspendidos en un amortiguador que contenía KCl 150 mM y Tris 5 mM a pH 7,4. La composición del medio de reacción para la medición de la quimioluminiscencia



Esquema IX. Contador de fotones utilizado para la medición de la quimioluminiscencia hepática *in situ*.

Tomado de Boveris y col., 1980.

espontánea e inducida fue la siguiente: KCl 150 mM, Tris 5 mM, EDTA 1 mM y 1 mg de proteínas de homogeneizados o mitocondrias/ml o 0,25 mg de proteínas microsomales/ml, a pH 7,4; en las mediciones de quimioluminiscencia inducida se adicionó t-BOOH 3 mM. Las muestras fueron pre-incubadas en un baño termoregulado durante 2 minutos a 37°C, temperatura a la cual se efectuaron todas las mediciones. Se midió también la quimioluminiscencia de cada uno de los viales utilizados, la que luego se restó de las mediciones de las muestras. Los resultados se expresaron en cpm/mg de proteína.

2. Medición del índice TBAR.

Se utilizó la metódica descrita por Buege y Aust (1978) que determina la DO a 535 nm del producto de la reacción del TBA, con derivados aldehídicos provenientes de la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados (TBAR) por acción radicalaria. Las mediciones se efectuaron en homogeneizados y muestras de bilis de ratas tratadas durante 3 días, y en microsomas (resuspendidos en amortiguador KCl 150 mM, Tris 5mM, pH 7,4) de ratas tratadas durante 1, 2, 3 y 7 días con T₂. Se efectuó una precipitación de cada muestra con TCA al 30% (1:1 vol/vol) y se centrifugó a 1,000g durante 15 minutos a temperatura ambiental. Luego de descartar el precipitado, se trató 1 ml del sobrenadante con 3 ml de TBA al 0,67% p/vol y se calentó a bañomaria durante 15 minutos,

para luego leer la DO del producto de esta reacción a 535 nm. La concentración de TBAR se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del MDA $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en nmoles de MDA/mg de proteína (homogeneizados y microsomas) y μmoles de MDA/ml de bilis. La determinación de la velocidad de flujo biliar, según se describió en la sección D, permitió calcular la velocidad de excreción biliar de TBAR (μmoles de MDA/g hígado/minuto).

G. MEDICIONES DE RESPIRACION HEPATICA.

1. Respiración microsomal.

Se evaluó el QO_2 microsomal en presencia de NADPH o de t-BOOH utilizando un electrodo de oxígeno, de acuerdo al método polarográfico descrito por Foster (1969). Se trabajó con ratas tratadas con T_3 durante 1 y 2 días. El medio de reacción para cada determinación fue un amortiguador fosfato de sodio 120 mM a pH 7,4 que contenía 0,6 mg de proteína microsomal/ml, suplementado con NADPH 0,13 mM o con t-BOOH 0,02 mM. Además, se efectuaron determinaciones del QO_2 microsomal en presencia de un antioxidante, para evaluar la RMSA, adicionando CN-3 hasta concentración 3 mM al medio de reacción. Todas las determinaciones se efectuaron a 25°C y los resultados se expresaron en nmoles de O_2 consumido/mg de proteína/minuto.

2. RSA en hígado perfundido.

Se evaluó el QO_2 hepático, en presencia de los

antioxidantes DFO y alopurinol, en ratas tratadas con T_3 durante 3 días. La perfusión hepática se efectuó según se describió en la sección C y los antioxidantes fueron adicionados al líquido de perfusión a los 10 minutos de perfusión. La concentración de DFO en el líquido de perfusión fue 0,5 mM y la de alopurinol fue 1 mM. La RSA hepática evaluada en estos estudios, se expresó en nmoles de O_2 /gramo de hígado/minuto, y ella correspondió a la diferencia en el QO_2 al ser éste medido en ausencia del antioxidante y en presencia de éste (Videla, 1984).

H. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PROOXIDATIVA MITOCONDRIAL.

1. Producción de H_2O_2 .

1.1. Estudios en mitocondrias intactas. La detección de H_2O_2 se realizó midiendo el aumento de A a 417 nm, con una longitud de onda de referencia activa a 402 nm, [A_{417} nm - A_{402} nm], que se producen durante la reducción de H_2O_2 catalizada por la HRP y en ausencia de dadores de electrones, cuando H_2O_2 forma un complejo con HRP (complejo II), lo que produce cambios espectrales en los picos alfa del espectro Soret de la peroxidasa (Boveris y col., 1972). Para ello se utilizó mitocondrias de ratas tratadas con T_3 durante 3 días, preparadas según se describió en la sección E.2.1. y resuspendidas en un amortiguador MST, a una concentración aproximada de 20 mg de proteínas/ml. Se midió la producción de H_2O_2 con sustrato endógeno (basal), y luego

de la adición de succinato en presencia o ausencia de antimicina-A o azida de sodio (inhibidores de la cadena mitocondrial transportadora de electrones). Para estimar la producción de H_2O_2 por los peroxisomas que normalmente contaminan la fracción mitocondrial, se efectuaron determinaciones en presencia de urato en las condiciones descritas para el succinato. La reacción se inició con la adición de 136 unidades de HRP/ml a un medio de reacción que contenía el amortiguador MST y 0,23 mg de proteínas mitocondriales/ml, con adiciones posteriores de los sustratos e inhibidores de manera que sus concentraciones fueran las siguientes: succinato 4 mM, antimicina-A 0,18 μM , azida de sodio 10,3 μM y urato 30 μM . Los cambios espectrales se registraron utilizando un espectrofotómetro de doble longitud de onda, Aminco DW-2aTM UV-VIS, American Instrument Company, acoplado a un inscriptor. Para calcular la velocidad de producción de H_2O_2 se utilizó el delta coeficiente de extinción molar (417 - 402 nm) $5 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$, y los resultados se expresaron en nmoles de H_2O_2 /minuto/mg de proteína mitocondrial y en nmoles de H_2O_2 /minuto/gr de hígado. Las determinaciones se realizaron a 28°C.

1.2. Estudios en partículas submitocondriales. Esta fracción, preparada según se describió en la sección E.2.2, está exenta de peroxisomas, los que decantan en la centrifugación de 10 minutos a 7.500g efectuada después de

la sonicación. Por esta razón, con estos estudios se pudo estimar más adecuadamente la verdadera producción mitocondrial de H_2O_2 de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. La detección del H_2O_2 se realizó utilizando el método espectrofotométrico descrito en la sección H.1.1. (Boveris y col., 1972). Previo a ello, el pellet de partículas submitocondriales, se resuspendió en amortiguador MST a una concentración aproximada de 10 mg de proteínas/ml. La reacción se inició con la adición de 136 unidades de HRP/ml a un medio de reacción que contenía el amortiguador MST y 0,15 mg de proteínas/ml (producción basal), adicionando posteriormente 4 mM de succinato y/o 0,18 μ M de antimicina-A. Para evaluar la producción de H_2O_2 producto de la contaminación peroxisomal, se adicionó 30 μ M de urato al medio de reacción basal. Los cambios espectrales se registraron en el inscriptor y espectrofotómetro Aminco DW-2aTM UV-VIS ya descrito (sección H.1.1). Los resultados se expresaron en nmoles de H_2O_2 /minuto/mg de proteína, utilizando el delta coeficiente de extinción molar [417 - 402 nm] $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Las determinaciones se efectuaron a 28°C.

2. Producción de $O_2^{\cdot -}$.

Para estas mediciones se utilizó partículas submitocondriales de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Las partículas submitocondriales se prepararon de acuerdo a

lo descrito en la sección E.2.2. y se resuspendieron en amortiguador MSH a una concentración aproximada de 0,6 mg de proteína/ml. La producción de O_2^- se midió a través de la oxidación, sensible a SOD, de la epinefrina a adrenocromo (Turrens y col., 1982a). A un medio de reacción pre-incubado a 30°C que contenía el amortiguador MSH, epinefrina 1 mM, antimicina-A 2 μ M, 150 U/ml de catalasa y 0,6 mg de proteína mitocondrial/ml, se adicionó el sustrato mitocondrial 0,1 mM de NADH o 5 mM de succinato. La formación de adrenocromo se registró a través de cambios en la A_{480} , utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer 550 de doble haz, con celdas termoreguladas y acoplado a un inscriptor Perkin-Elmer 56. La reacción fue inhibida significativamente por la adición de 150 U de SOD/ml al medio de reacción (70% de inhibición). Las determinaciones se efectuaron a 30°C, los cálculos se realizaron utilizando el coeficiente de extinción molar a 480 nm del adrenocromo ($4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y los resultados se expresaron en nmoles de O_2^- /minuto/mg de proteína.

I. MEDICION DE SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE HEPATICOS.

1. Sistemas enzimáticos.

1.1. SOD citosólica (CuZnSOD). Se midió la inhibición ejercida por muestras de citosol hepático, sobre la autooxidación de la epinefrina a pH alcalino, que involucra la participación de O_2^- y la formación de adrenocromo, de acuerdo a lo descrito por Misra y Fridovich (1971). Se

trabajó con ratas tratadas con T_3 durante 1, 3, 5 y 7 días, sometiendo los homogeneizados hepáticos (sección E.1.) a una centrifugación a 33.000g durante 60 minutos, a 5°C , en una centrífuga Sorvall RC-2B refrigerada, para obtener los sobrenadantes correspondientes. En un medio de reacción consistente de un amortiguador de glicina 50 mM a pH 10,5 y de epinefrina 1 mM, se detectó la autooxidación de la epinefrina mediante el registro de los incrementos en la A_{480} /minuto (ensayo control) utilizando el espectrofotómetro e inscriptor ya descritos (sección H.2.). Para las mediciones de inhibición de la autooxidación de la epinefrina se efectuó diversos ensayos idénticos al descrito, conteniendo cada uno de ellos volúmenes crecientes (10, 25 y 40 μl) del sobrenadante de 33.000g (ensayos de las muestras). Al dibujar el gráfico de los log de los porcentajes de inhibición (cuocientes del aumento de A_{480} /minuto del ensayo control y del ensayo de cada muestra) en función de los volúmenes de sobrenadante se obtuvo una recta; en ella el log del 50% de inhibición ($-0,3$) corresponde a los μl de sobrenadante (citosol) que poseen 1 U de SOD, ya que por definición 1 U de SOD es aquella actividad enzimática capaz de inhibir en un 50% la velocidad de formación del adrenocromo (Misra y Fridovich, 1971). Todas las determinaciones fueron realizadas a 30°C y los resultados se expresaron tanto en U de SOD/mg de proteína

como en U de SOD/g de hígado.

1.2. SOD mitocondrial (MnSOD). Se determinó en mitocondrias (sección E.2.1.) de ratas tratadas con T_3 durante 3 días, resuspendiendo el pellet mitocondrial en amortiguador MSH a una concentración aproximada de 20 mg de proteína/ml. Para la determinación de esta actividad de SOD no fue posible utilizar la metódica descrita para la CuZnSOD, ya que a pH alcalino la actividad específica de la MnSOD es baja. Por este motivo, se efectuó un ensayo a pH fisiológico que utilizó la inhibición de la autooxidación de la hematoxilina por la SOD presente en el material biológico (Martin y col., 1987). En cada experimento se elaboró una curva de calibración, utilizando una SOD estándar (Sigma, de sangre de bovino, 2.800 U/mg de proteína). Los ensayos control (sin SOD) se efectuaron adicionando 0,15 mM de hematoxilina a un amortiguador fosfato de potasio 0,05 M con EDTA 0,1 mM a pH 7,5 registrando luego los aumentos en la A_{560} /minuto con el espectrofotómetro e inscriptor ya descritos (sección H.2.). En los ensayos con SOD estándar, los cambios en la A/minuto se registraron luego de adicionar al medio de reacción mencionado cantidades crecientes (0,4 a 1,5 U) de SOD estándar; al dibujar un gráfico del log del porcentaje de inhibición (cuociente del incremento de la A_{560} /minuto del experimento control y del experimento con SOD estándar) en función de las unidades de SOD agregadas, se obtuvo una

recta (curva de calibración). En los ensayos con mitocondrias se adicionaron distintas alícuotas (5 a 40 μ l) de la suspensión de mitocondrias al medio de reacción y luego se interpoló el log del % de inhibición (cuociente del cambio en la A_{560} /minuto del ensayo control y del ensayo con mitocondrias) en la curva de calibración correspondiente para conocer la cantidad de unidades de SOD presentes en cada alícuota de muestra estudiada. Las determinaciones se realizaron a 30°C y los resultados se expresaron tanto en U de SOD/mg de proteína mitocondrial como en U de SOD/g de hígado.

1.3. Catalasa. Se midió en sobrenadantes post-nucleares (2.400g por 5 minutos a 5°C) de los homogeneizados hepáticos (sección E.1.) de ratas tratadas con T_3 durante 1, 2 y 3 días. La determinación se basó en la inhibición de la formación de un complejo entre el H_2O_2 y el sulfato de Ti, que absorbe a 405 nm, cuando se adiciona al medio de reacción una muestra biológica con actividad de catalasa, lo que determina una disminución en la A_{405} (Baudhuin y col., 1964). Antes de efectuar la reacción, los sobrenadantes post-nucleares fueron diluidos, al menos 100 veces, en una solución que contenía EDTA 1mM, $NaHCO_3$ 1 mM, 0,01 % de Tritón X-100 y 2 % de etanol. El medio de reacción estuvo compuesto de 0,04 % de Tritón X-100 y 100 μ l de sobrenadante diluido. Se preparó un medio de reacción control para cada

experimento en el cual el sobrenadante diluido fue sustituido por 100 μ l de la solución diluyente. La reacción se inició con la adición de 5 ml de una solución que contenía el sustrato, H_2O_2 0,44 mM, disuelto en un amortiguador de imidazol 20 mM con 1 mg/ml de albúmina de bovino a pH 7,0. Se incubó esta mezcla a 0°C durante 3 minutos, y luego se detuvo la reacción adicionando 3 ml de una solución saturada de sulfato de Ti (Titanio IV oxisulfato) en H_2SO_4 2 N, diluida 3 veces. El H_2O_2 remanente reacciona con el sulfato de Ti formando un sulfato de peroxiTi que absorbe a 405 nm. Las lecturas de A se realizaron en el espectrofotómetro Perkin-Elmer ya descrito (sección H.2.). Para calcular las unidades de catalasa presentes en cada muestra, se utilizó el log del porcentaje de inhibición de la formación del sulfato de peroxiTi ($\log A_{control}/A_{muestra}$), de acuerdo a la definición de 1 unidad de actividad de catalasa como la cantidad de enzima capaz de destruir el 90% del sustrato, en un minuto, en un volumen de 50 ml, en las condiciones de ensayo descritas (Baudhuin y col., 1964). Los resultados se expresaron en U/mg de proteína y U/g de hígado.

1.4. Glutación peroxidasa. Se evaluó tanto la actividad enzimática total, en sobrenadantes de 2.410g por 10 minutos a 5°C de los homogeneizados hepáticos (sección E.1.) de ratas tratadas con T_3 durante 1, 2 y 3 días, como la

actividad enzimática soluble, en sobrenadantes de 33.000g por 60 minutos a 5°C de ratas tratadas con T₃ por 3 días. En ambos casos se midió la actividad de esta enzima acoplando la oxidación de sus sustratos, H₂O₂ y GSH, a la recuperación de este último, catalizada por la glutatión reductasa con oxidación del NADPH, cuya cinética se puede visualizar espectrofotométricamente como una disminución de la A₃₄₀/minuto (Flohé y Günzler, 1984). El medio de reacción fue un amortiguador fosfato de sodio 43 mM a pH 7,0 que contenía el sobrenadante, convenientemente diluido, NADPH 0,28 mM, azida de sodio 3,75 mM, GSH 5 mM y 0,33 U/ml de glutatión reductasa. Luego de una pre-incubación a 25°C por 2 minutos, se inició la cinética de oxidación del NADPH con la adición de H₂O₂ al medio para alcanzar una concentración final de 0,22 µM. En cada experimento se realizó una oxidación no enzimática del GSH, realizando un ensayo simultáneo con un sistema idéntico al descrito y sin sobrenadante, para luego sustraer la velocidad de reacción de este último de aquella del primero. Se obtuvo así la actividad enzimática real, la que se expresó en µmoles de NADPH oxidados/minuto (unidades de actividad enzimática)/mg de proteína y también en unidades de actividad enzimática/g de hígado. Para cálculos se usó el coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ($6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las mediciones espectrofotométricas se efectuaron a 25°C, utilizando el espectrofotómetro e

inscriptor descritos en la sección H.2.

2. Niveles de GSH.

Para medir el contenido hepático de GSH y de GSSG se utilizó un método enzimático basado en la reacción cuantitativa de GSH con metilglioxal, en presencia de glioxalasa I, que genera el S-lactoil-GSH que absorbe a 240 nm (evaluación de GSH), y en la reducción cuantitativa de GSSG a GSH por NADPH, que absorbe a 340 nm, y glutati6n reductasa (Bernt y Bergmeyer, 1974), de acuerdo a las siguientes reacciones:



De esta manera, las dos formas del glutati6n se pudieron evaluar en un mismo ensayo. Se trabajó con homogeneizados hepáticos de ratas tratadas con T₃ durante 1, 3, 5 y 7 días, los que fueron preparados en HClO₄ 0,5 N, al 2% peso/volumen, y luego centrifugados a 2.500g durante 10 minutos y a 5°C. A 5 ml de sobrenadante se le adicionó 0,9 ml de K₃PO₄ 1,75 M para neutralizarlo y el precipitado de KClO₄ formado fue filtrado a través de papel filtro. Luego de comprobar que el pH del filtrado era 7,0 se adicionó 0,5 ml de éste a un medio de reacción que contenía 0,47 mg/ml de albúmina de bovino y 0,6 U/ml de glioxalasa I, en cubeta de cuarzo de 3 ml, y se registró la A₂₄₀ (A₁). En seguida se adicionó 0,62 mM de metilglioxal efectuándose otra lectura

de A_{240} 10 minutos más tarde (A_2). Tras una nueva adición de 0,62 mM de metilgloxal se efectuó otra lectura de A_{240} a los 2 minutos (A_3). En estas mediciones la diferencia [$A_3 - A_2$] representó la A_{240} del metilgloxal y la diferencia [$A_2 - A_1 - A_{240 \text{ metil-gloxal}}$] la A_{240} del S-lactoil-GSH, que se equivale mol a mol con el GSH (reacción I). A continuación se adicionó NADPH, disuelto en NaHCO_3 al 1%, para tener una concentración de 0,33 mM en la cubeta, determinándose la A_{340} (A_4), y en seguida 0,18 U/ml de glutatión reductasa, efectuándose lecturas de A_{340} a los 8, 10, 12, 14 y 16 minutos; de la extrapolación de estas lecturas a tiempo 0 (adición de glutatión reductasa) se obtuvo A_5 . La diferencia [$A_4 - A_5$] representó la disminución de la A_{340} del NADPH, que reacciona mol a mol con el GSSG (reacción II). Por lo tanto, para calcular el contenido de GSH se utilizó el coeficiente de extinción del S-lactoil-GSH a 240 nm ($3,37 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) y para calcular el contenido de GSSG se utilizó el coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm ($6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$). Los resultados se expresaron en μmoles de GSH o de GSSG/g de hígado. Las reacciones y mediciones espectrofotométricas se realizaron a 25°C utilizando el espectrofotómetro descrito en la sección H.2.

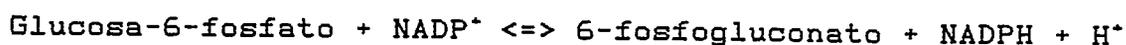
3. Sistemas auxiliares.

3.1. Glutatión reductasa (NADPH: glutatión-oxidado óxidoreductasa; EC 1.6.4.2). Se midió en sobrenadantes de

33.000g por 60 minutos de los homogeneizados hepáticos (sección H.2.) de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Para ello se utilizó la metódica descrita por Carlberg y Mannervick (1985) cuyo principio es la estimación espectrofotométrica, a 340 nm, de la utilización del NADPH en la reducción del GSSG, que es catalizada por la glutatión reductasa (reacción II, sección I.2.). El medio de reacción, compuesto de un amortiguador Tris 97,5 mM a pH 8,0 y de EDTA 1 mM, GSSG 5 mM y sobrenadante diluido 4 veces, fue preincubado a 25°C durante 2 minutos; al término de esta incubación se adicionó el NADPH, disuelto en NaHCO_3 al 2%, para tener una concentración final de 0,2 mM y se registró la disminución de la A_{340} , a 25°C, durante 5 a 6 minutos, utilizando el espectrofotómetro e inscriptor descritos en la sección H.2. Los cálculos de la actividad enzimática, expresados en μmoles de NADPH oxidado/minuto (unidades de actividad enzimática)/mg de proteína, o g de hígado, se efectuaron utilizando las pendientes [disminución de A_{340} /minuto] iniciales o máximas de cada experimento, y el coeficiente de extinción $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ del NADPH, a 340 nm.

3.2. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa 6-fosfato: NADP⁺ óxidorreductasa; EC 1.1.1.49). Se evaluó en sobrenadantes post-microsomales hepáticos, obtenidos según se describió en la sección E.2.3., de ratas tratadas con T_3 .

por 3 días. Para ello se utilizó la metódica descrita por Glock y McLean (1953) cuyo principio es la reacción que cataliza esta enzima:



La velocidad de formación de NADPH es una medida de la actividad de la enzima y puede ser estimada por medio del aumento en la A_{340} . El medio de reacción, constituido por un amortiguador a pH 7,6 de glicilglicina 52,1 mM y MgCl_2 20,8 mM, NADP 1 mM y sobrenadante, fue pre-incubado a 25°C durante 5 minutos; al término de esta incubación se adicionó glucosa-6-fosfato para tener una concentración final de 2,1 mM y se registró el incremento de la A_{340} , a 25°C, durante 10 minutos, utilizando el espectrofotómetro e inscriptor descritos en la sección H.2. Los cálculos se realizaron utilizando el coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en μmoles de NADPH producido/minuto (unidades de actividad enzimática)/mg de proteína y en unidades de actividad enzimática/g de hígado.

3.3.- Síntesis de glutatión: En un sistema *in vitro*, se evaluó en forma conjunta las actividades de las dos enzimas iniciales del ciclo del gama-glutamilo, la gama-glutamil-cisteína sintetasa (L-5-glutamato: L-cisteína ligasa [ADP]; 6.3.2.2) y la glutatión sintetasa (L-5-glutamilcisteína: glicina ligasa [ADP]; EC 6.3.2.3), cuantificando el

glutati3n producido, al incubar a 37°C los sobrenadantes de 33.000g por 60 minutos de homogeneizados hepáticos (secci3n E.1.), con los aminoácidos precursores del tripéptido (Morton y Mitchell, 1985). Se trabajó con ratas tratadas con T₃ durante 3 días. El medio de reacci3n consistía de un amortiguador Tris 100 mM a pH 8,0 y de L-cisteína 5 mM, glicina 5 mM, L-glutamato 5 mM, ATP 5 mM, MgCl₂ 10 mM y EDTA 0,2 mM. A este medio se adicionó el sobrenadante diluido 2 veces y se incubó a 37°C en un baño termoregulado Dubnoff con agitaci3n, durante 10 minutos. A los 30 segundos, 1, 2, 3, 5 y 10 minutos se extrajeron alícuotas de 0,9 ml de este medio y se agregaron a tubos que contenían 1 ml de HClO₄ 1 N, sobre hielo, para detener la reacci3n y proporcionar un medio adecuado a la medici3n del glutati3n sintetizado. Se decidi3 utilizar estos tiempos de incubaci3n debido a que previamente se había determinado que la reacci3n, en las condiciones aquí descritas, alcanzaba el equilibrio entre los 4 y 7 minutos. Para cuantificar el glutati3n producido, se utilizó el método catalítico descrito por Tietze (1969), que permite la estimaci3n de los equivalentes totales de GSH (GSH + 2GSSG), a través de la siguiente reacci3n:



Previo a esto se agregó 0,1 ml de ácido glioxílico 52

mM a cada tubo, seguido de un calentamiento durante 25 minutos a 65°C y enfriamiento sobre hielo, para eliminar la cisteína libre. A continuación las muestras fueron neutralizadas con K_3PO_4 1,75 M y el precipitado de $KClO_4$ fue decantado en una centrifugación a temperatura ambiental, a 2.000g por 10 minutos. El glutatión producido en la síntesis descrita, está en el sobrenadante de esta centrifugación. Su evaluación se efectuó en un medio que contenía un amortiguador a pH 7,4 de fosfato de potasio 80 mM, DTNB 0,08 mM, NADPH 0,24 mM y 0,11 U/ml de glutatión reductasa, preincubado a 35°C durante 2 minutos. A este medio se adicionó 10 μ l de sobrenadante neutralizado para luego registrar el aumento de A_{412} /minuto, utilizando el espectrofotómetro e inscriptor descritos en la sección H.2., que corresponde a la formación del TNB. Además, en cada experimento: (a) se determinó el tiempo cero de la reacción de síntesis; (b) para corroborar la eliminación de la cisteína libre por el ácido glioxílico, se preparó un blanco para la reacción, con el medio para la síntesis y sin el sobrenadante hepático, el cual no debía reaccionar con el DTNB; (c) se registró el aumento de la A_{412} /minuto de un estándar de GSSG, con cuyo valor se realizaron los cálculos de cada experimento. Los resultados se expresaron en nmoles de glutatión sintetizado/minuto/mg de proteína y en μ moles de glutatión sintetizado/minuto/g de hígado. Se debe destacar que la

actividad de este sistema de síntesis *in vitro* de glutatión, fue inhibida en un 80% por la adición de L-butionina sulfoximina 2,5 μ M. Este compuesto es un inhibidor de la gama-glutamil cisteína sintetasa, uniéndose a la región del sitio activo de la enzima que une al aminoácido aceptor, cisteína (Griffith y Meister, 1979).

4. Evaluación de parámetros celulares asociados al metabolismo del glutatión.

4.1. Actividad de enzimas que utilizan GSH.

4.1.1. Glutatión transferasas (RX: glutatión R-transferasa; EC 2.5.1.18). Se evaluó en sobrenadantes de 33.000g por 60 minutos a 5°C de homogeneizados hepáticos (sección E.1.), de ratas tratadas con T₃ durante 1, 3, 5 y 7 días. Estas enzimas catalizan la conjugación del GSH tanto con sustratos arilo como con sustratos epoxi; el sustrato arilo utilizado en este estudio fue el 1-Cl-2,4-dinitrobenceno, y el 1,2-epoxi-3(p-nitrofenoxi)propano fue el sustrato epoxi, ambos disueltos previamente en etanol absoluto. La medición se basó en la medición espectrofotométrica de las cinéticas de formación de los conjugados GSH-arilo, que absorbe a 340 nm, y GSH-epoxi, que absorbe a 360 nm (Kaplowitz y col., 1975). El medio de reacción para ambas determinaciones fue un amortiguador fosfato de sodio 60 mM, a pH 7,4 para el sustrato arilo y a pH 6,5 para el sustrato epoxi, GSH 10 mM y sustrato (arilo o epoxi) 1 mM, pre-incubado a 25°C durante

2 minutos. A este medio se adicionó 200 μ l de sobrenadante, diluido 50 veces en la medición de la actividad arilo, y se registraron aumentos en las A_{340} (arilo) y A_{360} (epoxi)/minuto, a 25°C, utilizando el espectrofotómetro e inscriptor descritos en la sección H.2. Para cálculos de actividad arilo se utilizó el coeficiente de extinción molar del conjugado GSH-arilo ($9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y para los de actividad epoxi el coeficiente de extinción molar del conjugado GSH-epoxi ($0,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados de las mediciones de ambas actividades se expresaron en nmoles de producto/minuto/mg de proteína y en μ moles de producto/minuto/g de hígado.

4.1.2. Gama-glutamil transferasa ([5-glutamil]-péptido: aminoácido 5-glutamil transferasa; EC 2.3.2.2). Se midió en homogeneizados hepáticos (sección E.1.) y de riñón, preparados en forma análoga a los de hígado, de ratas tratadas con T₃ durante 1, 2 y 3 días. El método empleado cuantificó espectrofotométricamente, a 405 nm, a la p-nitroanilina, producto de la transferencia de la porción gama-glutamilo al aceptor glicilglicina, cuando este último interactúa con gama-glutamil-p-nitroanilida en una reacción catalizada por la gama-glutamil transferasa (Tate y Meister, 1985). El medio de reacción, para ambos homogeneizados (hepáticos y renales), fue un amortiguador amediol 47,6 mM a pH 8,0 que contenía MgCl_2 10 mM, gama-glutamil-p-

nitroanilida 45 mM y glicilglicina 50 mM, en un volumen de 1 ml, al cual se adicionó 50 μ l de homogeneizado, el de riñón diluido 100 veces. Esta mezcla fue incubada a 25°C, con agitación suave, en un baño termoregulado Dubnoff, durante 15 minutos (muestras renales) o 30 minutos (muestras hepáticas) al cabo de los cuales se adicionó ácido acético 1,5 N, 2 ml a las muestras hepáticas y 4 ml a las muestras renales, centrifugando el precipitado que se formó a 11.000g por 10 minutos a 5°C, para determinar la A_{405} de los sobrenadantes en el espectrofotómetro descrito en la sección H.2. Previo a estos estudios, se probó la cinética de esta reacción y se determinó que las máximas actividades se obtenían a los 30 minutos de incubación (homogeneizados hepáticos) y a los 15 minutos de reacción (homogeneizados de riñón). Los cálculos se realizaron utilizando el coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina a 405 nm ($9,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y los resultados se expresaron en μ moles de producto/minuto/mg de proteína y en μ moles de producto/minuto/g de hígado.

4.2. Recambio de GSH in vivo. Fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, Brasil, gracias a un convenio CONICYT-CNPq. El recambio de GSH se evaluó en animales tratados con T_3 durante 3 días y que a tiempo cero recibieron un pulso de L-cisteína- S^{35} para marcar el

compartimento intracelular de GSH; así la velocidad de síntesis del tripéptido se pudo estimar a través de los cambios producidos en su radiactividad específica, cuando el GSH-S³⁵ fue diluido por moléculas nuevas de GSH no marcado (Lauterburg y col., 1980). En este estudio, los animales recibieron una dosis i.p. de 200 µCi de L-cisteína-S³⁵ (1 Ci/µmol)/kg de peso, disueltos en NaCl al 0,9% con DTT 10 mM y fueron luego sacrificados a las 1, 1,76, 2, 2,33 y 3 horas. Luego de efectuar una perfusión de los hígados in situ (sección E.1.), se preparó homogeneizados al 10% peso/volumen en HClO₄ 0,5 N con EDTA 5 mM. Después de una centrifugación a 2.000g por 15 minutos, a 5°C, en una centrifuga Sorvall RC-2B refrigerada, se descartó el pellet y se trabajó con los sobrenadantes para determinar en ellos las radiactividades total y específica del GSH-S³⁵. Previo a esto, se separó el GSH del GSSG, de la cisteína y de la cistina mediante HPLC, utilizando una columna Bondapack-RP C₁₈, 10 µ, y eluyendo con H₃PO₄ al 0,05%, con una velocidad de flujo de 0,7 ml/minuto. Se observó que el 100% del GSH eluye entre los 5 y 6 minutos, por lo que se utilizó el volumen eluido a estos tiempos para cuantificar tanto el contenido de GSH como la radiactividad de éste. La medición del GSH presente en el eluido y en el tejido hepático se realizó mediante el método espectrofotométrico descrito por Tietze (1969) (sección I.3.3.). La radiactividad del GSH-S³⁵,

expresada en cpm, se determinó con un contador de centelleo líquido Beckmann LS 5.000. En todos los experimentos se observó que, luego del pulso de cisteína-S³⁵, el decaimiento o desaparición del GSH-S³⁵ (cpm/g de hígado versus tiempo o cpm/ μ mol de GSH versus tiempo) sigue una cinética de primer orden. La radiactividad específica del GSH-S³⁵, cpm/ μ moles totales de GSH en el eluido, permitió realizar el cálculo de la velocidad de recambio de GSH, representada por la pendiente de la línea de regresión del log de este parámetro en el tiempo y expresada en h⁻¹ (Lauterburg y col., 1980).

4.3. Eflujo de GSH.

4.3.1. Eflujo sinusoidal. Se evaluó en hígado perfundido, preparado de acuerdo a lo descrito en la sección C, de ratas tratadas con T₃ durante 1, 2 y 3 días. Luego de 15 minutos de perfusión, período en el cual los hígados se recuperaron del proceso quirúrgico, se colectó 7 muestras de líquido de perfusión igualmente espaciadas en el tiempo, durante un período total de una hora, para determinar en cada una de ellas los contenidos de GSH (nmoles/ml de perfusado) (Tietze, 1969), LDH (mU/ml de perfusado) (Bergmeyer y Bernt, 1974) y proteínas (mg/ml de perfusado) (Lowry y col., 1951). Durante todo el tiempo de duración de cada experimento se registró la velocidad de QO₂, a través de su evaluación polarográfica en el líquido efluente (Estabrook, 1967), ya que la constancia de este parámetro, y las magnitudes de los

eflujos sinusoidales de LDH y proteínas en relación a los valores encontrados en el órgano, son índices de viabilidad de éste (Sies, 1978). Al final de cada experimento se determinó el peso total del hígado y se tomó una muestra de tejido para evaluar los contenidos de GSH (μ moles/g hígado) (Tietze, 1969), deshidrogenasa láctica (U/g hígado) (Bergmeyer y Bernt, 1974) y proteínas (mg/g hígado) (Lowry y col., 1951). Al multiplicar los valores promedio de las 7 determinaciones de los contenidos de GSH, LDH y proteínas, por la velocidad de flujo de la perfusión (ml/g hígado/minuto) se obtuvo las velocidades de eflujo de GSH (nmoles/g hígado/minuto), LDH (mU/g hígado/minuto) y proteínas (mg/g hígado/minuto), respectivamente. El cociente entre las velocidades de eflujo así calculadas y los respectivos contenidos de estas biomoléculas en el órgano representa la velocidad de eflujo sinusoidal fraccional para cada una de ellas, expresada en h^{-1} . Se calculó además el eflujo integrado de GSH (nmoles/g hígado), mediante una integración de todos los valores obtenidos entre los 25 y los 75 minutos de perfusión.

4.3.2. Eflujo biliar. Se efectuó en muestras de bilis, obtenidas según lo descrito en la sección D, de ratas tratadas con T₂ durante 3 días. Al final de cada experimento se determinó el peso total del hígado y se tomó una muestra de tejido para evaluar el contenido de GSH (μ moles/g hígado)

mediante el ensayo catalítico descrito por Tietze (1969); este ensayo también se utilizó para la medición del contenido del GSH biliar, en alícuotas de 10 μ l de la bilis, diluida 10 veces (μ moles/ml de bilis). La determinación de la velocidad de flujo biliar (μ l/g hígado/minuto), según se describió en la sección D, permitió calcular la velocidad de excreción o eflujo biliar de GSH (nmoles/g hígado/minuto). El cociente entre la velocidad de eflujo biliar y el contenido de GSH en el órgano, representa la velocidad de eflujo biliar fraccional de GSH, expresada en h^{-1} . Para conocer la relación GSH/GSSG biliar, se evaluó el nivel de GSH y GSSG en experimentos paralelos a los planteados. Se utilizó el método enzimático de Bernt y Bergmeyer (1974) descrito en la sección I.2., que permitió la medición individual de ambas formas, reducida y oxidada, del tripéptido en alícuotas de bilis previamente diluidas.

J. DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración de las proteínas, presentes en las diversas muestras biológicas analizadas en los experimentos relatados, fue determinada por el método descrito por Lowry y col. (1951), utilizando como estándar una solución de albúmina de bovino que contenía 1 mg de proteína/ml.

K. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

Los resultados de todos los experimentos, se expresaron como el promedio de al menos 4 determinaciones, más menos el

error estándar de la media. El significado estadístico de las diferencias entre los animales control y los tratados con T_3 se determinó mediante el cálculo del "t crítico", según Student, para resultados no pareados, con un límite de confianza máximo de 5%, unilateral. En el experimento del recambio de GSH in vivo, la significancia estadística se estimó mediante un análisis de varianza, unilateral, para 2 grupos experimentales de distinto tamaño (n), empleando el modelo al azar.

RESULTADOS

A. EVALUACION DE LA CONDICION HIPERTIROIDEA DE LOS ANIMALES.

Los criterios que se utilizaron para evaluar la condición tiroidea de las ratas fueron las mediciones de los niveles séricos de T_3 y la temperatura rectal de ellos, ambas realizadas 24 horas después de la administración de la última dosis de T_3 . En la figura 1 se presentan los niveles séricos de T_3 en animales tratados por 1, 2 y 3 días con esta hormona. Se puede apreciar que, después de una dosis de T_3 se produce un incremento de al menos un orden de magnitud en su concentración plasmática. Luego de 2 y 3 dosis de T_3 se observa una tendencia a la disminución de los niveles séricos de la hormona, posiblemente debido al efecto de retroalimentación negativa que ejerce la T_3 exógena sobre su propia síntesis, mediado por una disminución en la liberación de la hormona liberadora de tirotrófina por el hipotálamo y de la hormona estimuladora de la tiroides por la hipófisis (Larsen, 1982). Alternativamente, este cambio en los niveles séricos de T_3 podría implicar una mayor catabolización de la hormona (Loeb, 1986), puesto que la supresión de la síntesis endógena de T_3 no da cuenta de la

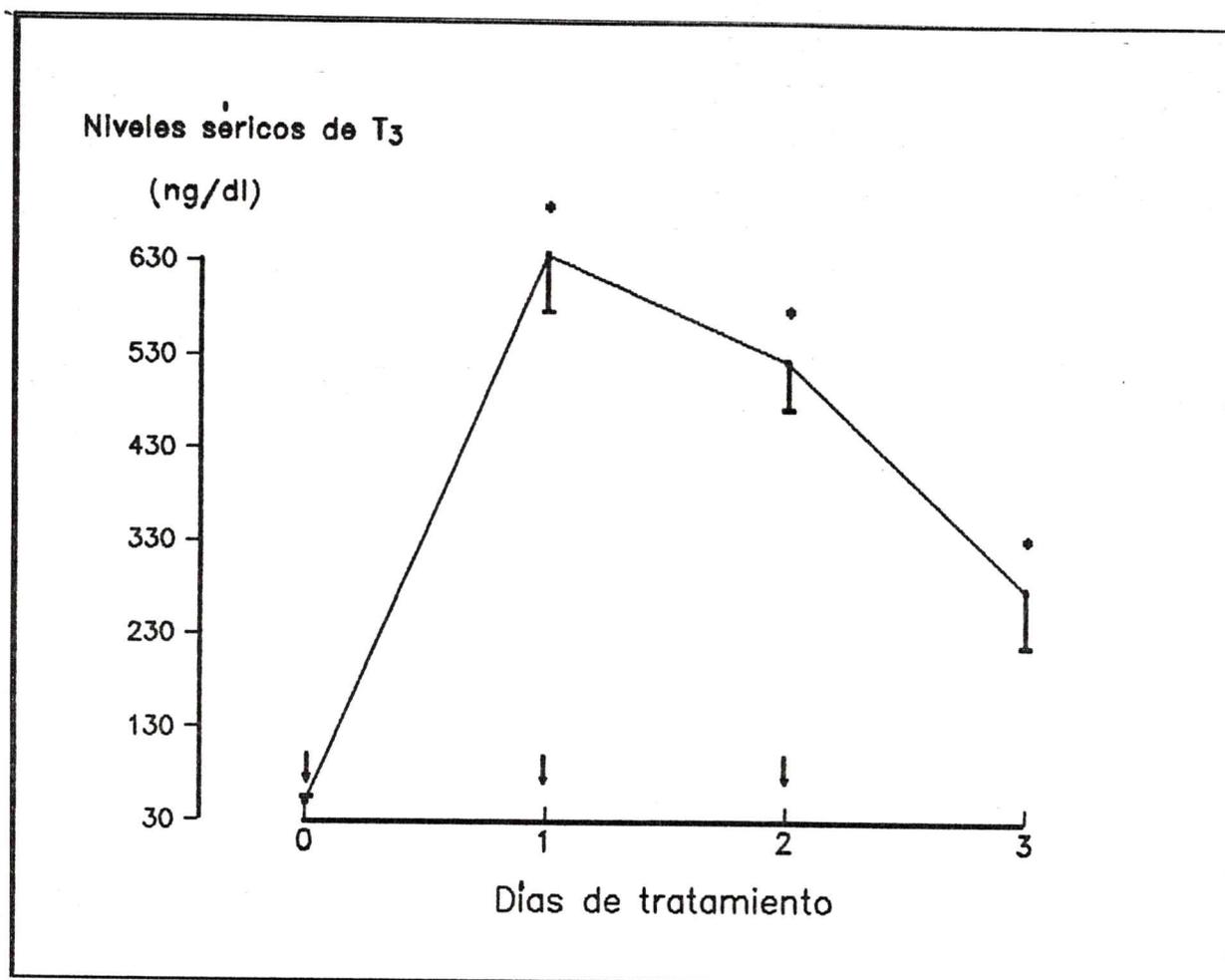


Figura 1. Efecto del hipertiroidismo sobre los niveles séricos de T₃ en ratas.

Grupos de ratas alimentadas fueron tratadas con 0,1 mg de T₃/Kg i.p. por 1, 2 y 3 días consecutivos (flechas) o con el vehículo de la hormona (controles; tiempo cero). La medición de los niveles séricos de T₃ por radio inmuno ensayo se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 4 a 5 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-9}$ respecto a controles.

disminución observada a los 2 y 3 días de tratamiento (figura 1). No obstante, en ambos casos los niveles séricos de T_3 son significativamente mayores que aquéllos en ratas controles (0 días de tratamiento), estando los valores a los 3 días de tratamiento en el rango descrito en pacientes hipertiroideos (Videla y col, 1988). Paralelamente la temperatura rectal de los animales tratados con dosis diarias de T_3 por 1 a 7 días consecutivos aumenta significativamente en todos los períodos de tratamiento, en relación a ratas control que recibieron dosis diarias del vehículo de la hormona (NaOH 0,1 N) (figura 2).

De acuerdo a estos criterios, se puede concluir que el modelo experimental usado induce una condición hipertiroidea en los animales, con un aumento concomitante de la calorificación.

B. EVALUACION DE PARAMETROS CELULARES ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD PROOXIDATIVA HEPATICA.

Antecedentes entregados en la INTRODUCCION señalan que, en condiciones basales, alrededor de un 20% del QO_2 hepático total corresponde a una respiración celular no relacionada con la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, una fracción del cual podría representar oxígeno utilizado en eventos celulares que involucren su reducción univalente. Debido a que la interacción de T_3 con el hígado aumenta el QO_2 total, se evaluaron diversos parámetros asociados a la

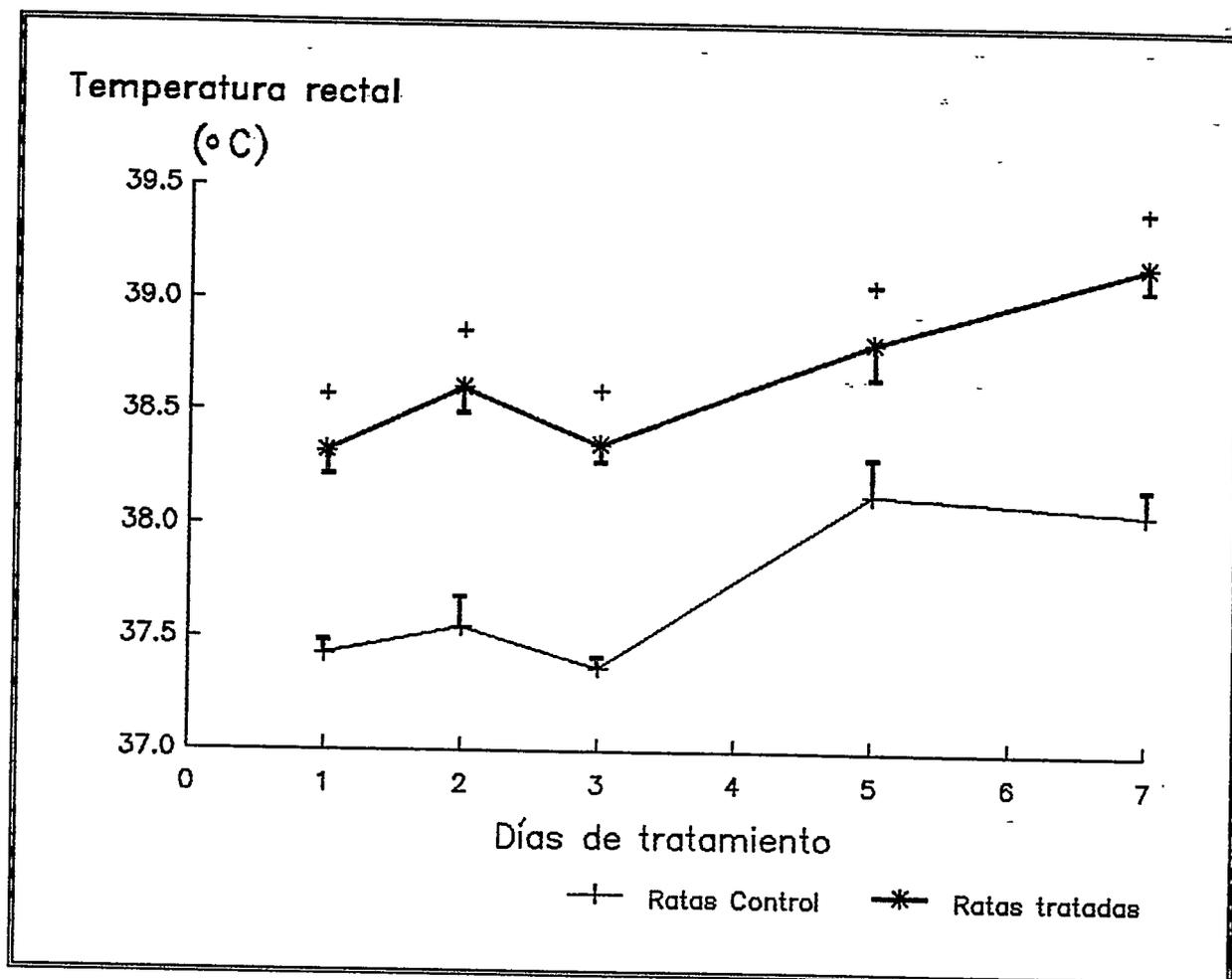


Figura 2. Efecto del hipertiroidismo sobre la temperatura rectal de la rata.

El tratamiento de los animales y la medición de la temperatura rectal mediante una termocupla, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 7 a 43 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (+): $p < 5 \times 10^{-3}$ respecto a controles.

reducción univalente del oxígeno que incluyen respuestas respiratoria, lipoperoxidativa y quimioluminiscente en hígado y en fracciones subcelulares hepáticas.

1. Evaluación de la respiración, lipoperoxidación, y quimioluminiscencia hepáticas.

1.1. RSA hepática. El efecto del tratamiento con T_3 durante 3 días sobre la RSA hepática se muestra en la tabla 1. La infusión del agente antioxidante alopurinol a preparaciones de hígado perfundido, permite visualizar un componente respiratorio hepático sensible al alopurinol (respiración sensible a alopurinol), cuya magnitud es significativamente mayor, en un 64%, en los animales tratados que en los animales control. De igual manera, la infusión del agente antioxidante DFO a preparaciones de hígado perfundido, permite visualizar un componente respiratorio hepático sensible al DFO (respiración sensible a DFO), cuya magnitud es significativamente mayor, en un 62%, en los animales tratados que en los animales control (tabla 1).

En la figura 3 se muestra el aumento en el QO_2 hepático (ΔQO_2) inducido por el tratamiento con T_3 , y el porcentaje de este ΔQO_2 que corresponde al incremento en la RSA (ΔRSA) en los animales tratados; este porcentaje, representa la fracción del ΔQO_2 que se relaciona con la utilización del oxígeno en reacciones de transferencia de un electrón. El incremento en la RSA hepática en las ratas hipertiroideas se

TABLA 1
Efecto del hipertiroidismo sobre la RSA en hígado aislado
y perfundido.

QO ₂ (μmol/min/ g hígado)	Ratas control (n =5)	Ratas tratadas con T ₃ (n =4)	% de efecto	p
BASAL	2,10±0,02	2,62±0,04	+ 25,4	5x10 ⁻³
+ Alopurinol 1 mM	1,95±0,03	2,39±0,03	+ 22,7	5x10 ⁻³
RSA	0,13±0,01	0,21±0,01	+ 63,8	5x10 ⁻³
BASAL	2,03±0,06	2,52±0,10	+ 24,1	10 ⁻²
+ DFO 5 mM	1,83±0,08	2,20±0,10	+ 20	5x10 ⁻²
RSA	0,20±0,01	0,32±0,03	+ 62,4	10 ⁻²

El tratamiento de los animales y la técnica de perfusión hepática se describen en Materiales y Métodos. Tanto el QO₂ basal como aquél en presencia del antioxidante, se midió polarográficamente como está descrito en Materiales y Métodos. Las concentraciones señaladas para los antioxidantes Alopurinol y DFO, son las que ellos alcanzaron en el líquido de perfusión. Los resultados representan el promedio ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos.

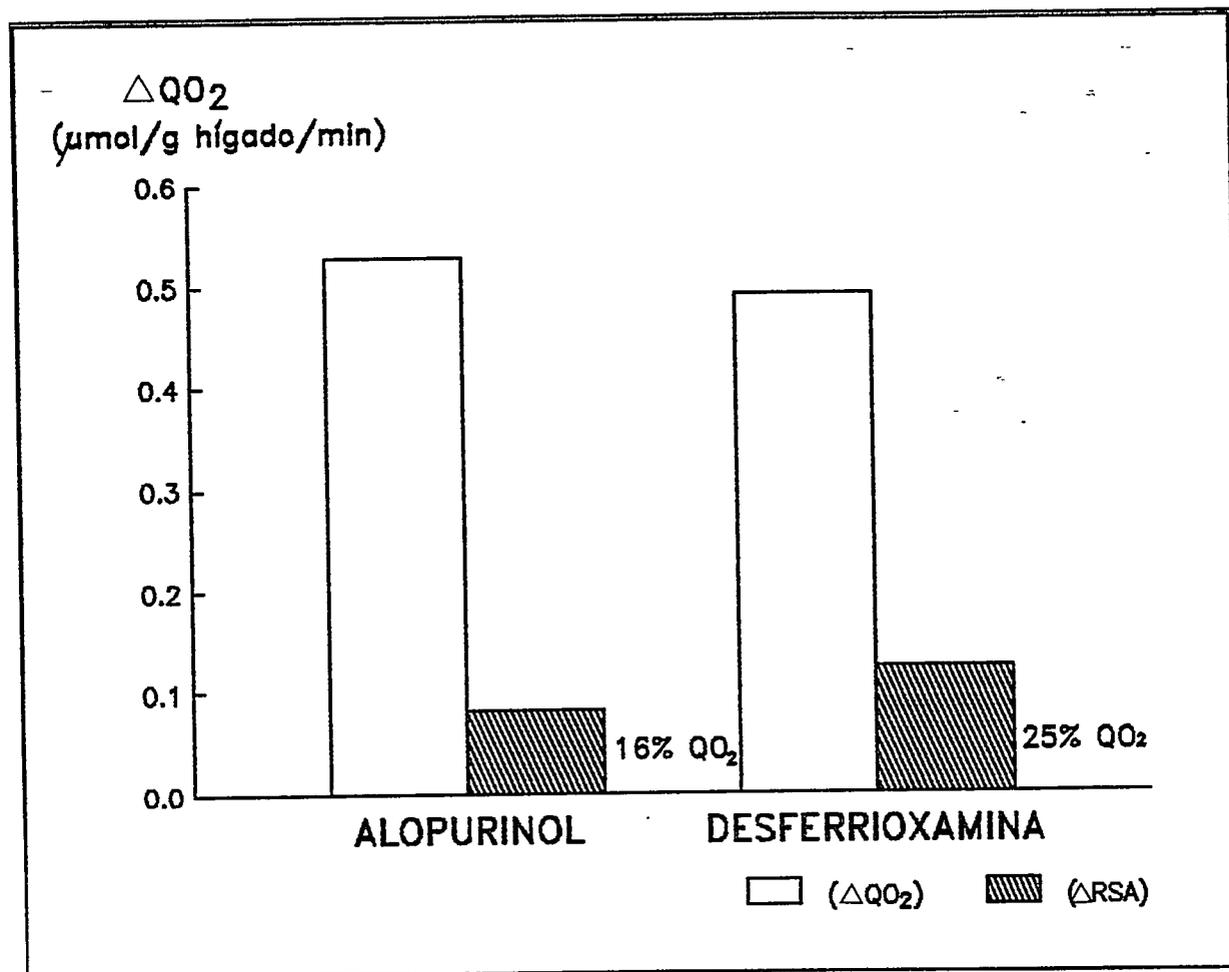


Figura 3. Relación entre ΔQO_2 (QO_2 ratas control- QO_2 ratas tratadas) y ΔRSA (RSA ratas control- RSA ratas tratadas) en hígado perfundido en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales (T_3 , 3 días) y la técnica de perfusión hepática se describen en Materiales y Métodos. Tanto el QO_2 basal como aquél en presencia de los antioxidantes alopurinol (1 mM) y DFO (5 mM), se midió polarográficamente como está descrito en Materiales y Métodos. El % de QO_2 indicado para cada antioxidante, corresponde a la relación $\Delta RSA/\Delta QO_2$ para 5 ratas control y 4 ratas tratadas.

produjo en ausencia de cambios significativos en la relación peso hígado/peso corporal [control: $3,46 \pm 0,19$ (n = 5) g/100 g de peso corporal; T_3 : $3,62 \pm 0,30$ (n = 4) , N.S.].

1.2. Índice TBAR. En la figura 4 se observa el efecto del tratamiento con T_3 durante 3 días sobre el índice TBAR, indicador de la lipoperoxidación celular, evaluado en homogeneizados hepáticos. Se obtiene un aumento significativo de este parámetro que corresponde a un 25% del valor de los animales control, en ausencia de cambios significativos en el contenido total de proteínas hepáticas [control: $195,5 \pm 3,85$ (n = 42) mg/g de hígado; T_3 : $196,4 \pm 6,85$ (n = 37), N.S.].

Las mediciones del índice TBAR efectuadas en muestras de bilis de estas ratas, así como las de excreción biliar de TBAR se señalan en la tabla 2. Se puede observar un incremento significativo respecto a animales no tratados en ambos casos, siendo el del índice TBAR de un 30% y el de la excreción biliar de un 55%.

1.3. Mediciones de Quimioluminiscencia.

1.3.1. Estudios *in vivo*. Los resultados de esta medición se muestran en la figura 5. En todos los periodos de tratamiento, se observa un aumento significativo de la quimioluminiscencia espontánea hepática con un efecto máximo, 155% de incremento respecto a animales control (0 días de tratamiento), en los animales tratados con T_3 .

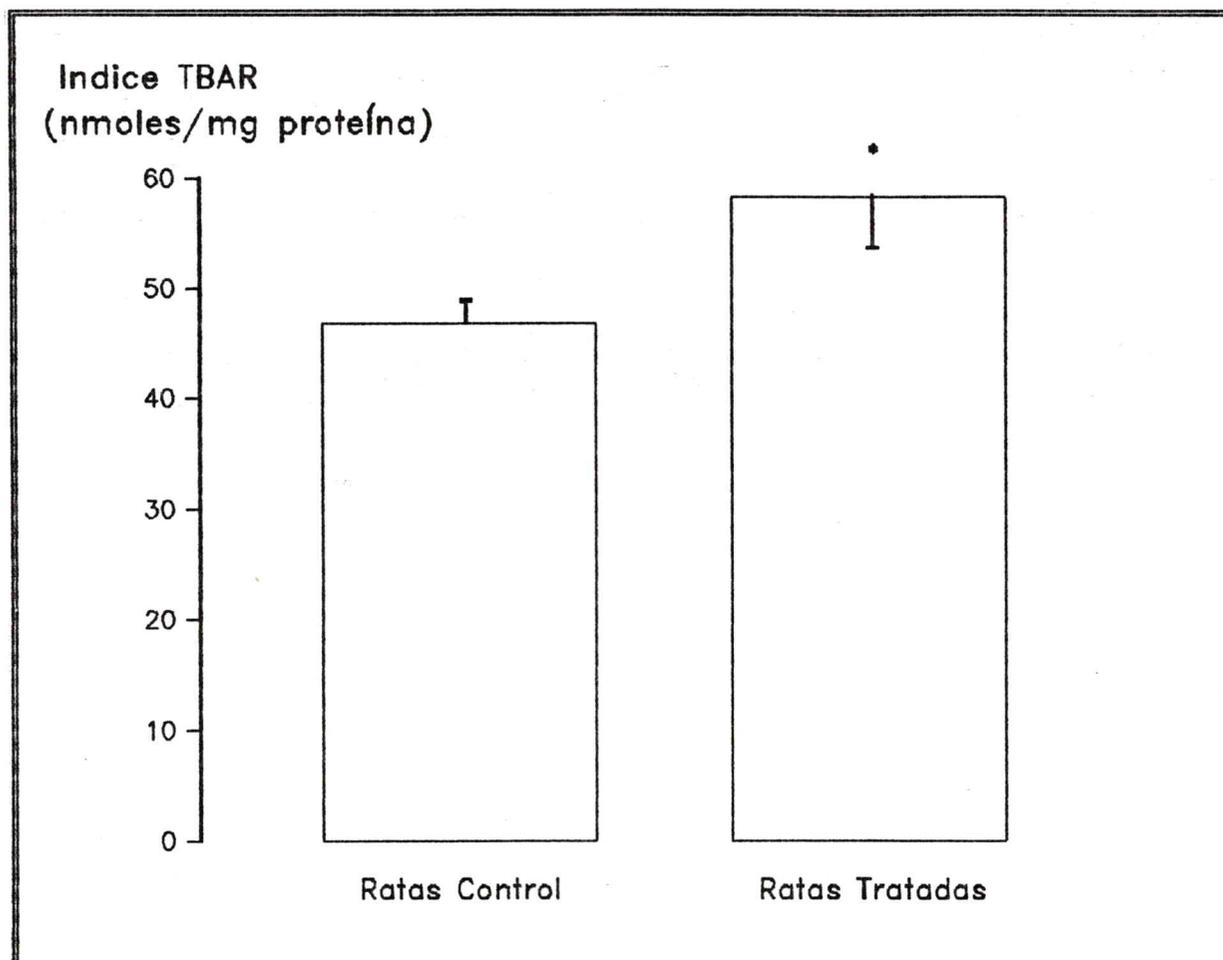


Figura 4. Efecto del hipertiroidismo sobre el índice TBAR de homogeneizados hepáticos de ratas tratadas con T_3 durante 3 días.

El tratamiento de los animales y la preparación de los homogeneizados se describen en Materiales y Métodos. El índice TBAR se midió espectrofotométricamente a 535 nm, luego de adicionar TBA al 0,67% a los sobrenadantes de una precipitación de los homogeneizados con TCA al 30%. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 14 ratas control y 13 ratas tratadas. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (*): $p = 0,0256$ respecto a controles.

TABLA 2
Efecto del hipertiroidismo sobre el índice y la excreción
biliares de TBAR.

	Ratas control	Ratas tratadas con T ₃ (3 días)
Índice TBAR biliar (μ moles MDA/ml bilis)	5,765 \pm 0,451 (n = 8)	7,627 \pm 0,179 (n = 8)
% de efecto		+ 32,3
p		1,6x10 ⁻⁴
Excreción biliar de TBAR (nmoles MDA/g hígado/minuto)	6,08 \pm 0,716 (n = 8)	9,402 \pm 0,44 (n = 10)
% de efecto		+ 54,6
p		8x10 ⁻⁴

El tratamiento de los animales y la obtención de muestras de bilis se describen en Materiales y Métodos. El índice y excreción de TBAR se evaluaron espectrofotométricamente, a 535 nm, luego de adicionar TBA al 0,67% a los sobrenadantes de una precipitación con TCA al 30% de las muestras de bilis. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos.

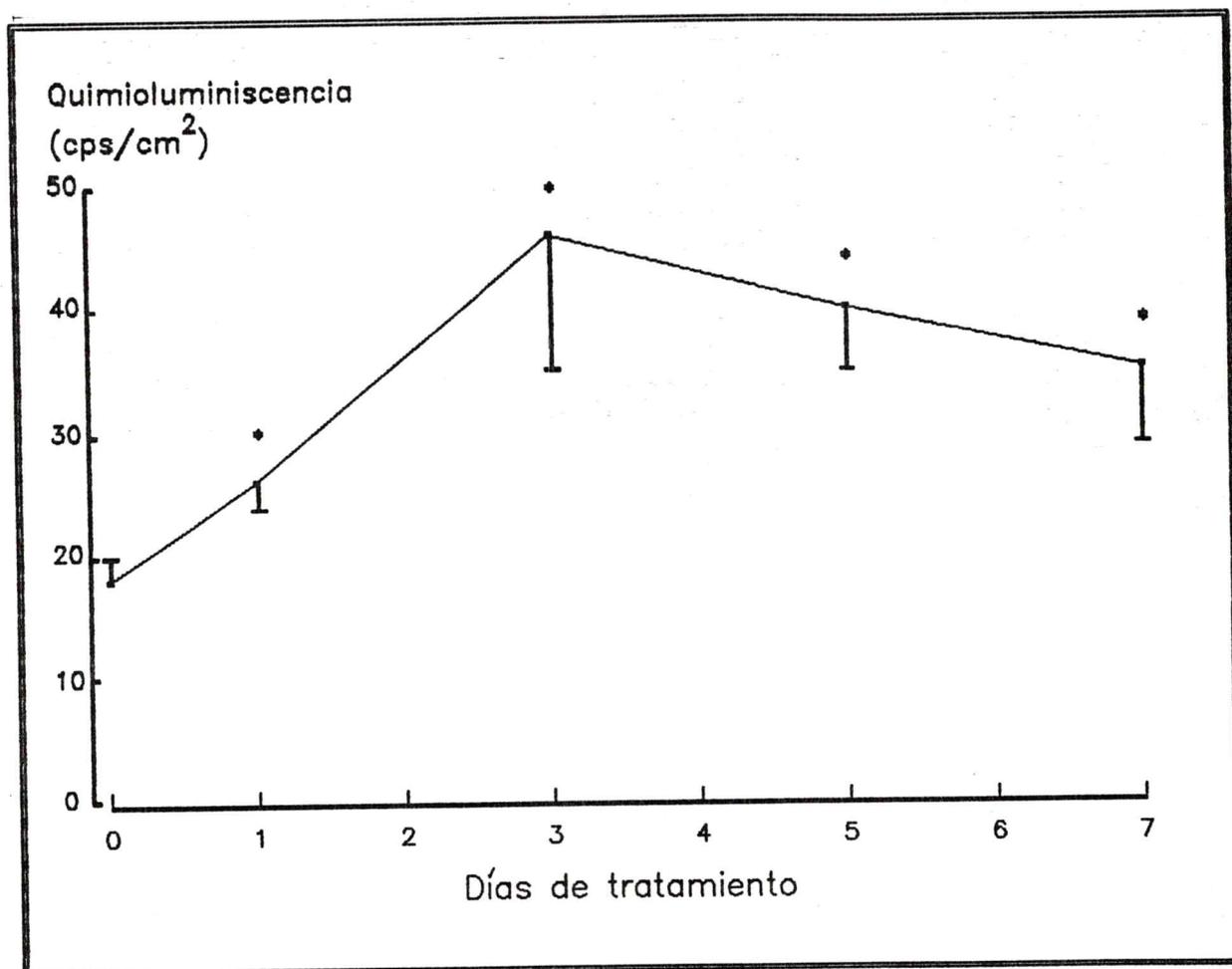


Figura 5. Quimioluminiscencia del hígado *in situ* de ratas tratadas con T₃ durante 1 a 7 días.

El tratamiento de los animales y la medición de la quimioluminiscencia mediante un contador de fotones, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 5 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-3}$ respecto a controles.

durante 3 días. Considerando que este ensayo representa una medición órgano-específica y no invasiva para el órgano, de la emisión de fotones por especies excitadas resultantes de interacciones de oxi y peroxi radicales orgánicos involucrados en el proceso de lipoperoxidación (Boveris y col., 1980; Videla y col., 1983), los resultados de este estudio señalan el establecimiento de una condición de estrés oxidativo en el hígado de estos animales, como consecuencia de la administración de T_3 . Por otro lado, este perfil de quimioluminiscencia coincide con el perfil de incremento en el QO_2 hepático, obtenido en estudios anteriores (Fernández y col., 1985).

1.3.2. Estudios in vitro. Se realizaron mediciones de quimioluminiscencia, tanto espontánea como inducida por t-BOOH, utilizando homogeneizados hepáticos de animales tratados con T_3 durante 1, 2 y 3 días. La condición hipertiroidea no produjo cambios significativos en el contenido total de proteínas [control: $195,5 \pm 3,85$ (n = 42) mg/g de hígado; T_3 1 día: $218,5 \pm 23,5$ (n = 6); T_3 2 días: $187 \pm 9,45$ (n = 7); T_3 3 días: $196,4 \pm 6,85$ (n = 37), N.S.I.

Los resultados de la medición de la quimioluminiscencia espontánea se muestran en la tabla 3. Se observa un aumento significativo a los 3 días de tratamiento, lo que sustenta la proposición del establecimiento de un estrés oxidativo hepático en este período de tratamiento.

TABLA 3
Efecto del hipertiroidismo sobre la quimioluminiscencia espontánea de homogeneizados hepáticos.

Tratamiento de los animales	cpm/mg de proteína $\times 10^{-3}$	% de efecto	p
Controles (Na OH 0,1N)	1,86 \pm 0,124 (n = 16)		
T ₃ 1 día	2,08 \pm 0,076 (n = 4)	+ 11,9	N.S.
T ₃ 2 días	2,05 \pm 0,438 (n = 6)	+ 10,1	N.S.
T ₃ 3 días	3,42 \pm 0,548 (n = 6)	+ 83,8	6 $\times 10^{-4}$

El tratamiento de los animales, la preparación de los homogeneizados y la medición de la quimioluminiscencia en un medio de reacción que contenía KCl 150 mM, Tris 5 mM, EDTA 1 mM y 1 mg de proteínas/ml, a pH 7,4, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

Los resultados de la medición de la quimioluminiscencia inducida por t-BOOH se muestran en la tabla 4. Se observa una disminución progresiva en la respuesta quimioluminiscente, la que es significativa a los 3 días de tratamiento y alcanza un valor que es un 29% del de los animales control. Este resultado puede atribuirse a la disminución progresiva en el contenido de citocromo P-450 que presentan estos animales, entre 1 y 3 días de tratamiento (Fernández y col., 1985; Kato y Takahashi, 1968). Se ha señalado que el t-BOOH puede interactuar con el citocromo P-450, experimentando una ruptura homolítica que lo convertiría en las especies radicalarias HO· y t-BO· que pueden iniciar el proceso lipoperoxidativo, con consumo de oxígeno, y generar especies quimioluminiscentes (Cadenas y Sies, 1982). El menor contenido de citocromo P-450 en animales que han recibido 3 dosis de T₃, explicaría entonces los resultados obtenidos en este estudio.

Considerando que las especies excitadas se forman por interacciones de radicales libres orgánicos, productos del proceso de lipoperoxidación, hay concordancia entre estos resultados y los cambios en el índice TBAR (tabla 2 y figura 4).

TABLA 4
Efecto del hipertiroidismo sobre la quimioluminiscencia,
inducida por t-BOOH, de homogeneizados hepáticos.

Trata- miento de los animales	cpm/mg de proteína x 10 ⁻³	% de efecto	p
Controles	28,30 ± 2,6 (n = 11)		
T ₃ 1 día	25,31 ± 0,80 (n = 5)	- 10,6	N.S.
T ₃ 2 días	21,45 ± 2,56 (n = 7)	- 24,2	N.S.
T ₃ 3 días	20,20 ± 1,0 (n = 6)	- 28,6	< 5x10 ⁻⁴

El tratamiento de los animales, la preparación de los homogeneizados y la medición de la quimioluminiscencia en un medio de reacción que contenía KCl 150 mM, Tris 5 mM, EDTA 1 mM, t-BOOH 3 mM y 1 mg de proteínas/ml, a pH 7,4, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

2. Evaluación de la lipoperoxidación y de las respuestas respiratoria y quimioluminiscente de fracciones subcelulares hepáticas.

2.1. Estudios microsomales. Esta fracción, rica en membranas de retículo endoplásmico, es tal vez uno de los blancos preferenciales para la acción prooxidativa de las hormonas tiroideas.

2.1.1. Mediciones del índice TBAR. La figura 6 muestra los resultados de la medición de este parámetro en animales tratados con T_3 desde 1 a 7 días consecutivos. Se observa un incremento temprano y sostenido (2 a 7 días), con valores que fluctúan entre 30% y 50% por encima del índice de los animales control (0 días de tratamiento). Estos resultados, obtenidos en ausencia de cambios significativos en el contenido de proteínas microsomales [control: $10,04 \pm 0,34$ (n = 36) mg/g de hígado; T_3 1 día: $10,5 \pm 0,76$ (n = 9); T_3 2 días: $9,07 \pm 0,52$ (n = 10); T_3 3 días: $11,45 \pm 0,71$ (n = 10); T_3 7 días: $9,54 \pm 0,40$ (n = 8), N.S.] señalan una activación del proceso lipoperoxidativo en esta fracción, concordando con hallazgos previos que señalan un aumento en la generación de $O_2^{\cdot -}$ en ratas tratadas con T_3 durante 2 a 7 días (Fernández y col., 1985). Por otro lado, el incremento del índice TBAR microsomal en los animales que recibieron 3 dosis de T_3 podría contribuir al incremento de este parámetro que muestran los homogeneizados hepáticos (figura

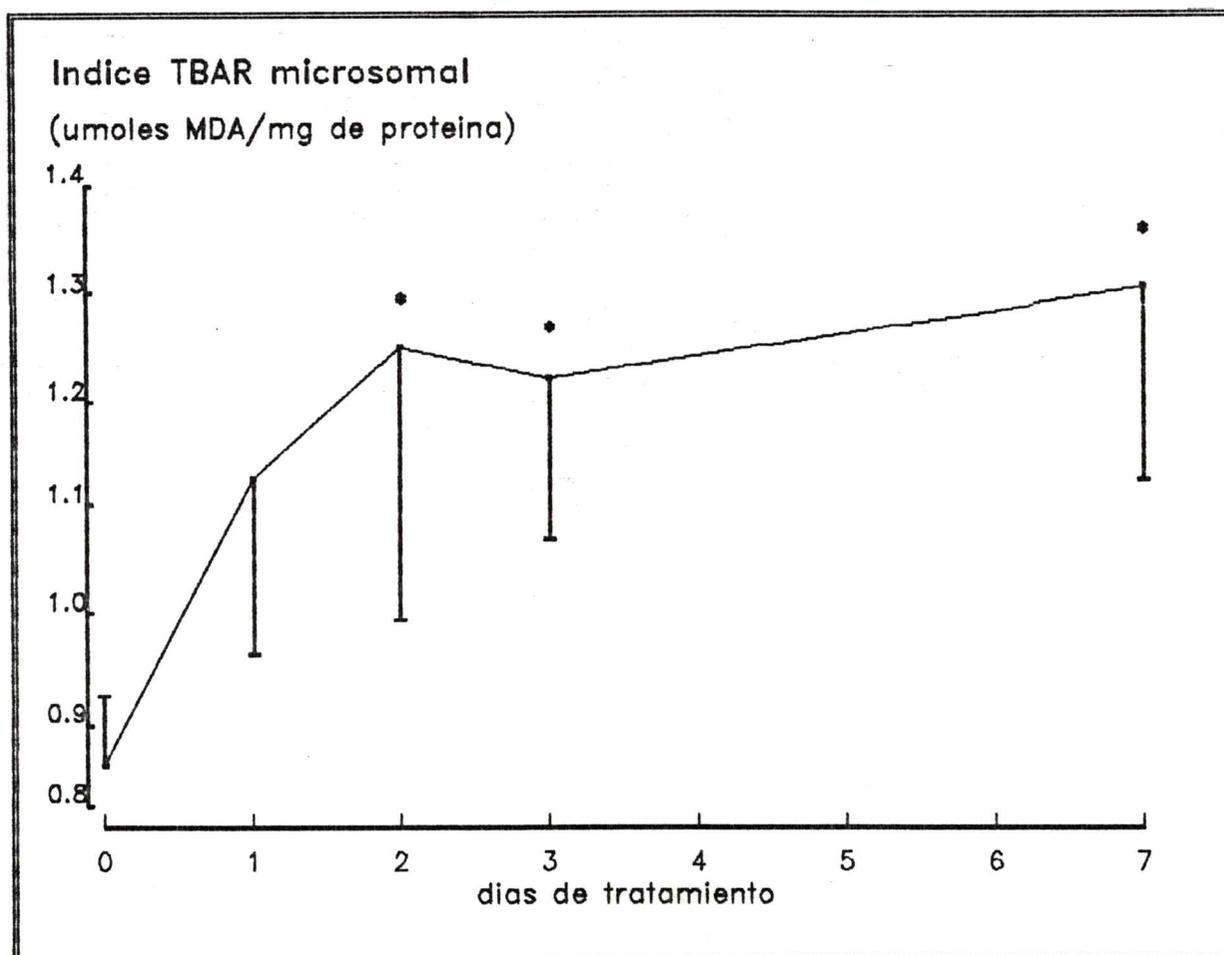


Figura 6. Efecto del hipertiroidismo sobre el índice TBAR de microsomas hepáticos de ratas tratadas con T_3 durante 1 a 7 días.

El tratamiento de los animales y la preparación de la fracción microsomal se describen en Materiales y Métodos. El índice TBAR se midió espectrofotométricamente a 535 nm, luego de adicionar TBA al 0,67% a los sobrenadantes de una precipitación de los pellets micromales, resuspendidos en amortiguador KCl 150 mM y Tris 5 mM a pH 7,4, con TCA al 30%. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 5 a 21 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-3}$ respecto a controles.

4) y la bilis (tabla 2).

2.1.2. Mediciones de respiración microsomal. Los resultados de la evaluación del $\dot{Q}O_2$ en esta fracción se muestran en la figura 7.

La medición del $\dot{Q}O_2$ en presencia de NADPH muestra un incremento significativo sólo en los animales tratados 2 días con T_3 . La medición del $\dot{Q}O_2$ en presencia de un antioxidante, el CN-3, muestra una inhibición, sólo en los animales con 2 días de tratamiento. Esta inhibición de un 39%, en relación a la situación en ausencia del antioxidante, corresponde a una RSA que revela la naturaleza radicalaria del incremento en la respiración microsomal. La RSA, cuyos valores se muestran en la figura 8, corresponde a la diferencia entre el $\dot{Q}O_2$ medido en ausencia y en presencia del antioxidante, representando así a la fracción del oxígeno consumido que es utilizada en procesos radicalarios y que puede contribuir al incremento en la RSA ya señalado (tabla 1 y figura 3).

Al medir el $\dot{Q}O_2$ microsomal en presencia de un agente prooxidante, el t-BOOH, se observa una situación diferente a la anterior (figura 7). El $\dot{Q}O_2$ microsomal, inducido por t-BOOH disminuye significativamente sólo en los animales tratados 2 días con T_3 , en relación a los animales control. Se ha descrito que la adición de t-BOOH a microsomas hepáticos puede iniciar el proceso lipoperoxidativo, en

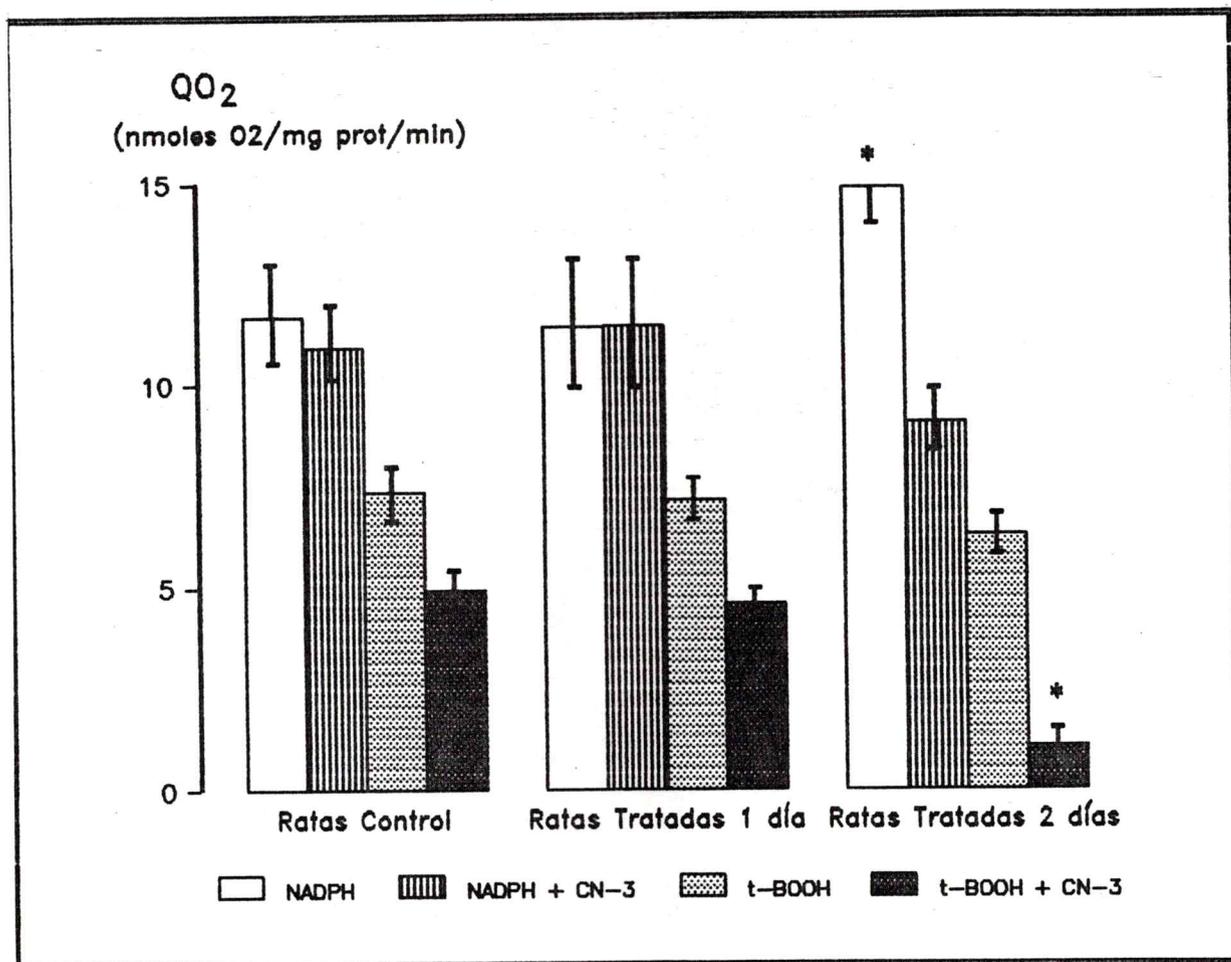


Figura 7. Respiración microsomal hepática, en presencia de NADPH y de t-BOOH, de ratas tratadas con T_3 durante 1 y 2 días. Efecto del CN-3.

El tratamiento de los animales, la preparación de la fracción microsomal y la medición del QO_2 en un medio de reacción que contenía 0,6 mg de proteína microsomal/ml de fosfato de sodio 120 mM a pH 7,4, suplementado con NADPH 0,13 mM o con t-BOOH 0,02 mM, se describen en Materiales y Métodos. La concentración de CN-3 adicionada a este medio fue 3 mM. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 7 a 21 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-9}$ respecto a controles.

ausencia de dadores de hidrógeno, con el concomitante consumo de oxígeno ya que este proceso es de naturaleza aeróbica (Cadenas y Sies, 1982). Como ya se ha señalado, el desencadenamiento del proceso lipoperoxidativo por el t-BOOH dependería del contenido de citocromo P-450 de la fracción microsomal, el que está significativamente disminuido en los animales que han recibido 2 dosis de T₃ (Fernández y col., 1985). Estos hallazgos están de acuerdo con la disminución en el QO₂ microsomal obtenida en animales tratados 2 días con T₃ (figura 7) y con la menor respuesta quimioluminiscente de los homogeneizados hepáticos de ratas tratadas 2 y 3 días con T₃, frente a la adición de t-BOOH (tabla 4). La medición del QO₂ microsomal en presencia del CN-3 (figura 7), muestra una reducción semejante en los animales control (33%) y los tratados 1 día con T₃ (35%) lo que indica una RMSA de magnitud semejante (figura 8). Este resultado está en concordancia con hallazgos previos que señalan que el contenido de citocromo P-450 de estos animales es semejante (Fernández y col., 1985). En la figura 8 se observa además que los animales que recibieron 2 dosis de T₃ manifiestan un aumento de un 54% en la RMSA respecto a los animales control.

2.1.3. Mediciones de Quimioluminiscencia. La tabla 5 muestra los resultados de las determinaciones de la quimioluminiscencia inducida por t-BOOH de la fracción

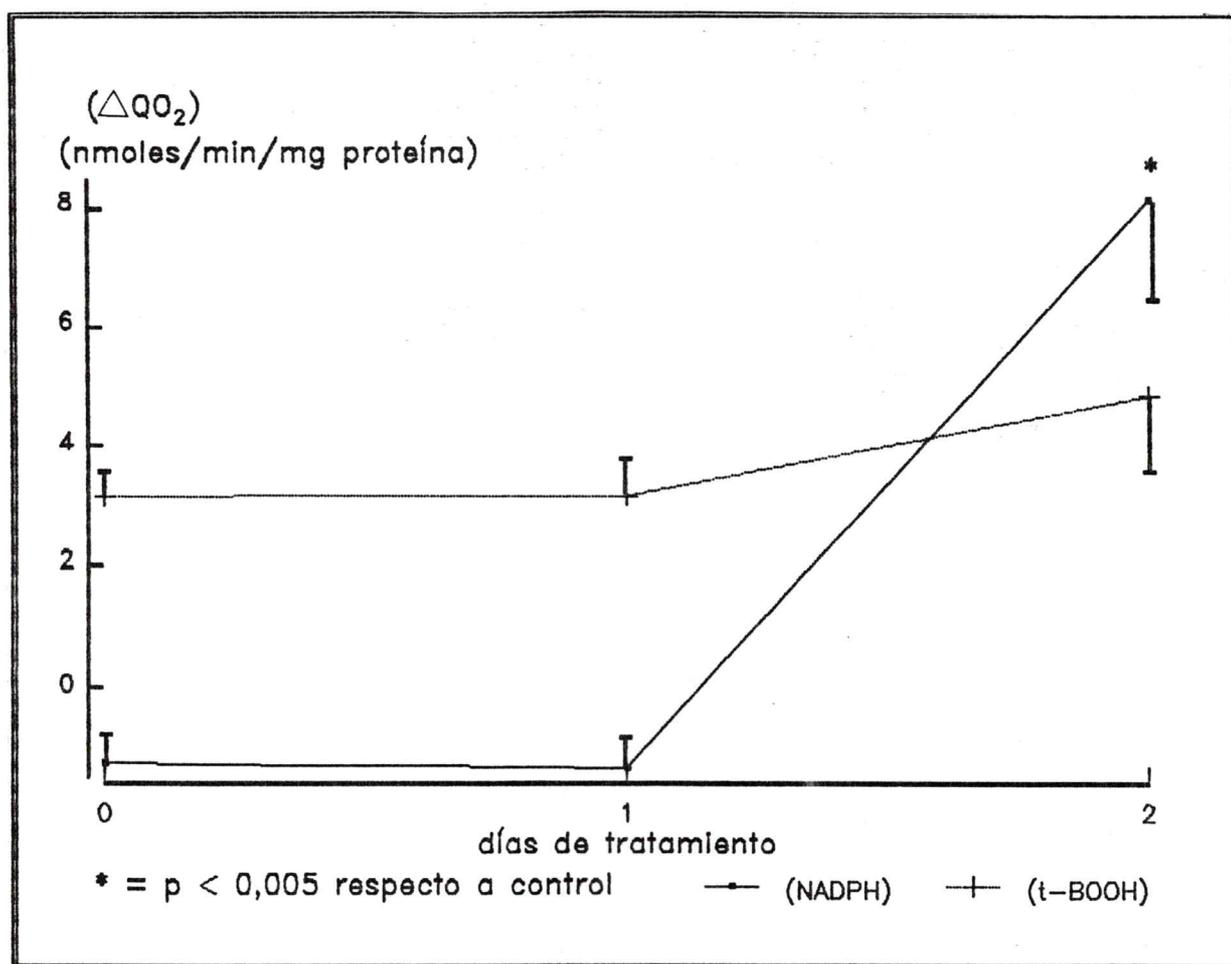


Figura 8. RSA, en presencia de NADPH o de t-BOOH, en el hígado de ratas tratadas con T_3 durante 1 y 2 días.

El tratamiento de los animales y la medición del QO_2 microsomal se describen en Materiales y Métodos. La RSA corresponde a la diferencia de QO_2 en presencia de NADPH o de t-BOOH y luego de la adición de CN-3, medidos como se indica en la figura 7. Los resultados corresponden al promedio \pm S.E.M. para un número de 5 a 10 animales por grupo experimental. (*): $p < 10^{-4}$ respecto a controles.

TABLA 5

Efecto del hipertiroidismo sobre la quimioluminiscencia, inducida por t-BOOH, de fracciones subcelulares hepáticas.

Frac- ción subce- lular	Tratamiento de los animales	cpm/mg de proteína $\times 10^{-3}$	% de efecto	p
Micro- somas	Controles (NaOH 0,1N)	72,3 \pm 2,6 (n = 9)		
	T ₃ 3 días	42,0 \pm 3,2 (n = 9)	- 41,9	< 5x10 ⁻³
Mito- con- drias	Controles (NaOH 0,1N)	41,5 \pm 2,3 (n = 7)		
	T ₃ 3 días	38,3 \pm 2,0 (n = 10)	- 7,7	N.S.

El tratamiento de los animales, la preparación de las fracciones subcelulares y la medición de la quimioluminiscencia en un medio de reacción que contenía KCl 150 mM, Tris 5 mM, EDTA 1 mM, t-BOOH 3mM y 1 mg de proteínas microsomales/ml o 0,25 mg de proteínas mitocondriales/ml, a pH 7,4, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

microsomal hepática de ratas tratadas 3 días con T_3 . Se observa una disminución significativa, de 42% respecto a ratas control, resultado que está de acuerdo con la disminución en el contenido de citocromo P-450 de estos animales (Fernández y col., 1985) y con la disminución significativa de la respuesta quimioluminiscente inducida por t-BOOH en homogeneizados hepáticos (tabla 4).

2.2. Estudios mitocondriales. La descripción de un componente respiratorio mitocondrial sensible a antioxidantes (Videla, 1984a) y el hallazgo experimental de la generación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 por mitocondrias aisladas en estado 4 (Turrens y Boveris, 1980), fueron antecedentes importantes para estudiar la actividad prooxidativa de mitocondrias hepáticas de animales hipertiroideos.

2.2.1. Mediciones de Quimioluminiscencia. La tabla 5 muestra que la respuesta quimioluminiscente inducida por t-BOOH de mitocondrias de ratas tratadas 3 días con T_3 , no es diferente a la manifestada por los animales control.

2.2.2. Evaluación de la generación de $O_2^{\cdot-}$ por partículas submitocondriales. Para efectuar estas determinaciones, se utilizó NADH o succinato de sodio como sustratos, y se realizaron todas las mediciones en presencia de la antimicina-A, inhibidor de la cadena mitocondrial de transporte de electrones a nivel del citocromo b. La adición de NADH a partículas submitocondriales en presencia de

antimicina-A reduce tanto a la NADH deshidrogenasa como a la pareja ubiquinona-citocromo b, estimulando la producción de O_2^- por ambos componentes de la cadena respiratoria, en tanto que la adición de succinato a la preparación mitocondrial en presencia de antimicina-A reduce sólo al complejo ubiquinona-citocromo b y estimula la producción de O_2^- por este complejo (Turrens y Boveris, 1980; Turrens y col., 1982a).

La tabla 6 muestra el efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de O_2^- por partículas submitocondriales de ratas tratadas 3 días con T_3 . La utilización de ambos sustratos mitocondriales reveló un importante y significativo aumento en los animales tratados respecto a los animales control, revelando así que las hormonas tiroideas pueden estimular el consumo de oxígeno mitocondrial a través de su reducción univalente.

Los valores que alcanzan las relaciones entre las generaciones de O_2^- con NADH y con succinato, 1,59 en las ratas control y 1,53 en las ratas tratadas, concuerdan con la existencia de al menos 2 sitios diferentes en la cadena transportadora de electrones mitocondrial que pueden reducir el oxígeno a O_2^- (Turrens y col., 1982a).

2.2.3. Mediciones de la generación de H_2O_2 . Estos estudios se realizaron utilizando mitocondrias intactas y partículas submitocondriales. Para efectuar estas mediciones se utilizó

TABLA 6
 Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad prooxidativa de mitocondrias hepáticas: generación de $O_2^{\cdot-}$ por partículas submitocondriales.

Prod. de $O_2^{\cdot-}$ (nmol/mg pr/min)	Ratas control	Ratas tratadas 3 días con T_3	% de efecto	p
NADH 0,1mM	0,43 ± 0,06 (n = 6)	1,04 ± 0,13 (n = 8)	+ 141,9	2,8x10 ⁻³
Succ. 5mM	0,27 ± 0,07 (n = 4)	0,68 ± 0,03 (n = 5)	+ 151,9	1,1x10 ⁻³

El tratamiento de los animales, la preparación de las partículas submitocondriales y la medición de la velocidad de producción de $O_2^{\cdot-}$ utilizando un amortiguador MSH a pH 7,4 con epinefrina 1 mM, antimicina-A 2 μ M, 150 U/ml de catalasa y 0,6 mg de proteína mitocondrial/ml, adicionando el sustrato mitocondrial, NADH o succinato de sodio, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

succinato de sodio o urato de sodio como sustratos y antimicina-A o azida de sodio como inhibidores mitocondriales.

Las figuras 9 a 12 ilustran la producción de H_2O_2 por mitocondrias intactas de hígado de ratas, tratadas 3 días con T_3 . La velocidad de generación de H_2O_2 corresponde a la pendiente ascendente, debido a la formación del complejo H_2O_2 -HRP. La pendiente inicial obtenida en todos los experimentos, luego de la adición de HRP al medio, corresponde a la producción de H_2O_2 utilizando sustrato endógeno (producción basal). La velocidad de producción de H_2O_2 se ve incrementada por la adición de succinato (figuras 9 y 10) o de urato (figuras 11 y 12), como también por las adiciones posteriores de antimicina-A o de azida.

El efecto del hipertiroidismo sobre la generación de H_2O_2 en condiciones basales y con succinato de sodio e inhibidores mitocondriales, expresada por mg de proteína mitocondrial o por g de hígado, se resume en las tablas 7 y 8, respectivamente. Se puede apreciar un aumento significativo de las mitocondrias de los animales tratados en todas las condiciones descritas, lo que concuerda con los hallazgos anteriores en relación a la generación de $O_2^{\cdot-}$, que generarán H_2O_2 por dismutación, y refuerza la proposición de un efecto estimulador de T_3 sobre la reducción univalente del oxígeno a nivel mitocondrial. Más aún, si bien se puede

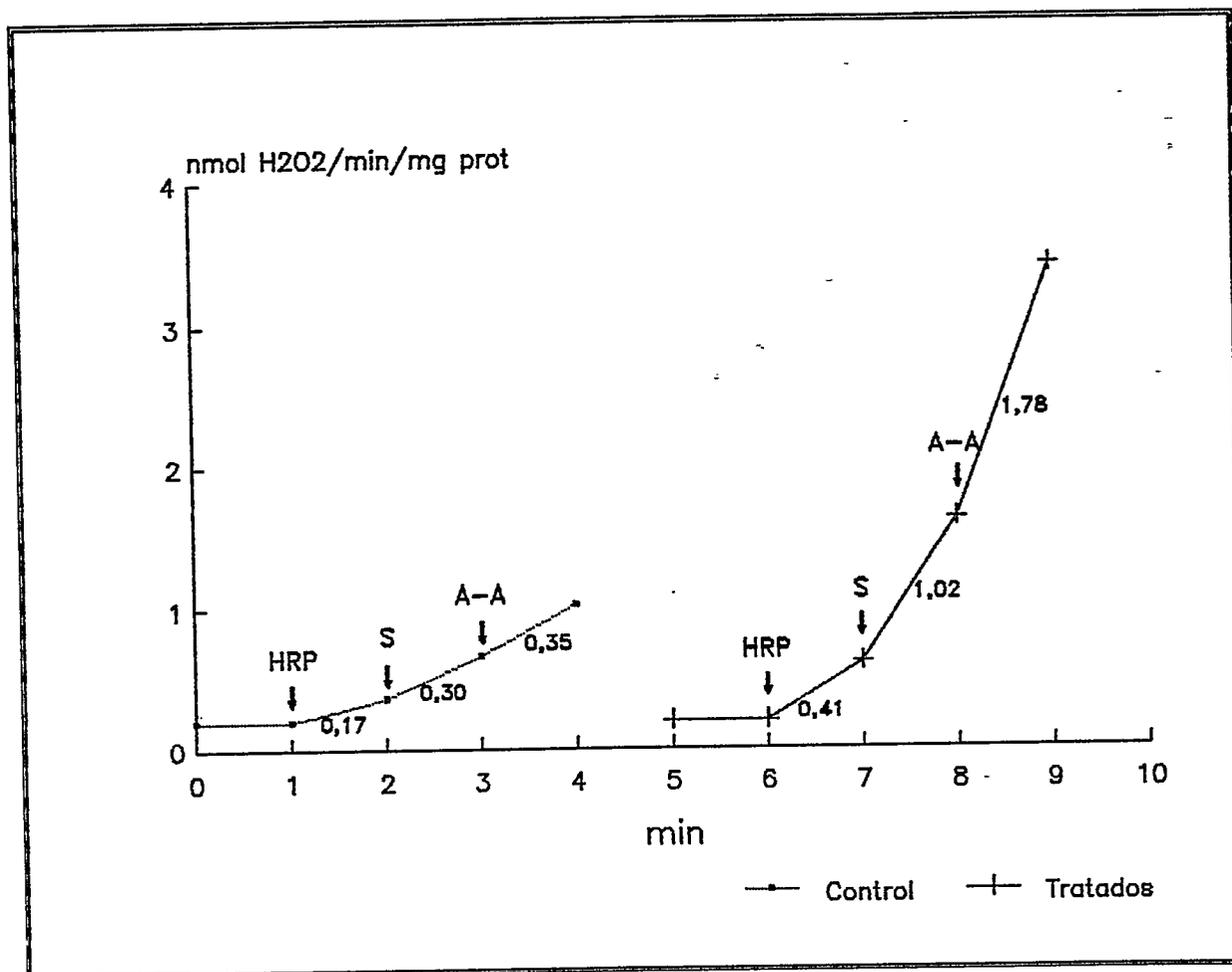


Figura 9. Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de succinato de sodio 4 mM y de antimicina-A 0,18 μ M.

El tratamiento de los animales, la preparación de las mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 , utilizando un amortiguador MST con 0,23 mg de proteína mitocondrial/ml, 136 U/ml de HRP (detección basal), succinato de Na y antimicina-A se describen en Materiales y Métodos. Las flechas señalan las adiciones sucesivas de HRP, succinato de Na (S) y antimicina-A (A-A). Los números adyacentes al trazo indican los nmoles de H_2O_2 producidos/min/mg de proteína mitocondrial.

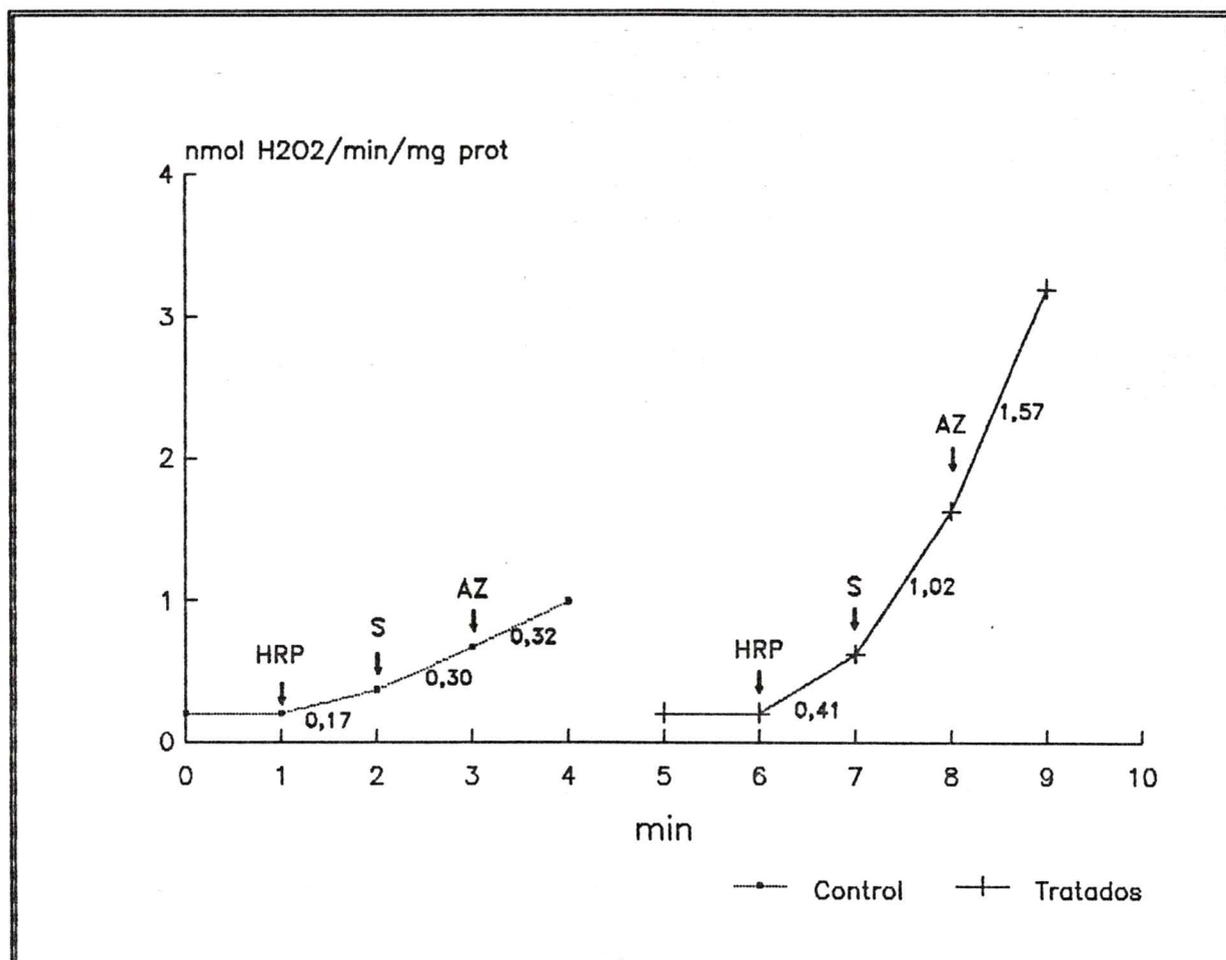


Figura 10. Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de succinato de sodio 4 mM y de azida de sodio 1,3 μM .

El tratamiento de los animales, la preparación de las mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 , utilizando un amortiguador MST con 0,23 mg de proteína mitocondrial/ml, 136 U/ml de HRP (detección basal), succinato de Na y azida de Na se describen en Materiales y Métodos. Las flechas señalan las adiciones sucesivas de HRP, succinato de Na (S) y azida de Na (AZ). Los números adyacentes al trazo indican los nmoles de H_2O_2 producidos/min/mg de proteína mitocondrial.

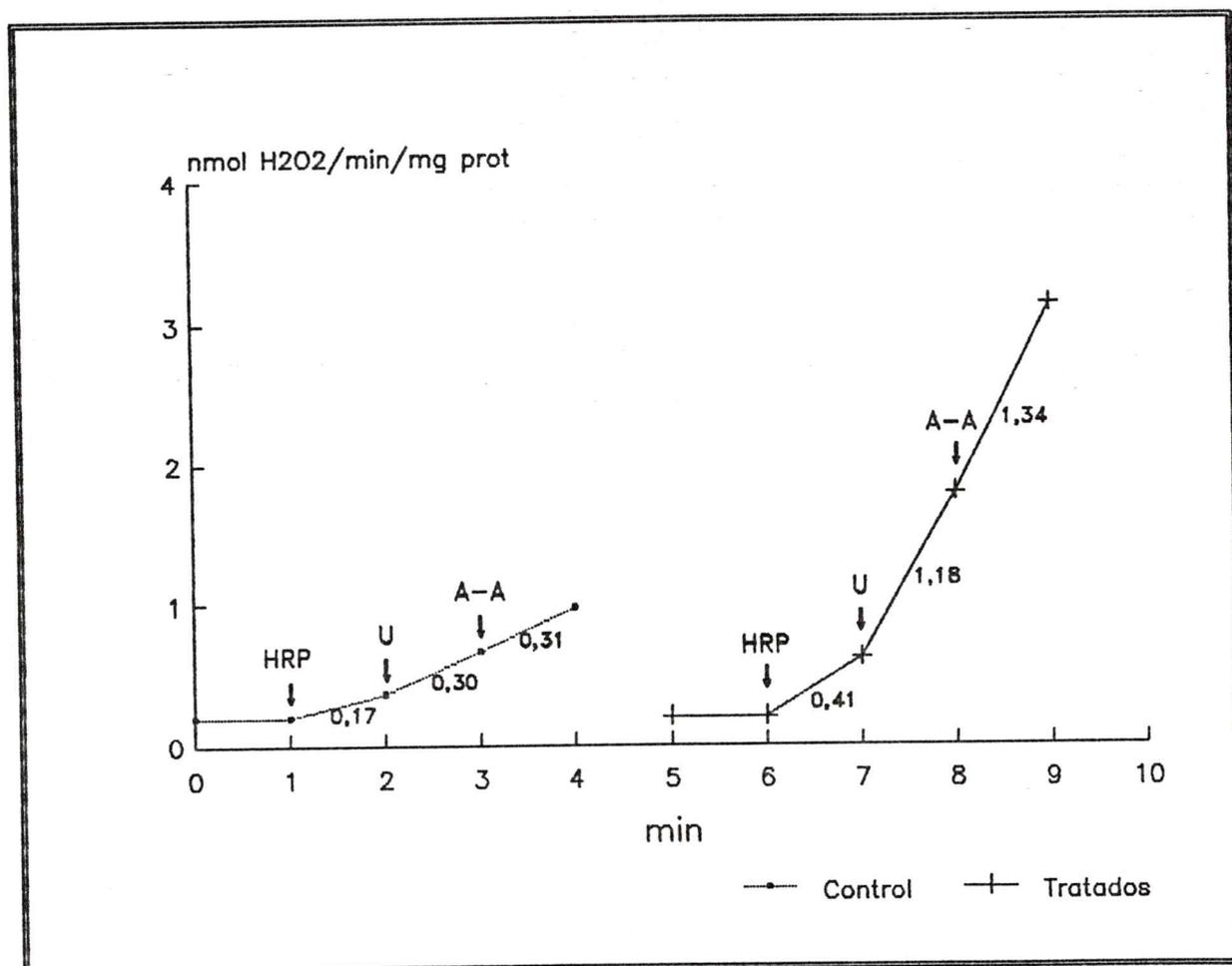


Figura 11. Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de urato de sodio $30 \mu M$ y de antimicina-A $0,18 \mu M$.

El tratamiento de los animales, la preparación de las mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 , utilizando un amortiguador MST con $0,23$ mg de proteína mitocondrial/ml, 136 U/ml de HRP (detección basal), urato de Na y antimicina-A se describen en Materiales y Métodos. Las flechas señalan las adiciones sucesivas de HRP, urato de Na (U) y antimicina-A (A-A). Los números adyacentes al trazo indican los nmoles de H_2O_2 producidos/min/mg de proteína mitocondrial.

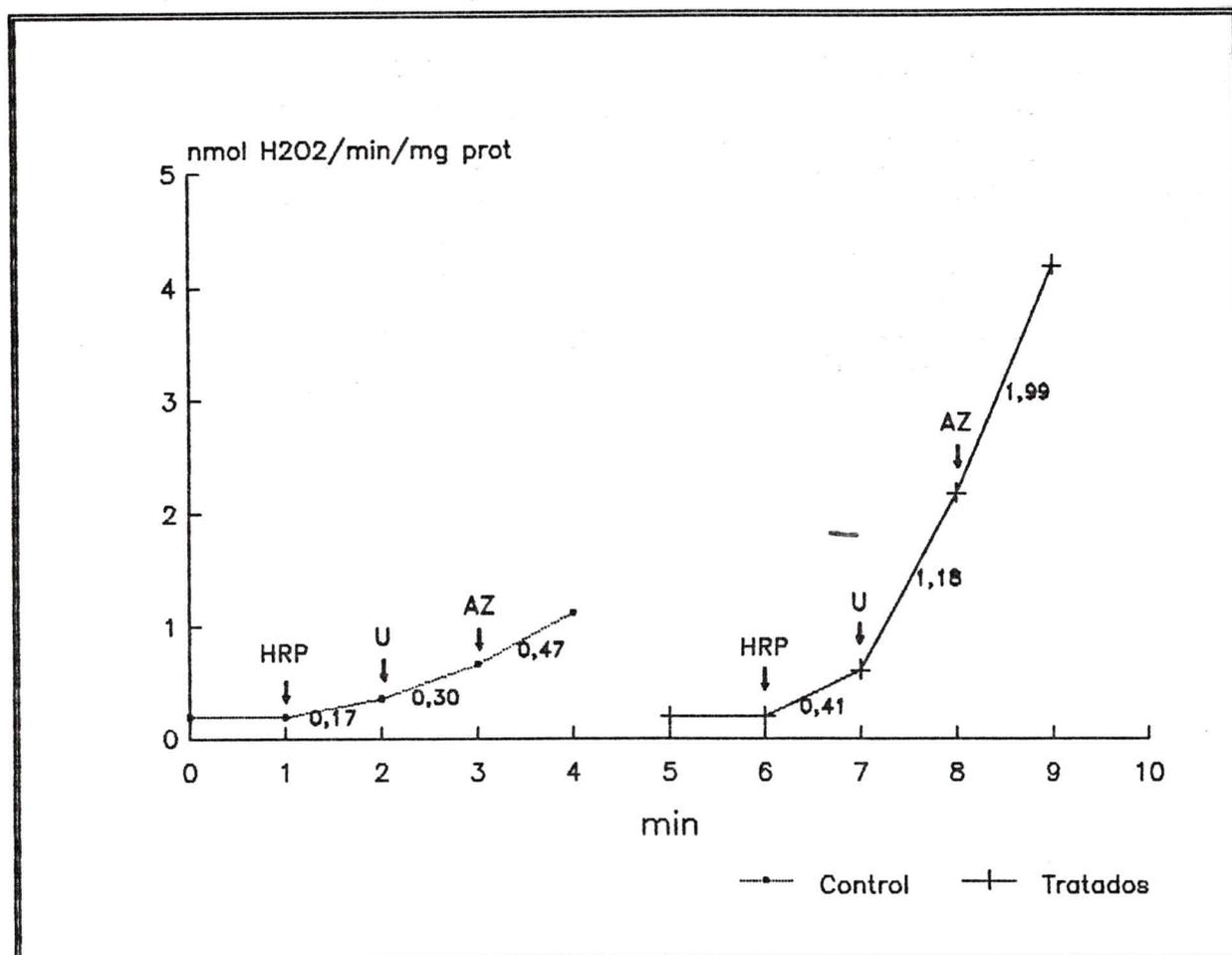


Figura 12. Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto de urato de sodio $30 \mu M$ y de azida de sodio $10,3 \mu M$.

El tratamiento de los animales, la preparación de las mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 , utilizando un amortiguador MST con $0,23$ mg de proteína mitocondrial/ml, 136 U/ml de HRP (detección basal), urato de Na y azida de Na se describen en Materiales y Métodos. Las flechas señalan las adiciones sucesivas de HRP, urato de Na (U) y azida de Na (AZ). Los números adyacentes al trazo indican los nmoles de H_2O_2 producidos/min/mg de proteína mitocondrial.

observar que la adición de succinato a la preparación mitocondrial incrementa significativamente la generación basal de H_2O_2 tanto en animales control como tratados, la adición de los inhibidores sólo la incrementa en forma significativa en los animales tratados (tabla 7), lo que señala una mayor capacidad oxidativa de las mitocondrias de estos animales (Tata y col., 1962; Sterling, 1979; Sterling, 1982), con una mayor capacidad de reducción univalente del oxígeno.

Las tablas 9 y 10 muestran la generación de H_2O_2 en presencia de urato de sodio e inhibidores mitocondriales, expresada por mg de proteína mitocondrial o por g de hígado respectivamente. Estas determinaciones se efectuaron para poder evaluar la contribución de los peroxisomas, que normalmente contaminan la fracción mitocondrial, a la generación de H_2O_2 . En todas las condiciones experimentales descritas, se observa aumentos significativos de este parámetro en los animales tratados, lo que puede ser explicado por el efecto proliferativo y estimulador de la actividad oxidativa que las hormonas tiroideas ejercen sobre los peroxisomas (Chance y col., 1979; Fringes y col., 1982; Just y col., 1982; Just y Hartl, 1983). En todos los animales la producción basal de H_2O_2 aumenta significativamente con la adición de urato al medio de reacción, sin embargo la adición de antimicina-A, inhibidor

TABLA 7

Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto/mg de proteína mitocondrial): efecto de succinato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción basal.

Adiciones al ensayo	Ratas control	Ratas tratadas	% efecto del tratamiento
HRP 136 U/ml	$0,17 \pm 0,02$ (n = 22)	$0,41 \pm 0,02$ (n = 59) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a)	+ 147
Succinato 4 mM	$0,30 \pm 0,05$ (n = 8) $p < 5 \times 10^{-3}$ (b)	$1,02 \pm 0,06$ (n = 35) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, b)	+ 241
Antim-A 0,18 μ M	$0,36 \pm 0,04$ (n = 21) $p < 5 \times 10^{-3}$ (c) N.S. (d)	$1,78 \pm 0,11$ (n = 15) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, c, d)	+ 403
Azida 10,3 μ M	$0,33 \pm 0,04$ (n = 16) $p < 5 \times 10^{-3}$ (e) N.S. (f)	$1,57 \pm 0,14$ (n = 15) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, e, f)	+ 383

El tratamiento de los animales (T₃ 3 días), la preparación de mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 utilizando un amortiguador MST a pH 7,3 con 0,23 mg de proteína mitocondrial/ml, con adiciones sucesivas de HRP (detección basal), succinato de Na y antimicina-A o azida de Na, como se indica en las figuras 9 y 10, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de mediciones indicadas entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. La comparación de los promedios, cuyo significado estadístico (p) se indica, fue la siguiente:

- (a): ratas tratadas versus ratas control
 - (b): basal versus succinato
 - (c): basal versus succinato + antimicina-A
 - (d): succinato versus antimicina-A
 - (e): basal versus succinato + azida
 - (f): succinato versus azida
- N.S. = no significativo

TABLA 8

Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto/g hígado): efecto de succinato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción basal.

Adiciones al ensayo	Ratas control	Ratas tratadas	% efecto del tratamiento
HRP 136 U/ml	$0,68 \pm 0,09$ (n = 22)	$3,46 \pm 0,18$ (n = 56) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a)	+ 409
Succinato 4 mM	$1,22 \pm 0,19$ (n = 8) $p < 5 \times 10^{-3}$ (b)	$8,64 \pm 0,61$ (n = 33) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, b)	+ 608
Antim-A $0,18 \mu M$	$3,08 \pm 0,37$ (n = 21) $p < 5 \times 10^{-3}$ (c, d)	$15,2 \pm 0,49$ (n = 12) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, c, d)	+ 394
Azida $10,3 \mu M$	$2,84 \pm 0,40$ (n = 16) $p < 5 \times 10^{-3}$ (e) $p < 10^{-2}$ (f)	$12,0 \pm 0,92$ (n = 14) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, e, f)	+ 321,5

El tratamiento de los animales (T, 3 días), la preparación de mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 , utilizando un amortiguador MST a pH 7,3 con 0,23 mg de proteína mitocondrial/ml, con adiciones sucesivas de HRP (detección basal), succinato de Na y antimicina-A o azida de Na, como se indica en las figuras 9 y 10, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de mediciones indicadas entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. La comparación de los promedios, cuyo significado estadístico (p) se indica, fue la siguiente:

- (a): ratas tratadas versus ratas control
 - (b): basal versus succinato
 - (c): basal versus succinato + antimicina-A
 - (d): succinato versus antimicina-A
 - (e): basal versus succinato + azida
 - (f): succinato versus azida
- N.S. = no significativo

TABLA 9

Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto/mg de proteína mitocondrial): efecto de urato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción total.

Adiciones al ensayo	Ratas control	Ratas tratadas	% efecto del tratamiento
HRP 136 U/ml	$0,17 \pm 0,02$ (n = 22)	$0,41 \pm 0,02$ (n = 59) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a)	+ 147
Urato 30 μ M	$0,30 \pm 0,04$ (n = 8) $p < 5 \times 10^{-3}$ (b)	$1,18 \pm 0,08$ (n = 34) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, b)	+ 299
Antim-A 0,18 μ M	$0,31 \pm 0,04$ (n = 18) $p < 5 \times 10^{-3}$ (c) N.S. (d)	$1,34 \pm 0,14$ (n = 10) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, c) N.S. (d)	+ 336
Azida 10,3 μ M	$0,47 \pm 0,08$ (n = 17) $p < 5 \times 10^{-3}$ (e) N.S. (f)	$1,99 \pm 0,29$ (n = 14) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, e, f)	+ 328

El tratamiento de los animales (T₃ 3 días), la preparación de mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 utilizando un amortiguador MST a pH 7,3 con 0,23 mg de proteína mitocondrial/ml, con adiciones sucesivas de HRP (detección basal), urato de Na y antimicina-A o azida de Na, como se indica en las figuras 11 y 12, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de mediciones indicadas entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. La comparación de los promedios, cuyo significado estadístico (p) se indica, fue la siguiente:

- (a): ratas tratadas versus ratas control
 - (b): basal versus urato
 - (c): basal versus urato + antimicina-A
 - (d): urato versus antimicina-A
 - (e): basal versus urato + azida
 - (f): urato versus azida
- N.S. = no significativo

TABLA 10

Efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 (nmoles/minuto g hígado): efecto de urato de sodio e inhibidores mitocondriales sobre la producción basal.

Adiciones al ensayo	Ratas control	Ratas tratadas	% efecto del tratamiento
HRP 136 U/ml	$0,68 \pm 0,09$ (n = 22)	$3,46 \pm 0,18$ (n = 56) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a)	+ 409
Urato 30 μ M	$1,20 \pm 0,17$ (n = 8) $p < 5 \times 10^{-3}$ (b)	$9,95 \pm 0,78$ (n = 33) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, b)	+ 729
Antim-A 0,18 μ M	$2,72 \pm 0,35$ (n = 18) $p < 5 \times 10^{-3}$ (c) $p < 10^{-2}$ (d)	$10,78 \pm 1,57$ (n = 10) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, c) N.S. (d)	+ 296
Azida 10,3 μ M	$2,82 \pm 0,36$ (n = 14) $p < 5 \times 10^{-3}$ (e, f)	$14,30 \pm 1,89$ (n = 13) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a, e) $p < 10^{-2}$ (f)	+ 407

El tratamiento de los animales (T_3 , 3 días), la preparación de mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 utilizando un amortiguador MST a pH 7,3 con 0,23 mg de proteína mitocondrial/ml, con adiciones sucesivas de HRP (detección basal), urato de Na y antimicina-A o azida de Na, como se indica en las figuras 11 y 12, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de mediciones indicadas entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. La comparación de los promedios, cuyo significado estadístico (p) se indica, fue la siguiente:

- (a): ratas tratadas versus ratas control
 - (b): basal versus urato
 - (c): basal versus urato + antimicina-A
 - (d): urato versus antimicina-A
 - (e): basal versus urato + azida
 - (f): urato versus azida
- N.S. = no significativo

mitocondrial específico, no la incrementa y la adición de azida, inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial y de la catalasa peroxisomal, sólo incrementa la de los animales tratados (tabla 9).

La tabla 11 muestra los efectos netos del succinato y del urato sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 , los que fueron calculados sustrayendo la generación basal de las mediciones efectuadas en presencia de los sustratos y de los inhibidores. Se aprecia así que el hipertiroidismo induce incrementos de más de 100% en el parámetro, al ser éste evaluado en presencia de succinato o de urato, lo que permite apreciar más adecuadamente el efecto prooxidativo que ejercen las hormonas tiroideas sobre mitocondrias y peroxisomas.

Se pudo lograr una estimación más precisa del efecto neto del tratamiento con T_3 sobre la generación de H_2O_2 por mitocondrias mediante dos enfoques. El primero fue el cálculo del efecto de los inhibidores mitocondriales sobre este parámetro (figura 13), ya que uno de ellos, la antimicina-A, es específico de la cadena respiratoria mitocondrial. El segundo fue la medición de la producción de H_2O_2 por partículas submitocondriales, ya que esta fracción está libre de peroxisomas (tabla 12).

La figura 13 muestra el efecto (%) que ejercen los inhibidores mitocondriales sobre el incremento en la

TABLA 11
 Efectos netos de succinato de sodio y de urato de sodio sobre la generación de H_2O_2 mitocondrial (nmoles/minuto/mg de proteína mitocondrial).

Adicio- nes al ensayo	Ratas control	Ratas tratadas	(Tratadas - Control)	% cambio
Succ 4 mM	0,132	0,605	0,473	+ 358,3
Antim-A 0,18 μ M	0,189	1,374	1,185	
Azida 10,3 μ M	0,159	1,159	1,000	
Urato 30 μ M	0,129	0,768	0,639	+ 495,3
Antim-A 0,18 μ M	0,141	0,928	0,787	
Azida 10,3 μ M	0,300	1,585	1,285	

El tratamiento de los animales (T_3 , 3 días), la preparación de las mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 se describen en Materiales y Métodos. Los efectos netos de succinato de Na y urato de Na (sustratos), corresponden a las diferencias entre los promedios de las velocidades de generación de H_2O_2 con el sustrato y la generación basal.

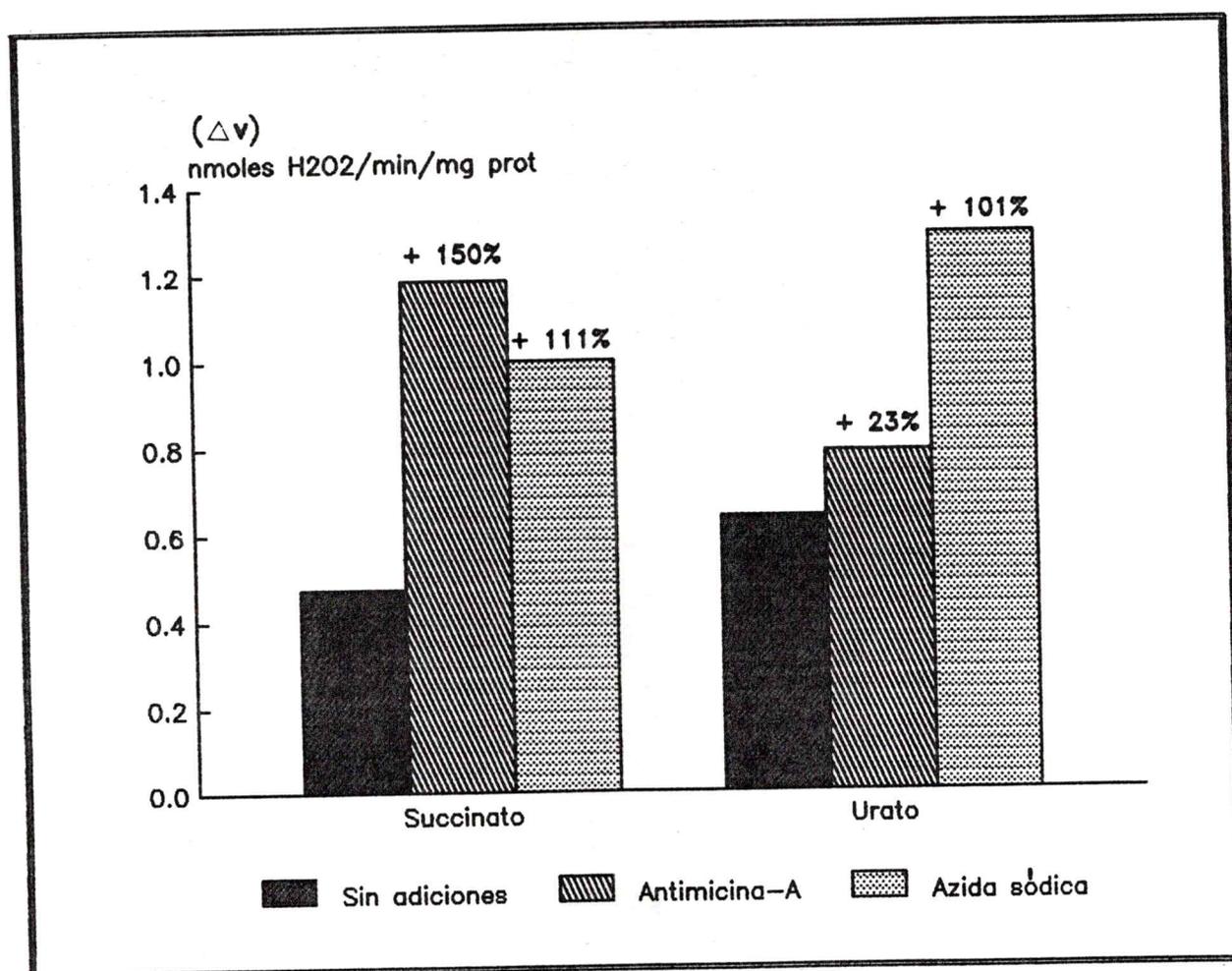


Figura 13. Generación de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días. Efecto neto de los inhibidores mitocondriales antimicina-A y azida de sodio.

El tratamiento de los animales, la preparación de las mitocondrias y la medición de la producción de H_2O_2 se describen en Materiales y Métodos. ΔV corresponde al incremento en la velocidad de producción de H_2O_2 por efecto del hipertiroidismo ([Tratadas -Control] en la tabla 11). El efecto neto de un inhibidor corresponde a la relación $[\Delta V$ con inhibidor - ΔV sin inhibidor]/ ΔV sin inhibidor.

generación de H_2O_2 inducido por el hipertiroidismo. El % del efecto de cada inhibidor se calculó con las diferencias entre los animales tratados y controles en la producción de H_2O_2 . Con este enfoque se aprecia que al adicionar un inhibidor mitocondrial específico, la antimicina-A, la producción de H_2O_2 con succinato como sustrato incrementa en 150% mientras que la producción con urato incrementa sólo en un 23%. Al adicionar un inhibidor mitocondrial que además inhibe a la catalasa peroxisomal, la azida de sodio, se aprecian incrementos semejantes en la producción de H_2O_2 con succinato y con urato.

La tabla 12 muestra los resultados de las mediciones de H_2O_2 utilizando partículas submitocondriales. En estas condiciones se observa que el tratamiento con T_3 estimula significativamente las producciones de H_2O_2 basal, con succinato sin inhibidor y con antimicina-A sin sustrato. El efecto mayor se obtiene en la producción con succinato. Por otro lado, la adición de succinato aumenta significativamente la producción basal de H_2O_2 en los animales control y en los tratados; en los animales control la adición de antimicina-A sola o en presencia de succinato estimula la producción de H_2O_2 significativamente, pero en los animales tratados este efecto sólo se manifiesta al adicionar el inhibidor en ausencia de succinato.

Respecto a la producción de H_2O_2 con urato, no hay un

TABLA 12
Efecto del hipertiroidismo sobre la producción de H_2O_2
(nmoles/minuto/mg de proteína) por partículas
submitocondriales.

Adiciones al ensayo	Ratas control	Ratas tratadas	% efecto del tratamiento
HRP 136 U/ml	0,578 ± 0,017 (n = 19)	0,901 ± 0,077 (n = 30) $p < 5 \times 10^{-3}$ (a)	+ 55,9
Succinato 4 mM	0,802 ± 0,053 (n = 8) $p < 5 \times 10^{-3}$ (b)	1,950 ± 0,403 (n = 11) $p < 2,5 \times 10^{-2}$ (a) $p < 5 \times 10^{-3}$ (b)	+ 143
Antim-A 0,18 µM	1,104 ± 0,144 (n = 6) $p < 5 \times 10^{-3}$ (c) $p < 10^{-1}$ (d)	1,900 ± 0,69 (n = 5) $p < 5 \times 10^{-3}$ (c) N.S. (a, d)	+ 72
HRP 136 U/ml + Antim-A 0,18 µM	0,952 ± 0,094 (n = 5) $p < 5 \times 10^{-3}$ (e)	1,520 ± 0,23 (n = 8) $p < 5 \times 10^{-2}$ (a) $p < 5 \times 10^{-2}$ (e)	+ 59,7
HRP 136 U/ml + Urato 30 µM	0,642 ± 0,074 (n = 6) N.S. (f)	0,831 ± 0,118 (n = 7) N.S. (a, f)	+ 29

El tratamiento de los animales (T_3 , 3 días) y la preparación de las partículas submitocondriales se describen en Materiales y Métodos. La producción de H_2O_2 se midió en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, utilizando un amortiguador MST a pH 7,3 con 0,15 mg de proteína mitocondrial/ml, con adiciones sucesivas de HRP (detección basal), succinato de Na y antimicina-A; HRP y antimicina-A; HRP y urato, como se indica. Los resultados representan el promedio ± S.E.M. para el número de mediciones indicadas entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. La comparación de los promedios, cuyo significado estadístico (p) se indica, fue la siguiente:

- (a): ratas tratadas versus ratas control
 - (b): basal versus succinato
 - (c): basal versus succinato + antimicina-A
 - (d): succinato versus antimicina-A
 - (e): basal versus antimicina-A
 - (f): basal versus urato
- N.S. = no significativo

incremento significativo, ya sea en relación a la producción basal o por efecto del hipertiroidismo; más aún al calcular el efecto neto del urato (urato-basal) la producción de H_2O_2 de los animales tratados resulta menor que la de los animales control (tabla 12).

Estos resultados permiten visualizar en forma más precisa el efecto estimulador del hipertiroidismo sobre la reducción univalente del oxígeno a nivel mitocondrial y, en conjunto con las mediciones anteriores, producción de H_2O_2 por mitocondrias intactas y generación de $O_2^{\cdot -}$ por partículas submitocondriales, sustentan la proposición de una contribución de la utilización mitocondrial del oxígeno, vía reducción univalente, a la respuesta respiratoria hepática en el hipertiroidismo.

En estos estudios se observó un aumento significativo en el contenido de proteínas mitocondriales en las ratas hipertiroideas [control: $10,11 \pm 0,60$ (n = 16) mg/g de hígado; T_3 : $12,45 \pm 0,93$ (n = 13); $p < 5 \times 10^{-2}$].

C. EVALUACION DE SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE HEPATICOS.

Estos estudios comprendieron evaluaciones de la actividad de sistemas enzimáticos y no enzimáticos, como también de sistemas enzimáticos auxiliares.

1. Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante.

Las enzimas estudiadas fueron la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

1.1. Actividad de SOD. Estos estudios incluyeron mediciones de la actividad de la SOD citosólica y de la SOD mitocondrial.

1.1.1. Evaluación de la SOD citosólica. Se realizó un estudio cinético de los cambios en la actividad de esta enzima, utilizando citosol hepático de ratas tratadas con T_3 durante 1, 3, 5 y 7 días. El contenido de proteínas de esta fracción subcelular [control: $87,35 \pm 1,75$ (n = 48) mg/g de hígado; T_3 1 día: $77,1 \pm 5,1$ (n = 10); T_3 3 días: $90,3 \pm 2,7$ (n = 26); T_3 5 días: $83,6 \pm 9,15$ (n = 6); T_3 7 días: $75,65 \pm 5,8$ (n = 7), N.S.] no fue alterado por la condición hipertiroidea. Los resultados del estudio cinético de la SOD se muestran en la figura 14. Se aprecia un incremento inicial y significativo (1 día de tratamiento) en la actividad de esta enzima, seguido de una importante y significativa disminución a los 3 y 5 días de tratamiento, que alcanza valores correspondientes al 50% del valor basal a los 5 días de tratamiento. La disminución que se observa a los 3 días de tratamiento coincide con los incrementos en los parámetros celulares asociados a la actividad prooxidativa hepática ya señalados (sección B).

1.1.2. Evaluación de la SOD mitocondrial. Los resultados de este estudio, realizado en mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 3 días, se muestran en la tabla 13. Se observa que la actividad de la SOD mitocondrial,

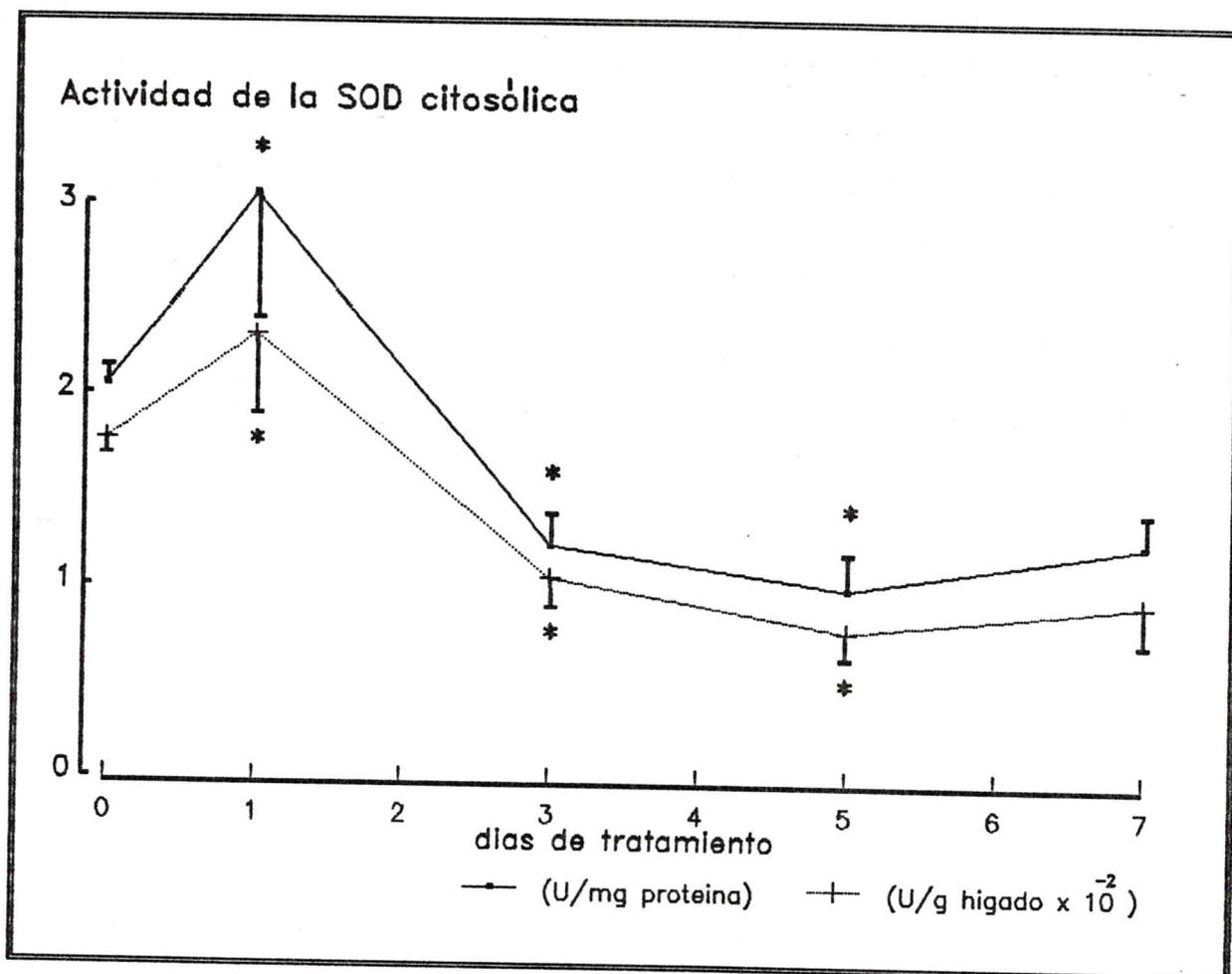


Figura 14. Estudio cinético de los cambios en la actividad de la SOD citosólica hepática en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales y la preparación de la fracción citosólica hepática se describen en Materiales y Métodos. La actividad de la SOD citosólica (CuZnSOD) se midió adicionando alícuotas de citosol a un amortiguador de glicina 50 mM a pH 10,5 con epinefrina 1 mM y registrando los incrementos en la A_{480}/min como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 6 a 12 animales por grupo experimental. La expresión de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

TABLA 13
Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad de la SOD
mitocondrial hepática.

Actividad de SOD	Ratas control	Ratas tratadas
U/mg de prot	2,55 ± 0,37 (n = 9)	3,20 ± 0,65 (n = 7)
% de efecto		+ 25,5
p		N.S.
U/g de hígado	25,86 ± 3,46 (n = 9)	48,57 ± 11,26 (n = 7)
% de efecto		+ 87,8
p		<5x10 ⁻²

El tratamiento de los animales (T, 3 días) y la preparación de las mitocondrias se describen en Materiales y Métodos. La actividad de la SOD mitocondrial (MnSOD), se midió en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, adicionando alícuotas de mitocondrias suspendidas en amortiguador MSH, a un amortiguador a pH 7,5 de fosfato de potasio 0,05 M y EDTA 0,1 M con hematoxilina 0,15 mM, registrando cambios en la A₅₅₀/minuto. Los resultados representan el promedio ± S.E.M. para el número de animales indicados entre paréntesis. La expresión de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

expresada en U/mg de proteína, no se modifica en forma significativa por efecto del tratamiento; sin embargo, al expresar esta actividad en U/g de hígado, se observa un incremento significativo de ella, lo que puede ser consecuencia del aumento en el contenido de proteínas mitocondriales, indicado en la sección B.2.2.3, que se manifiesta en las ratas hipertiroideas.

1.2. Actividad de catalasa. Se realizó un estudio cinético de los cambios en la actividad de esta enzima, utilizando sobrenadantes post-nucleares de homogeneizados de hígado de ratas tratadas con T_3 durante 1, 2 y 3 días. Los resultados de estas mediciones se muestran en la figura 15. Se observa un aumento inicial no significativo, en los animales con 1 dosis de T_3 , el que es seguido de disminuciones progresivas en esta actividad enzimática, alcanzándose un efecto significativo a los 3 días de tratamiento. Estos resultados se obtuvieron en ausencia de alteraciones significativas en el contenido de proteínas de la fracción subcelular utilizada en este estudio, por el tratamiento hormonal [control: $149,65 \pm 5,3$ mg/g ($n = 27$) de hígado; T_3 1 día: $151 \pm 14,65$ ($n = 9$); T_3 2 días: $150,25 \pm 11,15$ ($n = 8$); T_3 3 días: $162,8 \pm 9$ ($n = 10$), N.S.].

1.3. Actividad de glutatión peroxidasa. Estos estudios comprendieron mediciones de la actividad total y de la actividad soluble, de la glutatión peroxidasa hepática.

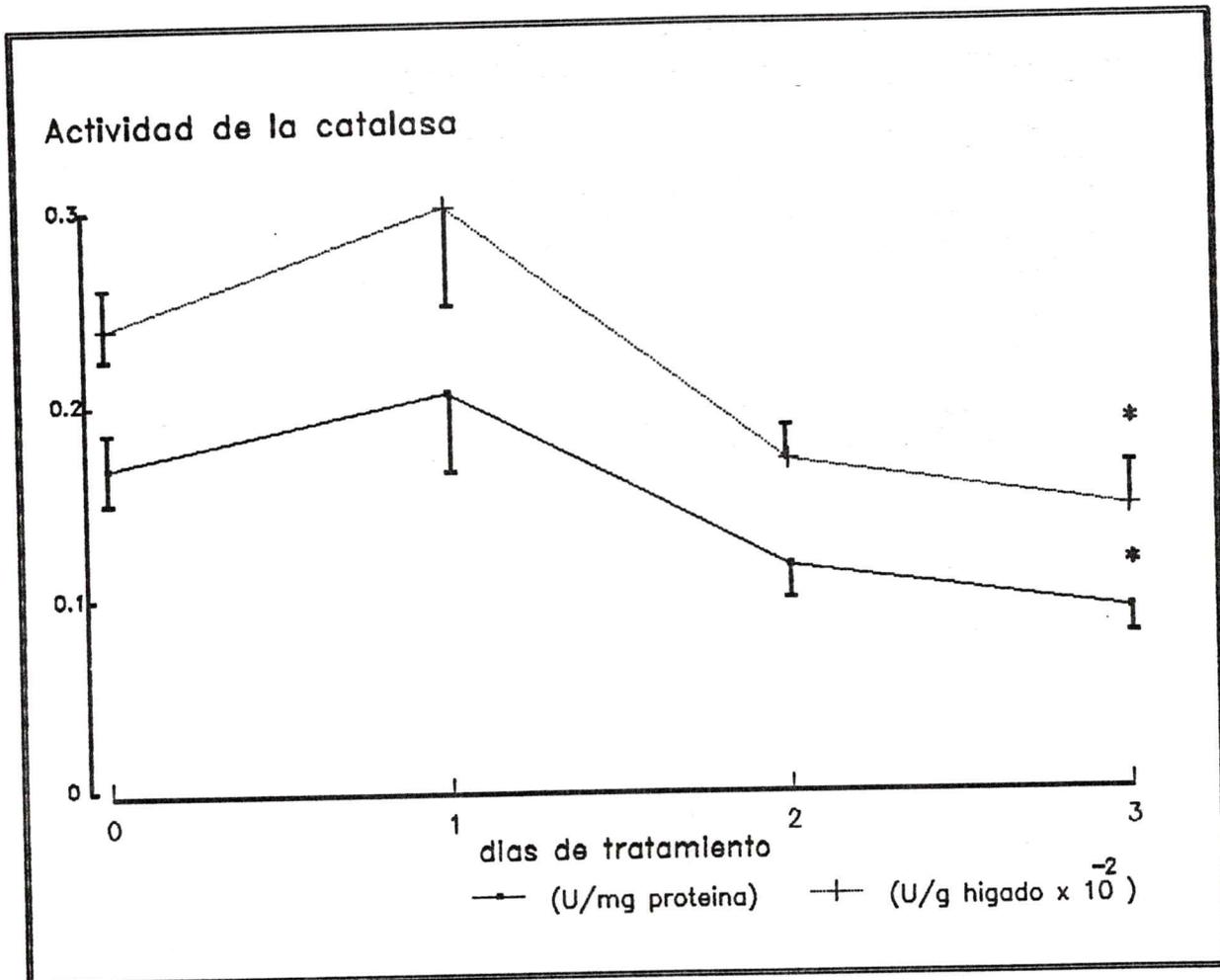


Figura 15. Estudio cinético de los cambios en la actividad de la catalasa hepática en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales, la preparación de sobrenadantes post-nucleares de homogeneizados hepáticos y la medición espectrofotométrica de la actividad de la catalasa (A_{405} del sulfato de peroxiTi), luego de incubar el sobrenadante con H_2O_2 0,44 mM en amortiguador imidazol 20 mM con 1 mg/ml de albúmina de bovino a pH 7,0, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 4 a 16 animales por grupo experimental. La expresión de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

1.3.1. Evaluación de la actividad de glutatión peroxidasa total. Se realizó un estudio cinético de los cambios en esta actividad enzimática, utilizando sobrenadantes post-nucleares de homogeneizados de hígado de ratas tratadas con T_3 durante 1, 2 y 3 días. Los resultados de estas mediciones, que se muestran en la figura 16, indican que el tratamiento con la hormona no modifica la actividad hepática total de la enzima en estudio, resultados obtenidos en ausencia de modificaciones en el contenido de proteínas de esta fracción (sección C.1.2).

1.3.2. Evaluación de la actividad de glutatión peroxidasa soluble. Este estudio, cuyos resultados se muestran en la tabla 14, se realizó en preparaciones de citosol hepático de ratas tratadas con T_3 durante 3 días, condición que no produjo modificaciones en el contenido de proteínas, como se indicó en la sección C.1.1.1. Al igual que en el estudio anterior, no se observa alteración en esta actividad enzimática, por efecto del tratamiento hormonal.

2. Niveles de glutatión hepático.

Se realizó un estudio cinético de los cambios en el contenido de GSH, de GSSG y de Glutatión total, este último expresado como equivalentes totales de GSH (GSH + 2GSSG), utilizando muestras hepáticas de ratas tratadas con T_3 durante 1, 3, 5 y 7 días. Los resultados de estas mediciones se muestran en la figura 17. En relación al contenido

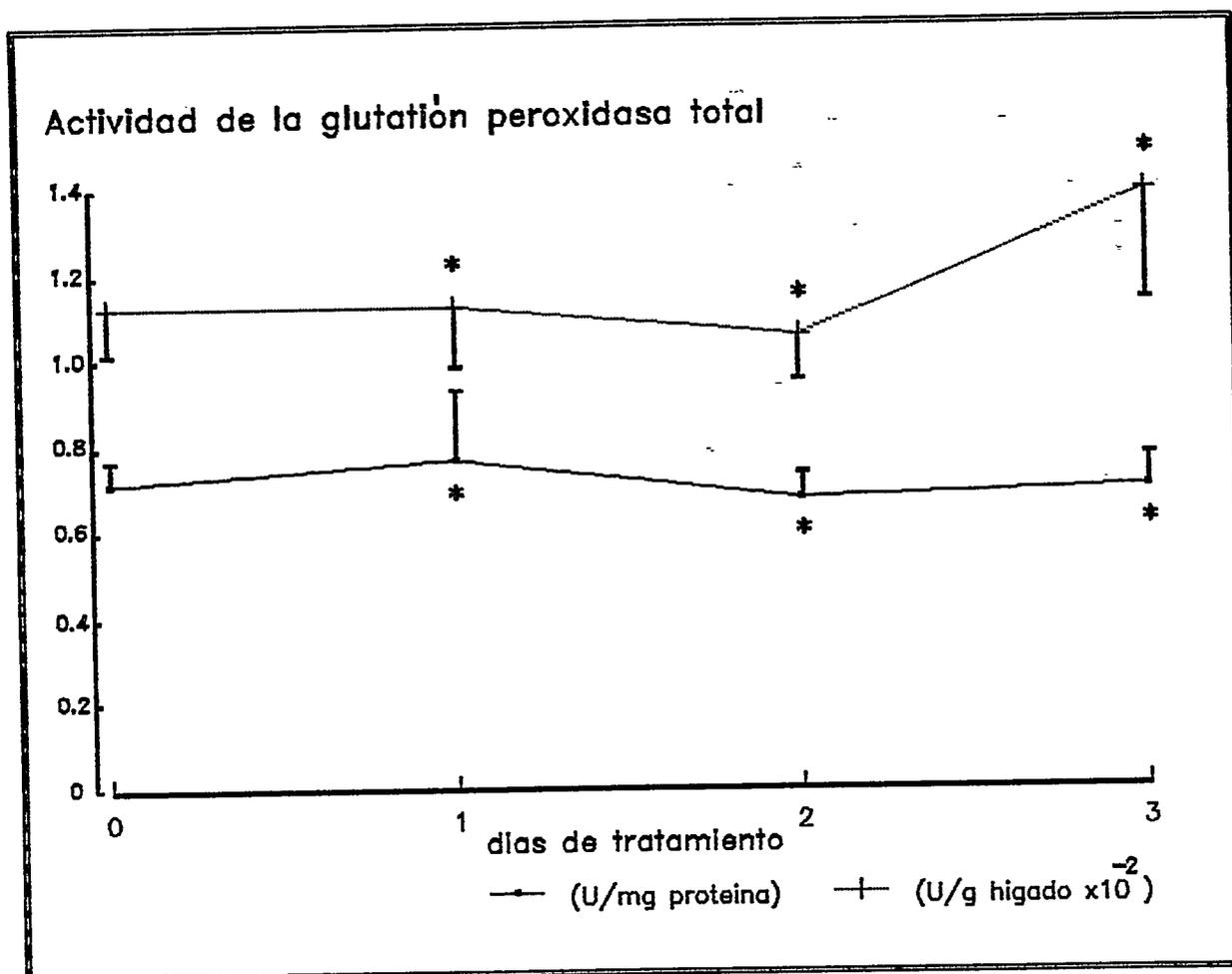


Figura 16. Estudio cinético de los cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa hepática total en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales, la preparación de sobrenadantes post-nucleares hepáticos y la medición de la actividad de la glutatión peroxidasa (disminución de la A_{340}/min) utilizando un amortiguador a pH 7,0 de fosfato de Na 43 mM, con el sobrenadante, NADPH 0,28 mM, azida de Na 3,75 mM, GSH 5 mM, 0,33 U/ml de glutatión reductasa y H_2O_2 0,22 μM , se describen en Materiales y Métodos. Los resultados, cuya expresión y tratamiento estadístico se describe en Materiales y Métodos, representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 5 a 19 animales por grupo experimental. (*): N.S., no significativo respecto a control.

TABLA 14
Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad de la
glutación peroxidasa hepática soluble.

Tratamiento de los animales	U/mg de proteína citosólica	U/g de hígado
Na OH 0,1 N	0,141 ± 0,027 (n = 7)	12,26 ± 1,96 (n = 7)
T ₃ 3 días	0,151 ± 0,024 (n = 7)	12,25 ± 1,86 (n = 7)
% de efecto	+ 7,1	0,0
p	N.S.	N.S.

El tratamiento de los animales y la preparación de la fracción hepática soluble se describen en Materiales y Métodos. La actividad de la glutatión peroxidasa se midió en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, resistiendo los cambios en la A_{340}/min que se producían luego de la adición de H_2O_2 (concentración final = 0,22 μM) a un medio de reacción que contenía una alícuota de citosol diluido, NADPH 0,28 mM, azida de Na 3,75 mM, GSH 5 mM y 0,33 U/ml de glutatión reductasa, en un amortiguador a pH 7,0 de fosfato de Na 43 mM. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. La expresión de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

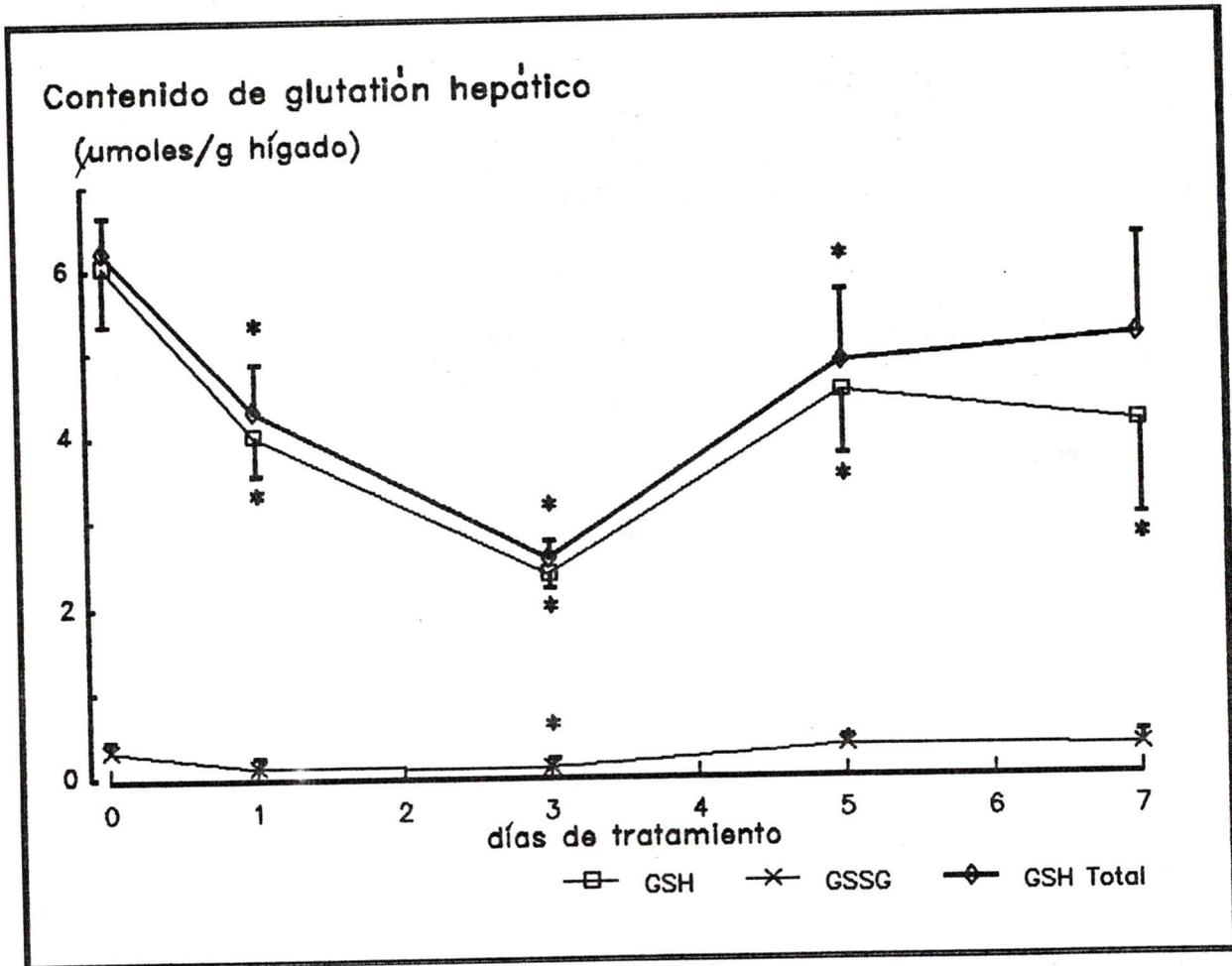


Figura 17. Estudio cinético de los cambios en el contenido de glutatión hepático en el hipertiroidismo experimental.

Figura 17. Estudio cinético de los cambios en el contenido de glutatión hepático en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales y la preparación de homogeneizados hepáticos en HClO_4 0,5 N se describen en Materiales y Métodos. El contenido de GSH se midió espectrofotométricamente a 240 nm, luego de la formación del S-lactoil-GSH mediante la reacción cuantitativa de GSH con metilglioxal, en presencia de glioxalasa I, según se describe en Materiales y Métodos. El contenido de GSSG se midió espectrofotométricamente a 340 nm, luego de su reducción cuantitativa a GSH mediante NADPH, en presencia de glutatión reductasa, según se describe en Materiales y Métodos. El contenido de GSH más 2 veces el de GSSG representa los equivalentes totales de GSH (GSH total). Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 5 a 28 animales por grupo experimental. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

hepático de GSH, se observa una depleción inicial de éste, con valores que a las 24 horas de tratamiento están reducidos en 34 % respecto al contenido de GSH hepático de los animales control; a tiempos mayores de tratamiento, la depleción alcanza un efecto máximo a los 3 días (61 %) y efectos menores a los 5 y 7 días.

Con respecto al contenido de GSSG hepático, éste experimenta una disminución de 60 % a las 24 horas, alcanzando un efecto máximo a los 3 días de tratamiento de 69 % de reducción respecto del contenido de los animales control, con tendencia a la recuperación de niveles normales a los 5 y 7 días de tratamiento. Debido a la caída drástica que experimenta el contenido de GSSG a los 1 y 3 días de tratamiento, la disminución en los niveles de GSH en este período no sería atribuible a su oxidación a GSSG, reflejando estos cambios una disminución significativa de los equivalentes totales de GSH intrahepáticos, como se observa en la figura 17 (GSH total).

3. Sistemas enzimáticos auxiliares de defensa antioxidante.

Estos sistemas fueron evaluados en muestras de citosol hepático de ratas tratadas con T₂ durante 3 días, condición que no produjo modificaciones en el contenido de proteínas de esta fracción, como se señaló en la sección C.1.1.1.

3.1. Síntesis de glutatión.

Dentro de las reacciones enzimáticas que constituyen el proceso de biosíntesis de

GSH, la primera de ellas es la etapa limitante del proceso y la enzima que la cataliza, la gama-glutamilcisteína sintetasa, es controlada tanto por la disponibilidad de cisteína, como también por retroalimentación mediante una inhibición competitiva ejercida por el GSH (Richman, y Meister, 1975; Beatty y Reed, 1980; Kaplowitz y col., 1985). Considerando estos antecedentes y la disminución en el nivel intrahepático de GSH inducida por el tratamiento con T_3 , fue importante medir la actividad de la síntesis *in vitro* de este tripéptido en los animales con 3 días de tratamiento hormonal, ya que en ellos se detecta la mayor depleción de esta biomolécula, por lo cual se esperaría un significativo incremento del proceso.

Los resultados de la evaluación de la síntesis de GSH se muestran en la tabla 15; ellos indican un incremento significativo de este proceso *in vitro*, como consecuencia del tratamiento con la hormona.

3.2. Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La actividad de esta enzima hepática es necesaria para la producción de NADPH, agente reductor utilizado por la glutatión reductasa para la reducción del GSSG a GSH. Constituye así un mecanismo auxiliar de defensa antioxidante.

Los resultados de la medición de la actividad de esta enzima se muestran en la tabla 15, observándose que en los

TABLA 15
Efecto del hipertiroidismo sobre la actividad de sistemas
auxiliares de defensa antioxidante.

Sistema	Ratas control	Ratas tratadas
Síntesis de GSH		
nmoles/min/mg proteína	0,685 ± 0,134 (n = 11)	1,101 ± 0,562 (n = 11)
% de efecto		+ 60,7
p		<5x10 ⁻²
µmoles/min/g hígado	0,063 ± 0,011 (n = 11)	0,096 ± 0,014 (n = 11)
% de efecto		+ 52,4
p		<5x10 ⁻²
Glucosa-6- fosfato- deshidrogenasa		
U/mg prot(x10 ³)	6,55 ± 0,64 (n = 6)	12,07 ± 0,88 (n = 6)
% de efecto		+ 84,3
p		<10 ⁻³
U/g hígado	0,57 ± 0,056 (n = 6)	1,090 ± 0,08 (n = 6)
% de efecto		+ 90,5
p		<5x10 ⁻³
Glutación reductasa		
U/mg proteína	0,042 ± 0,004 (n = 7)	0,039 ± 0,004 (n = 7)
% de efecto		- 7,14
p		N.S.
U/g hígado	3,66 ± 0,313 (n = 7)	3,20 ± 0,29 (n = 7)
% de efecto		- 12,6
p		N.S.

TABLA 15 Continuación:

El tratamiento de los animales y la preparación de las fracciones citosólicas hepáticas se describen en Materiales y Métodos. Las actividades de los sistemas indicados se midieron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La evaluación de la síntesis del GSH contempló la cuantificación de los equivalentes totales del GSH sintetizado, luego de incubar una alícuota del citosol diluido con L-cisteína 5 mM, glicina 5 mM, L-glutamato 5 mM, ATP 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM y EDTA 0,2 mM, en un amortiguador a pH 8,0 de Tris 100 mM; se registró el incremento de la A_{412}/min como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se estimó a través del aumento de la A_{340}/min que se registró luego de adicionar glucosa-6-fosfato (concentración final = 2,1 mM) a un medio de reacción constituido por una alícuota de citosol diluido, $MgCl_2$ 20,8 mM y NADP 1 mM en un amortiguador a pH 7,6 de glicilglicina 52,1 mM. La actividad de la glutatión reductasa se estimó a través de la disminución de la A_{340}/min que se registró luego de adicionar NADPH (concentración final = 0,2 mM) a un medio de reacción constituido por una alícuota de citosol diluido y GSSG 5 mM en un amortiguador a pH 8,0 de Tris 97,5 mM con EDTA 1 mM. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. La expresión de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

animales hipertiroideos hay un importante y significativo incremento, y por lo tanto una mayor producción de moléculas de NADPH.

3.3. Actividad de la glutatión reductasa. Esta enzima, en conjunto con la glutatión peroxidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y el GSH intracelular, constituyen un sistema clave de defensa frente al estrés oxidativo para la célula (Akerboom y Sies, 1990).

Los resultados de la medición de la actividad de esta enzima se muestran en la tabla 15. Se puede apreciar que el tratamiento hormonal no produjo alteración en la actividad de la glutatión reductasa hepática.

Con estos últimos resultados, se puede apreciar que la depleción hepática del GSH en el hipertiroidismo no modifica la actividad del sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa, el cual como ya se indicó, interviene tanto en la reducción de peróxidos orgánicos como en la recuperación del GSH.

D. ESTUDIO DE PARAMETROS CELULARES ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL GLUTATION.

Los estudios del efecto del hipertiroidismo sobre el metabolismo del GSH comprendieron la evaluación de procesos de utilización del tripéptido y la de procesos de síntesis del mismo. Para ello se midieron actividades de enzimas que utilizan GSH y el eflujo del tripéptido desde el hepatocito,

complementando estos estudios con la medición del recambio *in vivo* de esta biomolécula, ya que cambios en las actividades de los procesos de utilización podrían determinar cambios en este parámetro hepático.

1. Enzimas que utilizan GSH. Los procesos celulares enzimáticos que utilizan GSH son tres; ellos corresponden a las reacciones de alquilación, con formación de conjugados, que catalizan las glutatión transferasas, a la ruptura enzimática o degradación del GSH, que cataliza la gama-glutamil transferasa y a la oxidación de GSH a GSSG, cuyo estudio ya se ha referido.

El efecto del hipertiroidismo sobre la actividad de estas enzimas hepáticas se evaluó mediante un estudio cinético de los cambios inducidos por la administración de la hormona durante distintos periodos de tiempo.

1.1 Evaluación de glutatión transferasas. Este estudio comprendió la medición de las actividades arilo y epoxi de estas enzimas, en la fracción citosólica hepática de ratas tratadas con T_3 durante 1, 3, 5 y 7 días. La figura 18 muestra las actividades específicas arilo y epoxi de las glutatión transferasas, expresadas en U/mg de proteína. En ambas actividades se observa que, luego de un incremento inicial, significativo sólo en la actividad epoxi, se produce una importante y significativa disminución a los 3 días de tratamiento hormonal. La magnitud de esta

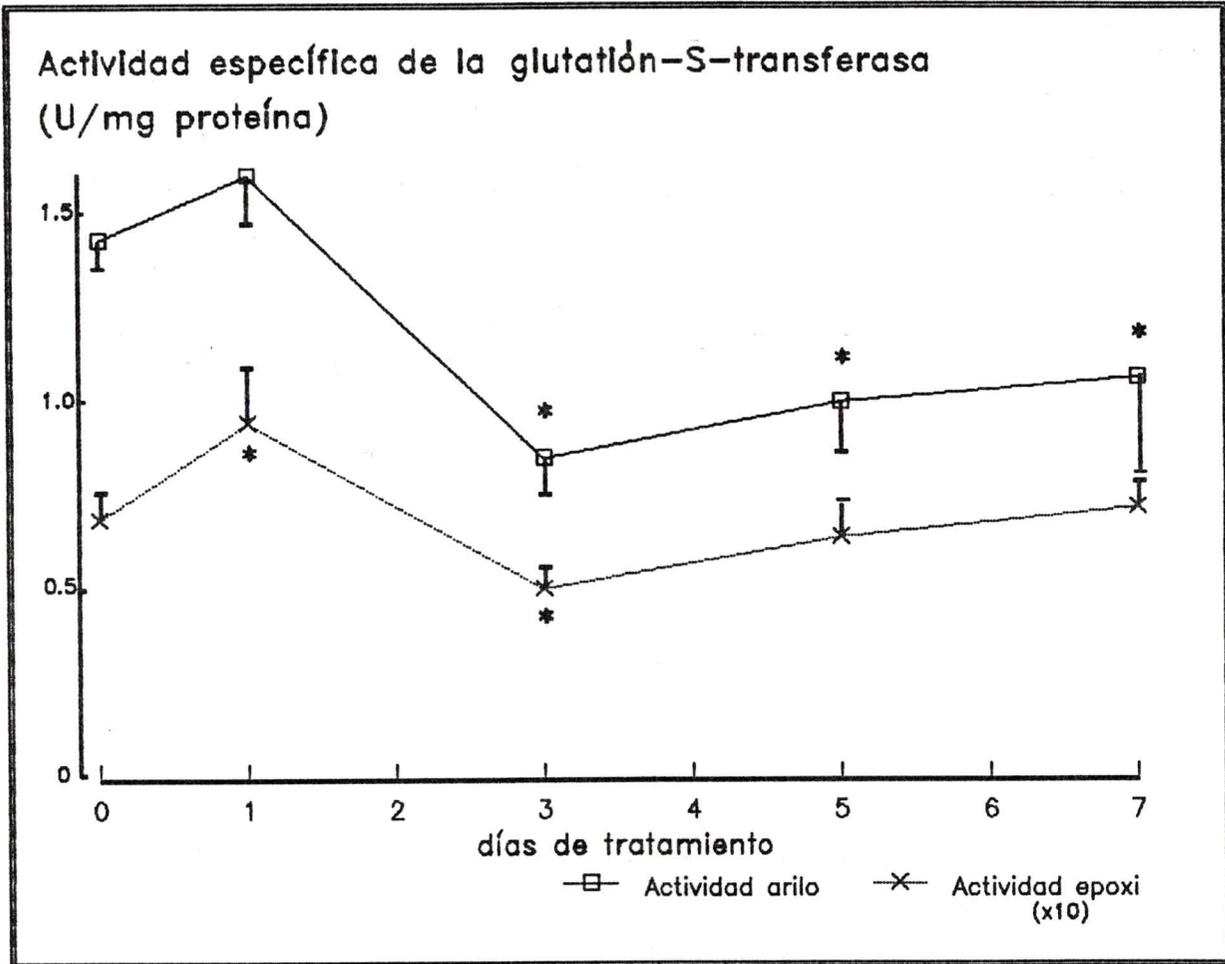


Figura 18. Estudio cinético de los cambios en las actividades específicas de las glutatión-S-transferasas, arilo y epoxi, en el hipertiroidismo experimental.

Figura 18. Estudio cinético de los cambios en las actividades específicas de las glutatión-S-transferasas, arilo y epoxi, en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales y la preparación de los sobrenadantes de 33.000g por 60 minutos de homogeneizados hepáticos, se describen en Materiales y Métodos. La medición de ambas actividades contempló el registro de los aumentos en la A_{340}/min (actividad arilo) o en la A_{360}/min (actividad epoxi), utilizando un medio de reacción que contenía amortiguador fosfato de Na 60 mM, a pH 7,4 para la actividad arilo y a pH 6,5 para la actividad epoxi, GSH 10 mM, el sustrato arilo (1-Cl-2,4-dinitrobenceno 1 mM) o el epoxi (1,2-epoxi-3(p-nitrofenoxi)propano 1 mM) y una alícuota del sobrenadante, según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 4 a 29 animales por grupo experimental. La expresión de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

disminución es mayor en la actividad arilo (41%) que en la epoxi (27%), situación que también se observa a los 5 días de tratamiento (30% en la actividad arilo y 7,4 % en la actividad epoxi), en tanto que a los 7 días de tratamiento la actividad arilo es aún significativamente menor que la del grupo control (26%) y la actividad epoxi ha alcanzado valores superiores en un 4% a los basales. En la figura 19 se muestra la expresión de ambas actividades en U/g de hígado, siendo posible apreciar resultados similares a los recién mencionados, ya que, como se indicó en la sección C.1.1.1., el contenido de proteínas citosólicas no es modificado por el tratamiento hormonal. La disminución de las actividades arilo y epoxi de las glutatión transferasas, detectada a los 3 días de tratamiento con la hormona, señala que la depleción del GSH en estos animales no se relaciona con cambios adaptativos en reacciones que involucren una mayor utilización de la biomolécula para su conjugación con intermediarios electrofílicos.

1.2. Evaluación de la gama-glutamyl transferasa. En este estudio no sólo se evaluó la actividad hepática de esta enzima, sino que también la actividad renal, debido a que la gama-glutamyl transferasa en este tejido es mucho más activa que en el hígado. En ambos casos se realizó un estudio cinético de los cambios en la actividad enzimática, utilizando homogeneizados de ambos tejidos de ratas tratadas

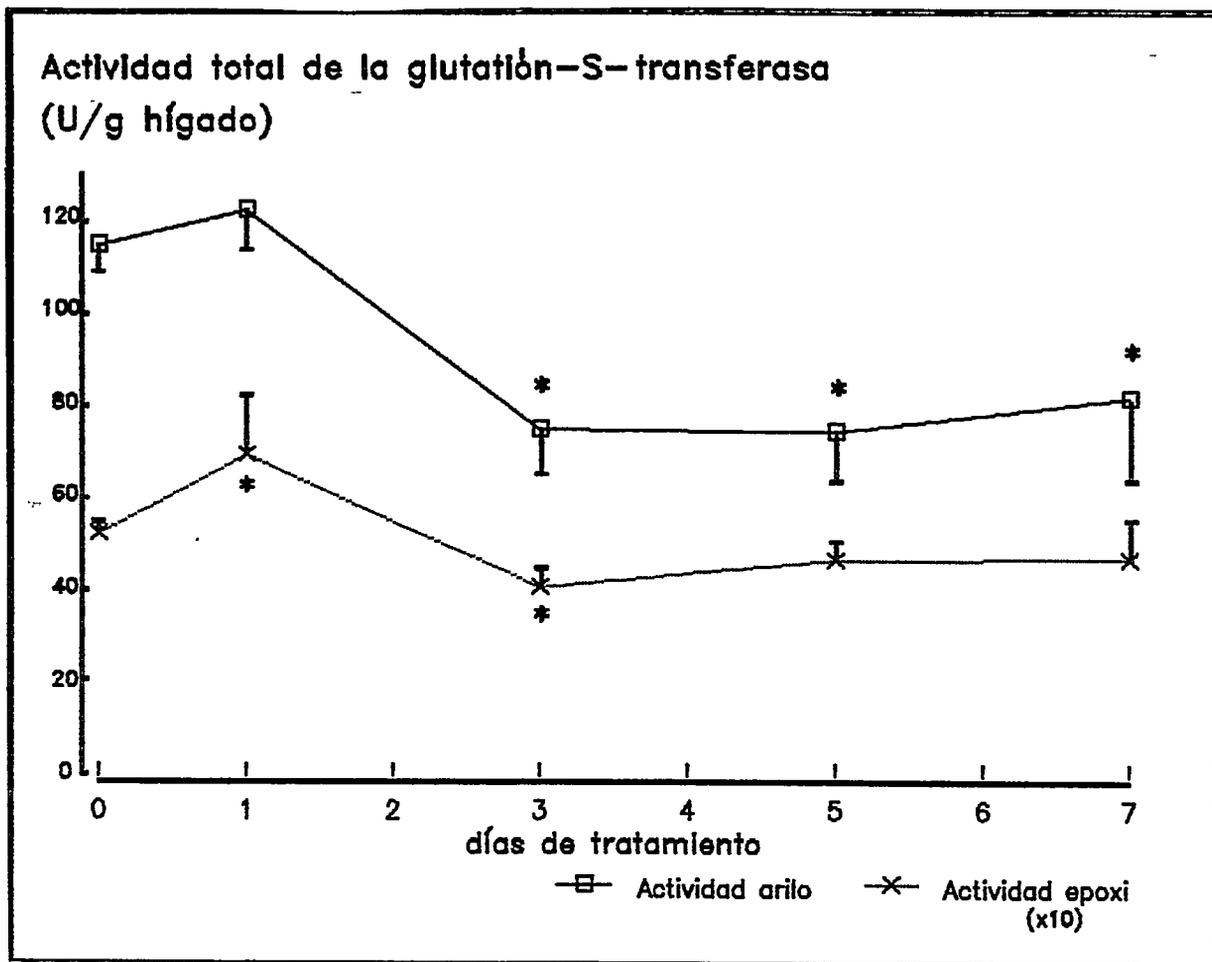


Figura 19. Estudio cinético de los cambios en las actividades totales de las glutati6n-S-transferasas (arilo y epoxy) en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales y la preparaci6n de los sobrenadantes de 33.000g por 60 minutos de homogeneizados hepáticos se describe en Materiales y Métodos. La medici6n de las actividades arilo y epoxy se realizó segun lo descrito en Materiales y Métodos, como se indica en la figura 18. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 4 a 29 animales por grupo experimental. La expresi6n de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

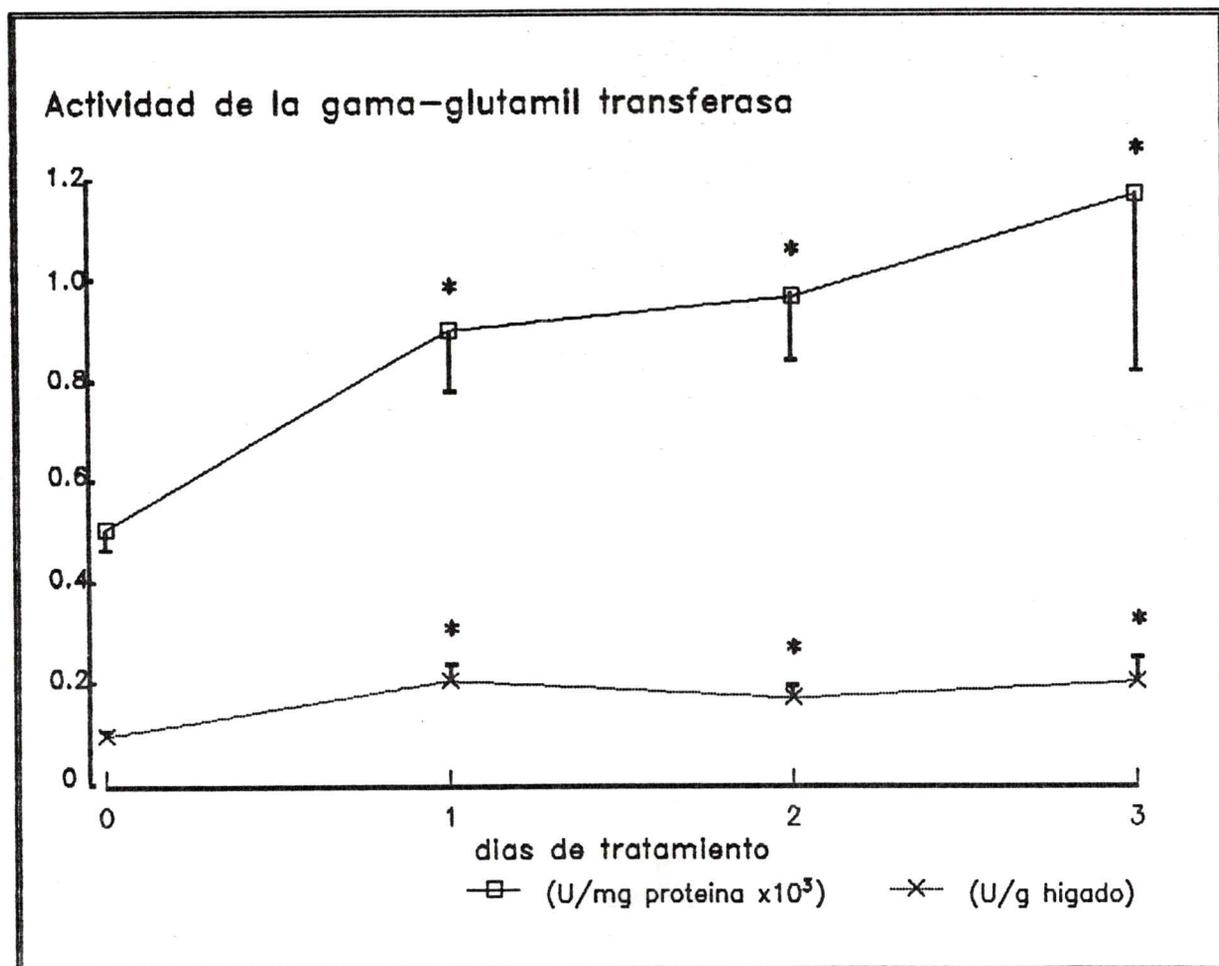


Figura 20. Estudio cinético de los cambios en la actividad de la gama-glutamil transferasa en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales, la preparación de los homogeneizados hepáticos y la medición de la actividad de la gama-glutamil transferasa, A_{405} de la p-nitroanilina producida al incubar el homogeneizado con glicilglicina 50 mM y gama-glutamil-p-nitroanilida 4,5 mM, en un amortiguador a pH 8,0 de amediol 47,6 mM con $MgCl_2$ 10 mM, se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para un número de 7 a 24 animales por grupo experimental. La expresión de estos resultados y el tratamiento estadístico de ellos se describen en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

con T₃ durante 1, 2 y 3 días. La figura 20 muestra los resultados de la evaluación de la actividad de la gamma-glutamil transferasa hepática. Se puede apreciar un pronunciado, progresivo y significativo incremento de ella, con un efecto máximo a los 3 días de tratamiento, lo que señala un aumento drástico en la utilización del GSH mediante el proceso catabólico que inicia esta enzima, lo que podría contribuir a la depleción del GSH observada en estos animales. Estos resultados se obtuvieron en ausencia de cambios significativos en el contenido de proteínas totales, como se indicó en la sección B.1.3.2.

En relación a la actividad específica de la enzima renal, expresada como U/mg de proteína renal o como U/g de riñón, no se observó variación significativa en los períodos de tratamiento estudiados. Los valores obtenidos en U/mg de proteína y en U/g de riñón, fueron respectivamente los siguientes: 1,60 ± 0,11 (n = 15) y 226,5 ± 15,8 (n = 16) (control); 1,744 ± 0,24 (n = 5) y 230 ± 9,18 (n = 5) (T₃ 1 día); 1,65 ± 0,30 (n = 5) y 208,6 ± 29,9 (n = 5) (T₃ 2 días); 1,57 ± 0,25 (n = 5) y 245,4 ± 32,7 (n = 6) (T₃ 3 días), N.S., en ausencia de cambios significativos en el contenido total de proteínas renales [control: 129,7 ± 5,4 (n = 16) mg/g de riñón; T₃ 1 día: 135,05 ± 18 (n = 5); T₃ 2 días: 130,2 ± 10,1 (n = 5); T₃ 3 días: 141 ± 6,7 (n = 6), N.S.]. Estos resultados indican que el hipertiroidismo no

modifica la velocidad de utilización renal del GSH.

2. Eflujo de glutatión.

El hígado libera GSH y GSSG hacia el sinusoides y hacia el conducto biliar, estimándose que ambos eflujos representan alrededor de un 90 a 95% de la velocidad de depleción del glutatión hepático (Kaplowitz y col., 1985). En condiciones basales, mientras el eflujo sinusoidal es casi exclusivamente GSH, el canalicular es GSSG, estimándose que la velocidad del eflujo sinusoidal corresponde a alrededor de un 80 a 85% del eflujo total y es aproximadamente igual a la velocidad de recambio del GSH (Kaplowitz y col., 1985). Estos antecedentes y las depleciones drásticas tanto de GSH como de GSSG observadas en los animales hipertiroideos, hicieron necesario el estudio de la influencia que ejercería el hipertiroidismo sobre las velocidades de los eflujos sinusoidal y canalicular de glutatión medido como equivalentes totales de GSH.

2.1. Evaluación del eflujo sinusoidal de GSH total. Este estudio utilizó preparaciones de hígado perfundido de ratas tratadas con T₃ durante 1, 2 y 3 días. Los resultados de estas mediciones se muestran en la figura 21 y en la tabla 16. Se puede apreciar que al aumentar el número de días de tratamiento hormonal, se produce un incremento progresivo en la velocidad de liberación sinusoidal de GSH (figura 21),

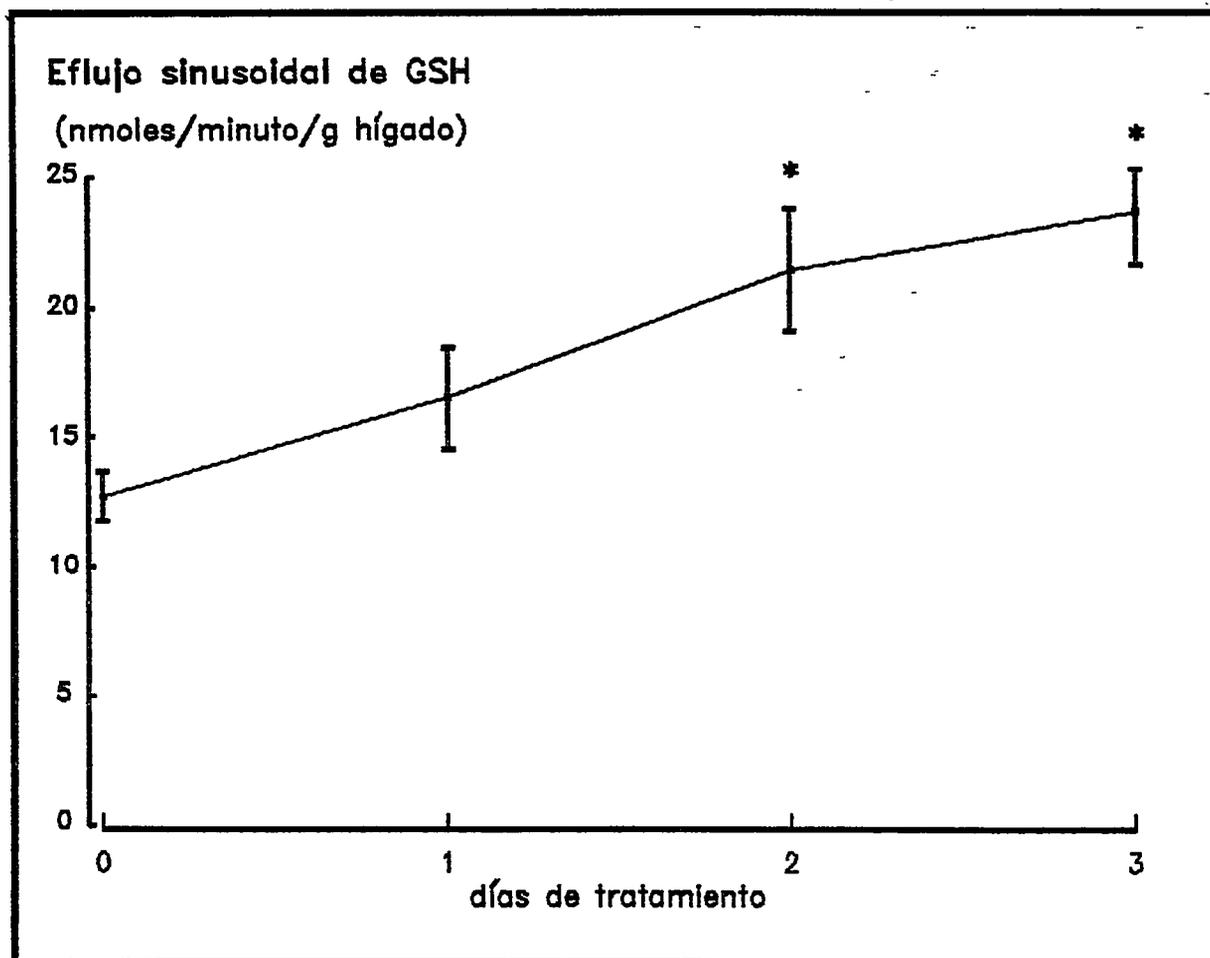


Figura 21. Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal de GSH hepático en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales, la preparación del hígado perfundido, la cuantificación del GSH en el líquido de perfusión, mediante un método catalítico y el registro de la A_{412}/min , y el cálculo del eflujo sinusoidal del GSH se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 6 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

TABLA 16
 Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal del
 GSH hepático en el hipertiroidismo experimental.

Trata- miento	[GSH _{total}] (μ moles/g hig)	Eflujo de GSH (nmoles/g/min)	Eflujo fracc. de GSH (h^{-1})
NaOH 0,1N	5,78 \pm 0,32	12,72 \pm 1,02	0,134 \pm 0,014
T ₃ 1 día	4,25 \pm 0,31	16,50 \pm 1,94	0,243 \pm 0,034
% ef. (p)	-26,5 (5×10^{-3})	+29,7 (N.S.)	+81,3 (0,013)
T ₃ 2 días	3,58 \pm 0,19	21,40 \pm 2,3	0,369 \pm 0,053
% ef. (p)	-38,1 (7×10^{-3})	+68,2 (0,025)	+175,4 (0,01)
T ₃ 3 días	12,78 \pm 0,27	23,60 \pm 1,9	0,549 \pm 0,074
% ef. (p)	-51,9 (10^{-3})	+85,5 (3×10^{-4})	+309,7 (10^{-4})

El tratamiento de los animales y la preparación del hígado perfundido se describen en Materiales y Métodos. La cuantificación del GSH en el líquido de perfusión y en las muestras de hígado se realizó en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, mediante un método catalítico y el registro de la A_{412}/min . La velocidad de eflujo y el eflujo fraccional del GSH se calcularon como está indicado en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 6 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

con aumentos significativos a los 2 días y con un efecto máximo a los 3 días, que representa un 86% de incremento por sobre los valores basales (tabla 16). Por otro lado, se observa que el contenido de GSH de los animales con 3 días de tratamiento está disminuido en un 52% respecto a valores basales con lo cual el eflujo fraccional del tripéptido, que representa la fracción del GSH hepático que es liberada al sinusoides, aumenta en 310% en estos animales (tabla 16). Al integrar el área bajo las respectivas curvas de eflujo de glutatión versus tiempo de perfusión (15 a 75 minutos), se obtuvo el eflujo integrado de éste. Este eflujo, que representa al GSH disponible para la liberación sinusoidal, alcanzó los siguientes valores: $617,6 \pm 62,3$ ($n = 7$) nmoles/g de hígado (control); $841 \pm 99,1$ ($n = 7$) (T_0 , 1 día); $1140,4 \pm 165,5$ ($n = 7$) (T_0 , 2 días); $1130 \pm 112,6$ ($n = 7$) (T_0 , 3 días), lo que representa un incremento neto y significativo de 512,4 nmoles de GSH/g de hígado, en los animales con 3 dosis de T_0 , respecto a los animales control.

En adición al eflujo de GSH, en este estudio se evaluaron las velocidades de eflujo sinusoidal de proteínas y de LDH hepáticas. Los resultados de estas mediciones se muestran en la figura 22 y en la tabla 17. Se observa un incremento progresivo en ambos eflujos, con perfiles semejantes al del eflujo de GSH (figura 21), siendo ambos significativos a los 2 días de tratamiento y máximo (1858%

TABLA 17
 Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal de
 LDH y proteínas hepáticas en el hipertiroidismo
 experimental.

Ratas	Eflujo LDH (mU/g/min)	Ef Fr LDH (h ⁻¹)	Eflujo Prot (mg/g/min)	Ef Fr Prot (h ⁻¹)(x10 ³)
Con- trol	83,5 ± 35,5	0,014±0,006	0,130±0,017	40 ± 5
T ₃ 1 día	495,1±218,3	0,069±0,031	0,159±0,012	52 ± 5
%ef(p)	+493 (N.S.)	+393 (N.S.)	+22,3(N.S.)	+30(N.S.)
T ₃ 2 días	1.291±402,7	0,161±0,044	0,240±0,027	86 ± 11
%ef(p)	+1446(0,01)	+1050(10 ⁻²)	+84,6(10 ⁻³)	+115(10 ⁻³)
T ₃ 3 días	1.635±29,7	0,250±0,045	0,305±0,032	112 ± 16
%ef(p)	+1858(10 ⁻⁴)	+1686(10 ⁻⁴)	+134,6(10 ⁻⁴)	+180(10 ⁻³)

El tratamiento de los animales y la preparación del hígado perfundido se describen en Materiales y Métodos. La cuantificación de LDH y proteínas en el líquido de perfusión se realizó en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La velocidad de eflujo se calculó como está descrito en Materiales y Métodos. Para calcular el eflujo fraccional (Ef Fr) se determinó contenido de proteínas y actividad de LDH en muestras de hígado, como está descrito en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio ± S.E.M. para 6 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

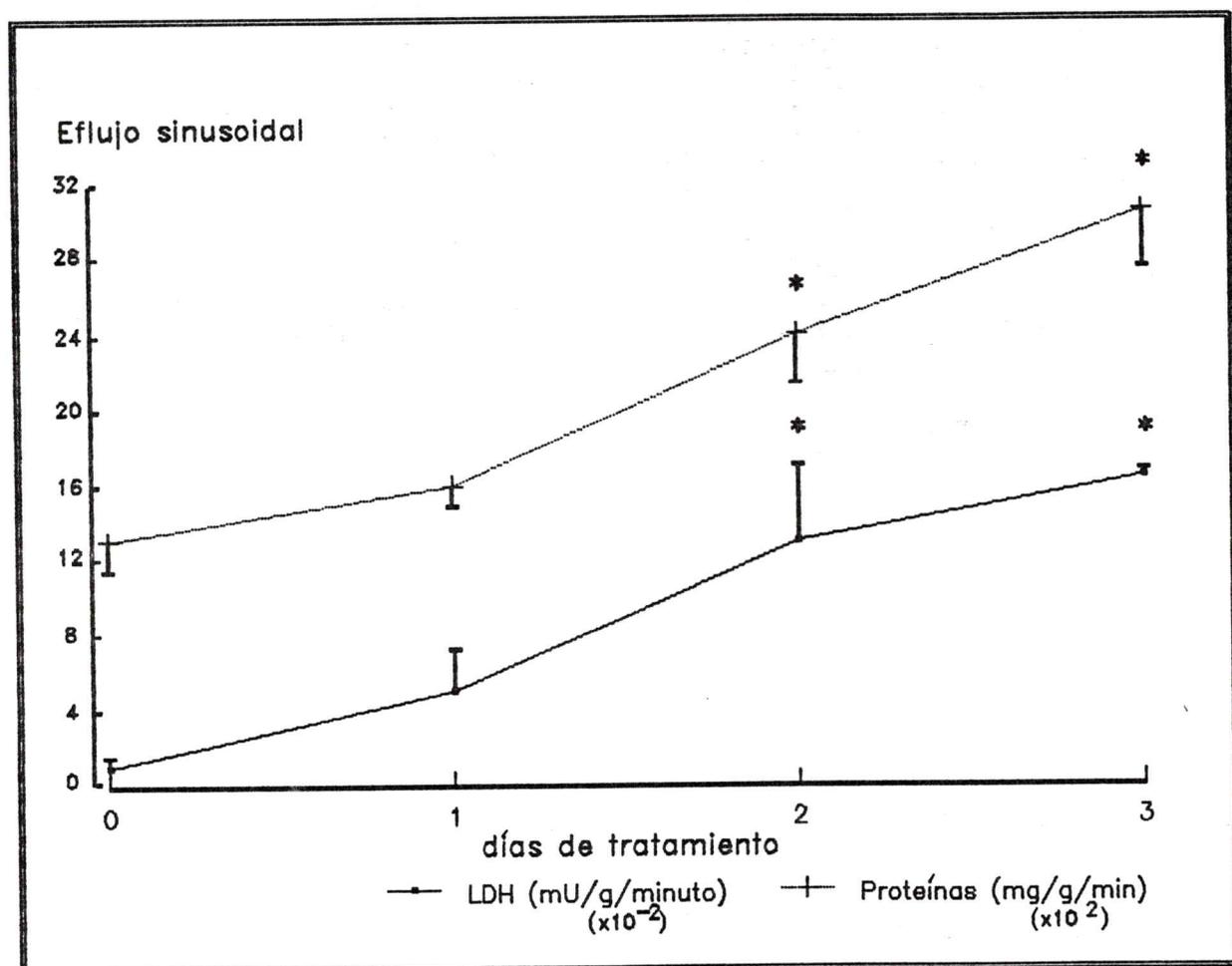


Figura 22. Estudio cinético de los cambios en el eflujo sinusoidal de LDH y proteínas hepáticas en el hipertiroidismo experimental.

El tratamiento de los animales, la preparación del hígado perfundido, la cuantificación de LDH y proteínas en el líquido de perfusión y el cálculo de la velocidad de eflujo sinusoidal de LDH y proteínas se describen en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para 6 animales por grupo experimental. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. (*): $p < 5 \times 10^{-2}$ respecto a controles.

para LDH y 134,6% para proteínas) a los 3 días de tratamiento (tabla 17). En la tabla 17 se observa además que a los 2 y 3 días de tratamiento, se producen incrementos significativos en ambos eflujos fraccionales, a pesar que en el hígado, tanto la actividad de la LDH [control: $408 \pm 25,8$ (n = 7) U/g de hígado; T_2 2 días: $461,8 \pm 26,3$ (n = 7); T_3 3 días: $397 \pm 18,7$ (n = 7), N.S.] como el contenido de proteínas [control: $197,2 \pm 5,34$ (n = 7) mg/g de hígado; T_2 2 días: $180,9 \pm 6,8$ (n = 7); T_3 3 días: $168,4 \pm 9,2$ (n = 7), N.S.] no están alterados.

Estos resultados indican que, en los animales hipertiroideos, el incremento en el eflujo sinusoidal del GSH sería uno de los factores determinantes de la depleción del tripéptido que se observa en dicha condición.

2.2. Eflujo canalicular de GSH total. Este estudio se realizó en animales anestesiados, previamente tratados con T_3 durante 3 días. Los resultados de estas mediciones se muestran en la tabla 18. Se observa que, luego del tratamiento con T_3 , la concentración biliar de GSH total disminuye en forma no significativa, en tanto que la velocidad del flujo biliar incrementa significativamente (25%) respecto a los animales control. Por tales motivos, la velocidad de eflujo canalicular del GSH alcanza valores semejantes en los animales hipertiroideos y en los eutiroides. En relación al eflujo fraccional de GSH por la

TABLA 18
Efecto del hipertiroidismo sobre el eflujo biliar de GSH.

Parámetro	Ratas control	Ratas tratadas
Flujo biliar ($\mu\text{l}/\text{ghig}/\text{min}$)	$1,20 \pm 0,08$ (n = 15)	$1,50 \pm 0,07$ (n = 16)
% de efecto (p)		+ 25 (0,009)
[GSH _{total}]biliar ($\mu\text{mol}/\text{mlbilis}$)	$1,39 \pm 0,17$ (n = 15)	$1,17 \pm 0,10$ (n = 16)
% de efecto (p)		- 15,8 (N.S.)
Excr biliar GSH ($\text{nmol}/\text{min}/\text{ghig}$)	$1,70 \pm 0,26$ (n = 15)	$1,76 \pm 0,20$ (n = 16)
% de efecto (p)		+ 3,5 (N.S.)
Eflujo fracc (h^{-1})	$0,012 \pm 0,0015$ (n = 5)	$0,028 \pm 0,006$ (n = 5)
% de efecto (p)		+ 133,3 (0,037)

El tratamiento de los animales (T₃ 3 días) y la obtención de las muestras de bilis se describen en Materiales y Métodos. La cuantificación del GSH en muestras biliares se realizó en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, mediante un método catalítico y el registro de la A₄₁₂/min. La velocidad de excreción biliar del GSH se calculó como está descrito en Materiales y Métodos. Para calcular la velocidad de eflujo biliar fraccional de GSH, se evaluó el contenido de éste en muestras de hígado, en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. N.S., no significativo.

vía biliar, debido a la disminución del contenido hepático del tripéptido los animales hipertiroideos manifiestan un incremento significativo (133%) de este parámetro. Debido a que el ensayo enzimático usado en estos estudios mide equivalentes totales de GSH (GSH + 2GSSG) (Tietze, 1969), se hicieron determinaciones adicionales del contenido de GSSG, según lo descrito en Materiales y Métodos, el cual aumenta en ciertas condiciones de estrés oxidativo (Sies y Akerboom, 1974). Sin embargo, y de acuerdo con los resultados obtenidos para GSH total (tabla 18), la concentración biliar de GSSG no es modificada significativamente luego de 3 días de tratamiento con T_3 [control: $0,283 \pm 0,068$ (n = 8) μ moles/ml de bilis; T_3 : $0,170 \pm 0,021$ (n = 10), N.S.].

Estos resultados indican que en el hipertiroidismo, el eflujo canalicular de GSH no contribuiría a la depleción del tripéptido que se manifiesta en esta condición.

3. Recambio de GSH in vivo.

En condiciones normales de estado estable, las velocidades de reposición y depleción del GSH hepático son semejantes, lo que representa un equilibrio dinámico para la mantención de la homeostasis del tripéptido (Kaplowitz y col., 1985). El recambio del GSH es un proceso continuo de síntesis y degradación intracelular del tripéptido. Con estos antecedentes y los resultados obtenidos en los estudios previos de la influencia del hipertiroidismo en

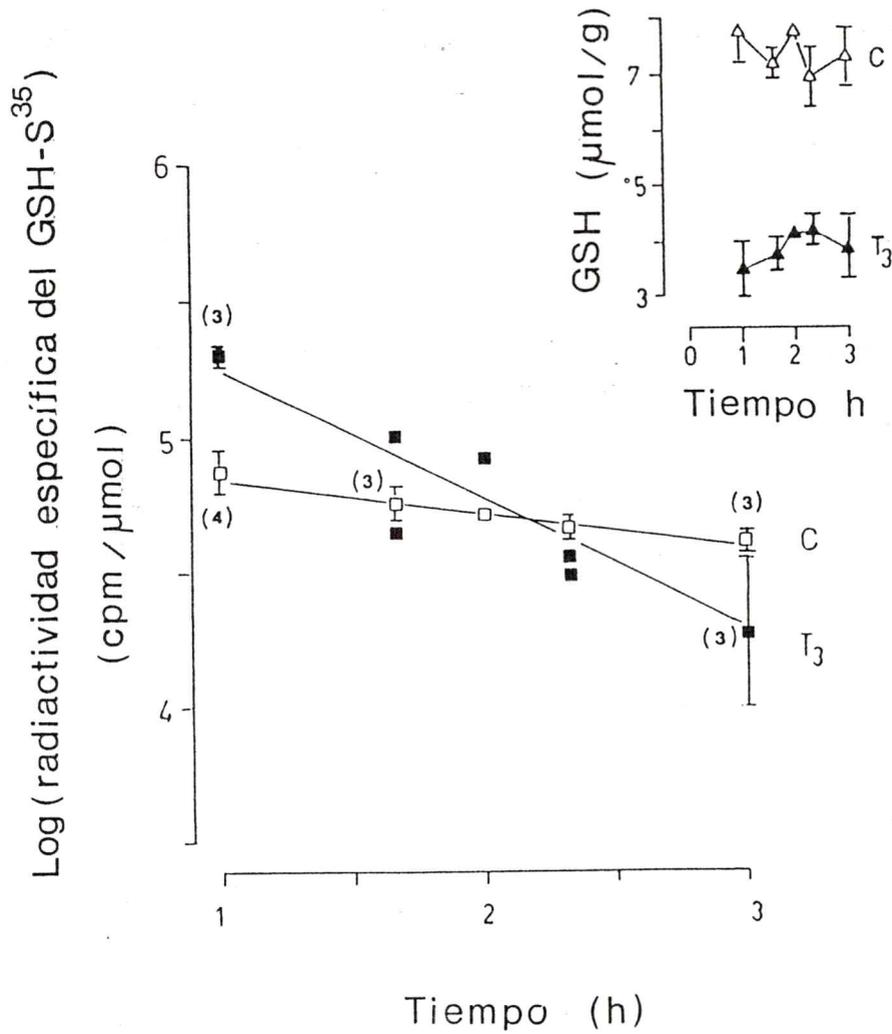


Figura 23. Efecto del hipertiroidismo experimental sobre la velocidad de recambio del GSH hepático.

Figura 23. Efecto del hipertiroidismo experimental sobre la velocidad de recambio del GSH hepático.

El tratamiento de los animales (T, 3 días) y la medición del decaimiento del GSH-S³⁵ luego de administrar un pulso de L-cisteína-S³⁵ a las ratas y de separar el GSH del GSSG, de la cisteína y de la cistina por HPLC para evaluar la radiactividad y el contenido del GSH en el efluente de la columna, se describen en Materiales y Métodos. El decaimiento del GSH-S³⁵ fue de primer orden tanto en las ratas control ($r = -0,97$) como en las tratadas ($r = -0,96$). Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. para el número de animales (n) adyacente a cada punto. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos. El inserto muestra el contenido del GSH_{total} hepático a lo largo del experimento, medido por un método catalítico según se describe en Materiales y Métodos; los valores promedio de cada grupo experimental se muestran en la tabla 19.

TABLA 19

Efecto del hipertiroidismo sobre las velocidades de recambio y eflujo fraccional de GSH hepático in vivo.

Parámetro evaluado	Ratas control	Ratas tratadas
Contenido de GSH _{total} (μmol/hígado)	7,40 ± 0,28 (n = 14)	3,90 ± 0,21 (n = 11)
% de efecto		- 47,3
p		<10 ⁻³
Velocidad de recambio de GSH (h ⁻¹)	0,158 ± 0,016 (n = 4)	0,489 ± 0,164 (n = 3)
% de efecto		+ 273,3
p		<5x10 ⁻²
Eflujo fraccional (nmol/min/híg)	19,59 ± 2,31 (n = 4)	32,30 ± 12,77 (n = 3)
% de efecto		+ 64,9
p		

El tratamiento de los animales (T₃, 3 días) se describe en Materiales y Métodos. El estudio de recambio in vivo del GSH se efectuó en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, midiendo la velocidad de desaparición de GSH-S³⁵ hepático, después de administrar un pulso de L-cisteína-S³⁵ a las ratas y de separar el GSH del GSSG, de la cisteína y de la cistina por HPLC. La radiactividad del GSH-S³⁵ y el contenido de éste, tanto en el efluente de la columna como en el hígado (GSH_{total}), se midieron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, utilizando un método catalítico para cuantificar los equivalentes totales de GSH. La velocidad de recambio de GSH corresponde a la pendiente de la recta de regresión de la figura 23; el eflujo fraccional o flujo de recambio de GSH, representa la velocidad de síntesis de GSH in vivo y es igual al producto de la velocidad de recambio, expresada en minutos, por el contenido de GSH_{total}. Los resultados representan el promedio ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. El tratamiento estadístico de estos datos se describe en Materiales y Métodos.

procesos de síntesis y degradación del GSH, se planteó evaluar la velocidad de recambio *in vivo* del tripéptido en ratas tratadas con T₃ durante 3 días. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 23 y en la tabla 19. En la figura 23 se observa que el decaimiento del GSH-S³⁵, cuya pendiente corresponde a la velocidad de recambio del GSH, es un proceso de primer orden tanto en los animales control como en los tratados. En el inserto de esta misma figura se aprecia la constancia del contenido de GSH total hepático en ambos grupos experimentales, durante el periodo experimental, con una disminución significativa de 47% en los animales tratados, en comparación con los animales control. En la figura 23 se aprecia que la velocidad de recambio del GSH hepático es mayor en los animales hipertiroideos que en los animales control, y en la tabla 19 se muestra que el incremento de este parámetro (273%) es significativo respecto a los animales control. En la tabla 19 se muestra además que el hipertiroidismo incrementa el flujo fraccional del GSH (65%), calculado como el producto entre la velocidad de recambio (h^{-1}) y el contenido de GSH total hepático ($\mu\text{moles/g}$ de hígado), lo que representa un incremento neto en la velocidad de síntesis hepática del tripéptido en los animales hipertiroideos, de 12,71 nmoles/min/g de hígado.

DISCUSION

A. RELACION DE LA CONDICION HIPERTIROIDEA CON LA ACTIVIDAD PROOXIDATIVA HEPATICA.

Se ha establecido que el desbalance entre las actividades celulares prooxidativa y antioxidativa, en favor de la primera, conlleva el establecimiento de un estrés oxidativo celular. Este fenómeno se manifiesta en los organismos aeróbicos y corresponde al daño oxidativo estructural que experimentan diversas moléculas orgánicas, infligido por especies reactivas derivadas del oxígeno (Sies, 1986).

Utilizando este criterio y los resultados obtenidos en esta tesis, se puede afirmar que el incremento en la velocidad de utilización del oxígeno, que caracteriza a la condición hipertiroidea, conduce a una alteración del estado normóxico celular en el hígado y al establecimiento de un estrés oxidativo en este órgano (Esquema VI). Los aumentos significativos del índice TBAR en el hígado (figura 4), en la bilis (tabla 2) y en los microsomas (figura 6), como también de la quimioluminiscencia espontánea en el hígado *in vivo* (figura 5) e *in vitro* (tabla 3), indican una mayor

respuesta lipoperoxidativa hepática de las ratas hipertiroideas en comparación con aquélla de las ratas control. Estudios de otros investigadores sustentan estos hallazgos. Es así como se ha descrito que la quimioluminiscencia de mitocondrias hepáticas de conejos, inducida por Fe^{+2} , aumenta en los animales hipertiroideos y disminuye en los hipotiroideos (Marzoev y col., 1982a; Marzoev y col., 1982b), encontrándose un aumento significativo en el contenido de hidroperóxidos en microsomas hepáticos de ratas hipertiroideas (Landriscina y col., 1988). Además del efecto observado en el hígado, el hipertiroidismo produce aumentos en la lipoperoxidación de tejidos extrahepáticos que manifiestan una respuesta calorigénica. Estos hallazgos incluyen aumentos del índice TBAR en músculo esquelético y cardíaco de ratas hipertiroideas (Asayama y col., 1987), como también de la quimioluminiscencia del cerebro *in vivo* y del OO_2 de cortes de cerebro de ratas hipertiroideas recién nacidas (Adamo y col., 1989). La condición hipertiroidea conduce además a la manifestación de efectos peroxidativos en pacientes hipertiroideos quienes, en relación a sujetos eutiroideos, muestran drásticos aumentos de los niveles plasmáticos y urinarios de TBAR y de la luminiscencia urinaria, con una normalización de estos parámetros luego de la recuperación de valores normales de la velocidad de su metabolismo basal

(Videla y col., 1988; Lissi y col., 1992), mediante terapia antitiroidea con propiltiouracilo (Barker, 1951), droga que posee además un efecto antioxidante directo (Imamura y col., 1986; Fauré y col., 1991); más aún, frente a la adición de t-BOOH, los eritrocitos de estos pacientes son más susceptibles a la inducción de un estrés oxidativo, medido a través del aumento de la quimioluminiscencia y del $\dot{Q}O_2$ que los eritrocitos de sujetos eutiroideos (Videla y col., 1988).

En forma paralela, el hígado de las ratas hipertiroideas manifestó una mayor actividad prooxidativa que el de las ratas control (tabla 1), obteniéndose un incremento en la RSA ($_RSA$) que corresponde al menos a un 16% del aumento del $\dot{Q}O_2$ hepático ($_QO_2$) inducido por el hipertiroidismo (figura 3). La RSA representa al componente respiratorio del $\dot{Q}O_2$ hepático que es eliminado por antioxidantes y que corresponde por lo tanto a la utilización del oxígeno en procesos de reducción univalente (Videla, 1984a) con generación de especies radicalarias que pueden desencadenar el proceso lipoperoxidativo (Fridovich, 1978; Chance y col., 1979; Kappus, 1985; Sies, 1986). En consecuencia, el incremento de la RSA que manifiestan las ratas hipertiroideas señala un incremento de la reducción univalente del oxígeno en el hígado de estos animales.

La reducción univalente del oxígeno puede ocurrir en

diversas reacciones enzimáticas citosólicas, microsomales y mitocondriales, con la generación concomitante de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e indirectamente de HO^{\cdot} (Fridovich, 1978; Chance y col., 1979; Kappus y Sies, 1981). En concordancia con estos planteamientos, el estudio en ratas hipertiroideas de la actividad prooxidativa de microsomas y mitocondrias hepáticos reveló importantes y significativos incrementos en la condición hipertiroidea.

La evaluación de la respiración microsomal de ratas hipertiroideas, en presencia de NADPH, evidenció un drástico aumento del QO_2 (figura 7), correspondiendo éste en un 100% a RMSA (figura 8). Estos resultados concuerdan con hallazgos previos en estos animales en relación a aumentos en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y en la actividad de la NADPH oxidasa (Fernández y col., 1985). Más aún, la medición en estas ratas del QO_2 microsomal en presencia de un agente prooxidante (t-BOOH) y de un antioxidante (CN-3), evidenció una RMSA 54% mayor que la de las ratas control (figura 8), lo que señala una alteración por el tratamiento hormonal de algún componente lipoperoxidativo endógeno, y concuerda además con el aumento del índice TBAR microsomal de dichos animales (figura 6). Estos resultados concuerdan con los antecedentes entregados en la introducción, en relación a que en la condición hipertiroidea hay proliferación del retículo endoplásmico liso con cambios importantes en las

funciones microsomales relacionadas con reacciones de transferencia de un electrón dependientes de NADPH, e incrementos en la generación de $O_2^{\cdot -}$ y en la biotransformación de xenobióticos (Phillips y Langdon, 1956; McGuire y Thomkins, 1959; Conney y Garren, 1961; Tata y col., 1962; Kato y Gillette, 1965; Eichelbaum y col., 1974; Moreno y col., 1979; de Araujo y col., 1982; Fernández y col., 1985). En el retículo endoplásmico liso, las reacciones de oxidación mixta de biotransformación de los xenobióticos pueden generar $O_2^{\cdot -}$ por disociación del complejo oxicitocromo P-450 ($Fe^{+2}-O_2$ -xenobiótico), y H_2O_2 ya sea por dismutación del $O_2^{\cdot -}$ o por disociación del complejo citocromo P-450($Fe^{+3}-O_2^{2-}$ -xenobiótico), (Estabrooke y Werringloer, 1977). La fracción microsomal hepática, por otro lado, puede generar especies activas del oxígeno, en presencia de oxígeno y NADPH, en una proporción que va a depender de la presencia y tipo de un sustrato en el sistema (Estabrooke y Werringloer, 1977).

En adición a la contribución microsomal a la respuesta prooxidativa hepática, el hígado de las ratas hipertiroideas evidenció un incremento drástico en la utilización mitocondrial de oxígeno, vía reducción univalente, con generación de $O_2^{\cdot -}$ y de H_2O_2 . Es así como se vió que partículas submitocondriales hepáticas de ratas hipertiroideas, en presencia de NADH o succinato y de

antimicina-A, bloqueador del transporte mitocondrial de electrones a nivel del citocromo b, son capaces de generar $O_2^{\cdot -}$ a velocidades mayores que las de ratas control (tabla 6). Como consecuencia de este efecto, cabría esperar un incremento en la velocidad de producción mitocondrial de H_2O_2 , vía dismutación de los $O_2^{\cdot -}$ generados. Este planteamiento fue corroborado por los resultados de las mediciones de la velocidad de generación basal de H_2O_2 por mitocondrias hepáticas de ratas, la que aumentó desde 0,17 a 0,41 nmoles/min/mg de proteína (147%) luego del tratamiento con T_3 (figuras 9 a 12), evidenciándose incrementos aún mayores, luego de la adición de succinato y de antimicina-A o azida de sodio a la preparación mitocondrial (figuras 9 y 10; tablas 7 y 8). La producción neta de H_2O_2 por el succinato e inhibidores mitocondriales es más de 100% mayor en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas que en las ratas control, con aumentos significativos en el parámetro en todos los animales, por la adición de los inhibidores mitocondriales (tabla 11). La producción de H_2O_2 , luego de la adición de urato a fracciones mitocondriales hepáticas (figuras 11 y 12), corresponde a aquélla originada en los peroxisomas que contaminan esta fracción subcelular. En esta condición y luego de la adición de azida de sodio la producción de H_2O_2 está drásticamente incrementada en las ratas hipertiroideas respecto a la

producción de las ratas control (figura 12; tablas 9 y 10). Al igual que en el estudio realizado en presencia de succinato, el efecto neto del urato es marcadamente superior en las ratas hipertiroideas que en las ratas control (tabla 11); en presencia de azida de sodio, inhibidor de la cadena mitocondrial de electrones y de la catalasa peroxisomal, se observó una diferencia aún mayor entre los animales control y los tratados (tabla 11), lo que señala que el hipertiroidismo, además de su efecto mitocondrial, estimula la actividad oxidativa de los peroxisomas hepáticos. Este hallazgo concuerda con los de otros investigadores que señalan incrementos de la actividad de oxidasas peroxisomales relacionadas con la producción de H_2O_2 , en el hipertiroidismo (Just y col., 1982 y 1983). En los experimentos que utilizaron urato como sustrato no se observa un aumento significativo de la producción de H_2O_2 luego de la adición de antimicina-A, inhibidor mitocondrial específico (tablas 9 y 10). De hecho al cuantificar los cambios netos que induce la condición hipertiroidea (tratados - control) en la generación de H_2O_2 mediante la oxidación de succinato (sustrato mitocondrial específico) en presencia de antimicina-A (inhibidor mitocondrial específico), se pudo visualizar el efecto neto del hipertiroidismo sobre la producción mitocondrial de H_2O_2 , siendo éste de 150% (figura 13). En comparación, la

condición hipertiroidea incrementó en sólo un 23% la producción de H_2O_2 mediante la oxidación de urato (sustrato peroxisomal específico) en presencia del inhibidor mitocondrial (figura 13). Los estudios realizados en partículas submitocondriales, fracción exenta de peroxisomas (Pedersen y col., 1978), permitieron una estimación más precisa del efecto del hipertiroidismo sobre la generación mitocondrial de H_2O_2 . Con este enfoque experimental se pudo establecer que esta condición aumenta significativamente las producciones de H_2O_2 en condiciones basal (56%), con sustrato mitocondrial exógeno (143%) y con bloqueador del flujo mitocondrial de electrones (59,7%) (tabla 12), y también confirmar el efecto activador que ejerce el hipertiroidismo sobre la actividad prooxidativa mitocondrial señalado por los estudios con mitocondrias intactas (figuras 9 a 12; tablas 7 a 10). En estas condiciones experimentales, la producción de H_2O_2 en presencia de un sustrato peroxisomal no es diferente a la basal, sin que se observe un aumento significativo de ella en los animales hipertiroideos (tabla 12); por esta razón se puede afirmar que los cambios observados en la generación de H_2O_2 derivarían sólo de alteraciones mitocondriales que ejercería el hipertiroidismo. En este estudio se vió además que la producción de H_2O_2 mediante la oxidación de sustrato endógeno, es estimulada en todos los animales cuando se

inhibe el flujo mitocondrial de electrones con antimicina-A (tabla 12); sin embargo el efecto de este inhibidor en presencia de sustrato exógeno (succinato 4 mM) sólo es significativo en los animales control (tabla 12). La falta de estimulación de la producción de H_2O_2 dependiente de succinato por la antimicina-A en partículas submitocondriales de hígado de ratas hipertiorideas, podría estar asociada a la mayor actividad de la deshidrogenasa succínica descrita en esta condición (Sterling, 1986). Esto facilitaría el flujo de electrones hacia la formación de H_2O_2 a velocidades cercanas a los valores máximos, ya que el transporte de electrones hacia el oxígeno es mínimo por falta de ADP en el sistema (Turrens y col., 1982b). Entre los cambios mitocondriales inducidos por el hipertiroidismo, los que incluyen incrementos en el contenido y actividad de algunos componentes de la cadena transportadora de electrones y de la capacidad oxidativa de estos organelos (Barker, 1951; Sterling, 1986) podrían explicar el estímulo de procesos mitocondriales de reducción univalente del oxígeno, en esta condición. Se ha sugerido que en mitocondrias que poseen un control respiratorio reducido, se puede producir la desestabilización de algunos componentes de la cadena respiratoria, incrementando la reducción univalente del oxígeno y la generación de $O_2^{\cdot -}$ y de H_2O_2 , vía SOD, (Dryer y col., 1980); se ha descrito que la cadena respiratoria

mitocondrial puede generar $O_2^{\cdot -}$ a nivel de la NADH deshidrogenasa y de la ubiquinona-citocromo b (Turrens y Boveris, 1980; Turrens y col., 1982a).

Con estos hallazgos se puede concluir que en el hipertiroidismo hay un incremento significativo de la actividad prooxidativa celular, condicionada por incrementos tanto de la RMSA en microsomas, que representa el 100% del incremento en la respiración microsomal, como de la utilización mitocondrial del oxígeno en reacciones de reducción univalente con generación de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 , contribuyendo así al aumento de la respiración hepática en esta condición. Además las especies activas del oxígeno que generan estos organelos pueden incrementar el proceso de lipoperoxidación en los animales hipertiroides, el que por su naturaleza aeróbica conlleva a un incremento en el CO_2 celular. Junto a estos efectos, el incremento de la actividad oxidativa peroxisomal en el hipertiroidismo, que involucra un incremento de la producción de H_2O_2 , contribuiría también a la respuesta prooxidativa y al aumento en el consumo de oxígeno celular.

B. ROL DE LA MODIFICACION DE LAS ACTIVIDADES CELULARES ANTIOXIDANTES EN EL DESENCADENAMIENTO DEL ESTRES OXIDATIVO HEPATICO.

Los resultados de los estudios en el hipertiroidismo de dos de los sistemas enzimáticos antioxidantes celulares, la

SOD citosólica y la catalasa, indicaron que esta condición produjo una reducción significativa de las actividades de ambas enzimas hepáticas (figuras 14 y 15). En ambos casos este efecto fue más marcado en las ratas con 3 días de tratamiento hormonal, periodo en el cual se observó incrementos máximos en los parámetros celulares asociados a la actividad prooxidativa hepática (sección A). En estos animales, se obtuvo una disminución de un 40% en la actividad de la SOD citosólica y de un 46% en la actividad de la catalasa. Ambas disminuciones podrían ser el resultado del desencadenamiento de un mecanismo degradativo, mediado tal vez por el incremento que induce la condición hipertiroidea en la generación de especies activas derivadas del oxígeno (sección A). Al respecto, estudios *in vitro* han demostrado una efectiva inactivación de la SOD por H_2O_2 (Hodgson y Fridovich, 1975) y de la catalasa por $O_2^{\cdot -}$ (Kono y Fridovich, 1975), por lo que se ha postulado que ambas enzimas estarían involucradas en una protección recíproca (McCord, 1989). Sin embargo, en diferentes modelos de estrés oxidativo *in vivo*, incluyendo el hipertiroidismo, se ha sugerido que la principal especie oxidativa sería el 1O_2 (Lissi y col., 1992). Esta proposición está basada en la magnitud del aumento en la concentración de 1O_2 por estrés oxidativo (estimado por el incremento de la luminiscencia espontánea), su concordancia temporal con la cinética de

inactivación enzimática, y la localización o acceso al sitio subcelular donde ocurre el proceso (Lissi y col., 1992). Independientemente de la naturaleza de la especie oxidante, la SOD citosólica y la catalasa poseen residuos de histidina esenciales, aminoácido particularmente sensible a la acción oxidativa del O_2^- , H_2O_2 y 1O_2 (Sies, 1986), los cuales incrementan su nivel de estado estable en el hígado en la condición hipertiroidea.

A diferencia de la actividad citosólica de la SOD, la actividad mitocondrial hepática de esta enzima aumentó en un 88% en los animales tratados 3 días con T_3 (tabla 13). Este incremento podría deberse al aumento de la masa mitocondrial inducido por la condición hipertiroidea, con el incremento de algunas enzimas y componentes de la cadena transportadora de electrones (Barker, 1951; Sterling, 1986). Por otro lado, este incremento podría representar un fenómeno de adaptación del organelo al incremento de la actividad de reducción univalente del oxígeno, que genera O_2^- y H_2O_2 (sección A). En este sentido se debe hacer notar que la actividad de la SOD citosólica experimenta un incremento de 49%, en las ratas con 1 día de tratamiento hormonal (figura 14), sin modificación del contenido de proteínas citosólicas, lo que podría también representar una adaptación inicial a la condición prooxidativa que induce el hipertiroidismo.

Las disminuciones de las actividades de SOD y catalasa a los 3 días de tratamiento hormonal, se produjeron sin que hubiera cambios en las actividades hepáticas de la glutatión peroxidasa total (figura 16) y de la glutatión peroxidasa soluble (tabla 14). Sin embargo, el contenido de GSH hepático disminuyó drásticamente en todos los animales hipertiroideos estudiados (figura 17), observándose un efecto máximo a los 3 días de tratamiento (61%), con una caída semejante (69%) en el contenido de GSSG lo que significó una disminución de un 59% en los equivalentes totales (GSH + 2GSSG) de GSH, sin alteración en la relación GSH/GSSG. En vista del rol crítico que desempeña el GSH en procesos hepáticos relacionados con la detoxificación celular, que incluyen el catabolismo de los hidroperóxidos (catalizado por la pareja glutatión peroxidasa-glutatión reductasa), su conjugación con electrófilos (catalizada por las glutatión-S-transferasas), y el atrapamiento directo, ya sea de radicales libres o de moléculas excitadas (Forman y Fisher, 1981; Videla y Valenzuela, 1982; Orrenius y Moldeus, 1984), la disminución que induce la condición hipertiroídea del contenido de este tripéptido representaría una contribución importante al desencadenamiento de un estrés oxidativo hepático.

La disminución del contenido de GSH en el hígado de las ratas tratadas 3 días con T_3 , fue observada

concomitantemente con un incremento significativo (52%) en la velocidad de síntesis *in vitro* del tripéptido (tabla 15), probablemente por disminución de la inhibición que este metabolito ejerce sobre su propia síntesis, a nivel de la gama-glutamilcisteína sintetasa (Kaplowitz y col., 1985). Los procesos de síntesis de GSH y de reducción del GSSG por la pareja glutatión reductasa-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, participan en la reposición del GSH intracelular (Kaplowitz y col., 1985; López-Barea y col., 1990), por lo cual forman parte del sistema auxiliar de defensa antioxidante hepático. El tratamiento con T₃ durante 3 días produjo un incremento drástico en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (90%), sin alterar la actividad de la glutatión reductasa (tabla 15) o de la glutatión peroxidasa (figura 16 y tabla 14). Estos resultados sugieren que los hidroperóxidos y el H₂O₂ producidos en exceso a lo basal, impuestos por el estrés oxidativo desarrollado en la condición hipertiroidea, serían adecuadamente metabolizados por la glutatión peroxidasa, proceso que estaría balanceado por una reducción acorde del GSSG producido, vía glutatión reductasa, al no existir una limitación del suministro del NADPH requerido. En concordancia con este postulado, el hipertiroidismo experimental no provoca un acúmulo de GSSG en el hígado (figura 17) ni induce un aumento en la liberación biliar de

GSSG (sección C), como ocurre en otras situaciones de estrés oxidativo hepático (Sies, 1986; Akerboom y Sies, 1991). Por lo tanto, la depleción del GSH hepático en el hipertiroidismo no estaría asociada a una reducción deficitaria del GSSG, producto de su mayor utilización en el catabolismo de peróxidos.

Por lo tanto, se puede concluir que el hipertiroidismo en la rata está asociado al desarrollo de una condición de estrés oxidativo en el hígado, desencadenado tanto por incrementos de factores celulares prooxidativos (respuestas respiratoria, quimioluminiscente, y lipoperoxidativa) como por disminución de actividades celulares antioxidantes (depleción de GSH y disminuciones de las actividades de SOD y de catalasa).

C. POSIBLE ROL DE CAMBIOS EN EL METABOLISMO DEL GSH EN EL DESENCADAMIENTO DEL ESTRES OXIDATIVO Y EN LA CALORIGENESIS TISULAR.

Como ya se ha señalado, la depleción del GSH hepático en el hipertiroidismo puede representar uno de los factores determinantes del estrés oxidativo que se desarrolla en este tejido en la rata, pudiendo además comprometer funciones celulares dependientes del tripéptido.

El estudio de los mecanismos de utilización del GSH, representados por la conjugación con intermediarios electrofilicos, la oxidación, la degradación y los eflujos

sinusoidal y canalicular del tripéptido, complementados con los hallazgos relacionados con los procesos de reposición del GSH ya referidos (sección B) y de su velocidad de recambio *in vivo*, permitieron una definición de los mecanismos que conducen a la depleción del tripéptido en el hígado de ratas hipertiroideas.

Como se discutió en la sección anterior, la depleción hepática del GSH no está relacionada a cambios adaptativos en reacciones que involucren su oxidación a GSSG ni la reducción de éste a GSH, ya que la condición hipertiroidea no modificó la actividad de la pareja enzimática, que cataliza la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos (glutación peroxidasa) y la recuperación del GSH (glutación reductasa) (figura 16; tablas 14 y 15). La utilización del GSH a través de su conjugación con intermediarios electrofílicos, no contribuye a la depleción hepática de éste. De hecho la condición hipertiroidea produjo una disminución significativa de la actividad de las glutación transferasas (figuras 18 y 19). Estas enzimas corresponden a una familia de enzimas multifuncionales que utilizan GSH en forma efectiva para procesos de conjugación, contribuyendo así a la depleción de éste (Ishikawa y col., 1986). La disminución de la actividad de estas enzimas, sumada a los bajos niveles de GSH hepático existentes, podrían disminuir los procesos de conjugación *in vivo*, lo que explicaría el aumento en la

retención de la bromosulfaleína que se observa en pacientes hipertiroideos (Sir y col., 1987).

La utilización del GSH hepático mediante un proceso catabólico, a través de la ruptura del tripéptido en el ciclo gama-glutamilo, iniciado por la gama-glutamil transferasa (Meister y Anderson, 1983), podría contribuir a la depleción hepática de éste, ya que la actividad de dicha enzima hepática aumenta drásticamente bajo la influencia de T_3 (figura 20). Así, esta actividad enzimática podría representar un mecanismo importante que conlleve la depleción del GSH en la condición hipertiroidea.

En relación al transporte del GSH a través de las membranas canalicular y sinusoidal, se señaló previamente que en condiciones normales la contribución de ambos eflujos de GSH a la velocidad de depleción de éste, se estima en un 90 a 95% (Kaplowitz y col., 1985). Respecto a esto, el tratamiento con T_3 no modificó la velocidad de eflujo canalicular del GSH (tabla 18), mientras que la velocidad de eflujo sinusoidal aumentó en forma drástica, al ser ésta expresada como eflujo neto (figura 21 y tabla 16) o como eflujo fraccional (tabla 16). En las ratas tratadas durante 3 días con T_3 , se observó un aumento neto del eflujo sinusoidal de 10,88 nmoles/min/g de hígado. Este efecto del tratamiento con T_3 se obtuvo en concomitancia con aumentos semejantes en el eflujo sinusoidal de LDH y de proteínas

(figura 22 y tabla 17), lo que indica una alteración en las propiedades de permeabilidad de la membrana plasmática del hepatocito en la condición hipertiroidea. Más aún, se obtuvo una correlación directa y significativa entre los eflujos sinusoidales de GSH y de LDH [$r = 0,79$; $p < 10^{-6}$; para $n = 7$ en cada grupo], lo que indica que el efecto del hipertiroidismo sobre el eflujo sinusoidal de GSH puede representar una pérdida del tripéptido debida a una permeabilización progresiva de la membrana plasmática del hepatocito, lo que conduce a un aumento en el eflujo total de GSH (canalicular + sinusoidal). En las ratas tratadas con T_3 , durante 3 días el eflujo total es de 25,36 nmoles/min/g de hígado, lo que representa un 75,9% de aumento respecto al eflujo de las ratas control (14,42 nmoles/min/g de hígado).

En paralelo con estos hallazgos, la administración de T_3 a ratas durante 3 días produjo un incremento en la velocidad de desaparición del GSH- S^{35} , luego de administrar un pulso de cisteína- S^{35} (figura 23), indicando que la condición hipertiroidea conlleva a una mayor velocidad de recambio del GSH hepático (tabla 19). La constancia a lo largo del experimento del nivel de GSH intrahepático en todos los animales (figura 23), representaría niveles de estado estable de GSH, expresados en μ moles/g de hígado, de $7,40 \pm 0,28$ en las ratas control y de $3,90 \pm 0,21$ en las hipertiroideas (tabla 19). Utilizando estos contenidos de

GSH y las velocidades de recambio respectivas, se vió que la condición hipertiroidea indujo un aumento de 65% en el flujo fraccional del GSH (tabla 19), lo que podría indicar un aumento adaptativo en la velocidad hepática de síntesis del tripéptido (Lauterburg y col., 1982; Kaplowitz y col., 1985), con un efecto neto del tratamiento con T_3 durante 3 días sobre dicho parámetro de 12,71 nmoles/min/g de hígado. Al comparar este incremento con el observado en el eflujo sinusoidal de GSH (10,88 nmoles/min/g de hígado), se observa una compensación casi total entre ambos efectos, ya que el aumento de la pérdida sinusoidal de GSH corresponde al 85,6% del aumento de su síntesis. Sin embargo, para mantener los niveles basales de GSH (7,40 μ moles/g de hígado) el proceso de síntesis hepático en las ratas hipertiroideas debió haber incrementado a 60,3 nmoles/min/g de hígado, lo que representa un incremento neto de 40,8 nmoles/min/g de hígado, considerando que la velocidad de recambio del tripéptido en estos animales es de 0,489 h^{-1} , y que en los animales control es de 0,158 h^{-1} .

Por lo tanto, se puede concluir que la depleción de GSH hepático en la rata, inducida por la condición hipertiroidea, puede ser atribuida mayoritariamente a la pérdida del GSH desde el hígado hacia el espacio sinusoidal y al aumento de la capacidad de degradación hepática del tripéptido. Como consecuencia de esto, se produce un aumento

adaptativo en la velocidad de síntesis del GSH, el cual no logra contrarrestar el incremento en el eflujo sinusoidal del tripéptido, estableciéndose así un nivel de GSH de estado estable mucho más bajo que el de las ratas control. El incremento en el catabolismo del glutatión podría tener relevancia en la depleción del tripéptido en la condición hipertiroidea. Sin embargo la estimación *in vitro* de la actividad de la gama-glutamyl transferasa no permite estimar la contribución exacta de este mecanismo a la depleción del GSH.

Basándose en los resultados obtenidos se puede concluir que el estado hipermetabólico hepático inducido por la condición hipertiroidea experimental en la rata, se acompaña de cambios moleculares que conducen al desencadenamiento de un estrés oxidativo en el hígado. Esta condición se desarrollaría debido a que el tratamiento con T_3 induce no sólo un aumento de la capacidad prooxidativa hepática, con generación de especies activas del oxígeno a nivel microsomal, mitocondrial y peroxisomal, sino que además una drástica disminución de mecanismos claves de defensa antioxidante hepáticos, que incluyen la actividad de SOD y catalasa y el contenido total del glutatión. Como consecuencia de estas modificaciones, se produce un desbalance entre los factores celulares prooxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, y se incrementa la

respuesta lipoperoxidativa hepática. De esta manera, ya que el proceso de lipoperoxidación es de naturaleza aeróbica, se obtendría un aumento del QO_2 hepático que contribuiría a la respuesta calorigénica que se observa en el hipertiroidismo.

Los resultados obtenidos en esta tesis en los animales hipertiroides y eutiroides, sustentan lo postulado por Cutler (1985), cuyos estudios muestran una correlación directa entre las velocidades de autoxidación o lipoperoxidación tisulares y las velocidades del metabolismo basal de diversas especies (Esquema VII).

CONCLUSIONES

Las conclusiones finales más relevantes de esta tesis son las siguientes:

1. La administración de T_3 a ratas induce una respuesta prooxidativa hepática, manifestada a través de aumentos de la RSA medida en hígado perfundido, de la quimioluminiscencia del órgano, tanto *in vivo* como *in vitro* y de la respuesta lipoperoxidativa celular. Estos efectos del tratamiento hormonal serían el resultado de un incremento en la actividad de procesos de reducción univalente del oxígeno a nivel microsomal y mitocondrial, como también de la producción de H_2O_2 en peroxisomas.
2. En concomitancia, la actividad de dos de los sistemas enzimáticos que proporcionan defensa antioxidante celular, la SOD citosólica y la catalasa, disminuyen significativamente en esta situación. Más aún, los contenidos hepáticos de GSH, la biomolécula antioxidante de mayor relevancia a nivel celular, y de GSSG disminuyen en forma drástica por el tratamiento hormonal, estableciéndose niveles de estado estable del tripéptido más bajos que los de animales eutiroides.

3. La depleción del GSH en el hipertiroidismo se debería mayoritariamente a incrementos en el eflujo sinusoidal y en la capacidad degradativa hepática del tripéptido. La velocidad de síntesis del GSH aumenta significativamente en los animales hipertiroideos, sin que este incremento logre equilibrar la pérdida del tripéptido.

PROYECCIONES

Los cambios moleculares inducidos por la calorigénesis tiroidea en el hígado, presentados y analizados en esta tesis, conducentes al desarrollo de una condición de estrés oxidativo, sugieren algunas estrategias experimentales que pudiesen ser de importancia en el área temática estudiada. Entre ellas se destacan:

1. La estimación de la contribución del aumento del catabolismo hepático del GSH a la depleción celular del tripéptido en el órgano intacto. Este objetivo se puede lograr mediante el uso de la técnica del hígado perfundido y aislado de rata, considerando que la actividad de la gama-glutamil transferasa ha sido demostrada recientemente, mediante técnicas histoquímicas, en el polo sinusoidal del hepatocito (Lanca e Israel, 1991), actividad ectópica que aumenta en algunas condiciones experimentales que conllevan una depleción del GSH intrahepático (Israel y col., 1992).
2. La evaluación de la recuperación del nivel de GSH hepático y la normalización de la actividad prooxidativa celular, luego de un determinado protocolo de inducción de la calorigénesis tiroidea, con el objeto de lograr una mejor

comprensión de la transición del estado hipertiroideo al eutiroideo que ocurre luego de la terapia con propiltiouracilo en el hombre.

3. Abordar el estudio de la posible potenciación de la citotoxicidad química y de aquélla asociada a procesos de isquemia/reperfusión en el hígado por el estrés oxidativo hipertiroideo, condiciones que involucran un componente prooxidativo particular.

BIBLIOGRAFIA

Adamo, A.M, Llesuy, S.F., Pasquini, J.M. y Boveris, A. (1989) Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. *Biochem. J.*, 263, 273-277.

Akerboom, T.P.M. y Sies, H. (1990) Glutathione transport and its significance in oxidative stress, en *Glutathione metabolism and physiological functions*. J. Viña editor, CRC Press Inc., Boca Raton, Ann Arbor, Boston, pp. 45-55.

Asayama, K., Dobashi, K., Hayashibe, H., Megata Y. y Kato, K. (1987) Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: A possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hypertyroidism. *Endocrinology*, 121, 2112-2118.

Barker S.B. (1951) Mechanism of action of the thyroid hormone. *Physiol. Rev.*, 31, 205-243.

Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman Li, Y. Sehlinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P. y de Duve, C. (1964) Intracellular distribution of monoamino oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-aminoacid oxidase and catalase by rat-liver tissue. *Biochem. J.*, 92, 179-184.

Beatty, P.W. y Reed, D.J. (1980) Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 204, 80-87.

Bergmeyer, H.U. y Bernt, E. (1974) Lactate dehydrogenase UV-assay with pyruvate and NADH, en *Methods of enzymatic analysis*. H.U. Bergmeyer editor, Academic Press Inc., 2ª edición, Vol 2, pp. 574-579.

Bernt, E. y Bergmeyer, H.U. (1974) Glutathione, en *Methods of enzymatic analysis*. H.U. Bergmeyer editor, Academic Press Inc., 2ª edición, Vol 4, pp. 1643-1647.

Boveris, A., Oshino N. y Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 128, 617-630.

Boveris, A., Cadenas, E., Reiter, R., Filipowsky, M., Nakase, M. y Chance, B. (1980) Organ chemiluminescence: non invasive assay for oxidative radical reactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 347-355.

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

Burton, G.W. e Ingold, K.U. (1989) Mechanism of antioxidant action: preventive and chain breaking antioxidants, en Handbook of free radicals and antioxidants in medicine. J. Miquel y A.T. Quitanilha editores, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, Vol II, pp. 29-43.

Cadenas, E. y Sies, H. (1982) Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. Relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence and lipid peroxidation. Eur. J. Biochem., 124, 349-356.

Cadenas, E. (1985) Oxidative stress and formation of excited species, en Oxidative stress. H. Sies editor, Academic Press, London, pp. 311-330.

Carlberg, J. y Mannervick, B. (1985) Glutathione reductase. Methods Enzymol., 113, 484-495.

Conney A.H. y Garren, L. (1961) Contrasting effects of thyroxine on zoxazolamine and hexobarbital metabolism. Biochem. Pharmacol., 6, 257-262.

Cutler, R.G. (1991) Antioxidants and aging. Am. J. Clin. Nutr., 53, 373s-379s.

Chance, B., Sies H. y Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev., 59, 527-605.

De Araujo, P.S., De Andrade-Silva, R. y Raw, I. (1982) Effect of drugs and hormones on rat liver dimethylaminobenze reductase activity. Braz. J. Med. Biol. Res., 15, 17-28.

De Nayer, P. (1987) Thyroid hormone action at the cellular level. Hormone Res., 26, 48-57.

Dryer, S.E., Dryer, R.L. y Autor, A.P. (1980) Enhancement of mitochondrial cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2,4-dinitrophenol. J. Biol. Chem., 255, 1054-1057.

- Edelman, I.S. (1974) Thyroid thermogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 290, 1303-1308.
- Eichelbaum, M., Bodem, G., Gugler, R., Schneider-Deters C. y Dengler, H.J. (1974) Influence of thyroid status on plasma half-life of antipirine in man. *N. Engl. J. Med.*, 290, 1040-1042.
- Estabrook, R.W. (1967) Mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol.*, 10, 41-47.
- Estabrook, R.W. y Werringloer, J. (1977) Cytochrome P-450. Its role in oxygen activation for drug metabolism, en *Drug metabolism concepts*, A.C.S. Symposium series 44. D.M. Jerina editor, American Chemical Society, Washington, D.C., 1-26.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. y Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.*, 11, 81-128.
- Fauré, M., Lissi, E.A. y Videla, L.A. (1991) Evaluation of the antioxidant properties of thyroid hormones and propylthiouracil in the brain-homogenate autoxidation system and in the free radical-mediated oxidation of erythrocyte membranes. *Chem. Biol. Interact.*, 77, 173-185.
- Fernández, V., Barrientos, X., Kipreos, K., Valenzuela A. y Videla, L.A. (1985) 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*, 117, 496-501.
- Fernández, V., Llesuy, S., Solari, L., Kipreos, K., Videla, L.A. y Boveris, A. (1988) Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Rad. Res. Comms.*, 5, 77-84.
- Fernández, V. y Videla, L.A. (1989) Thyroid hormone, active oxygen and lipid peroxidation, en *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. J. Miquel y A. Quintanilha editores, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, Vol I, pp. 105-115.
- Fernández, V., Simizu, K., Barros, S.B.M., Azzalis, L.A., Pimentel, R., Junqueira, V.B.C. y Videla, L.A. (1991) Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: related enzymes' activities, efflux, and turnover. *Endocrinology*, 129, 85-91.

Flohé, L. y Günzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 105, 114-121.

Fong, K.L., McCay, P.B., Poyer, J.L., Keele B.B. y Misra H. (1973) Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, 248, 7792-7797.

Forman, H.J. y Fisher, A.B. (1981) Antioxidant defenses, en Oxygen and living processes. D.L. Gilbert editor, Springer-Verlag, Berlin, pp 235-249.

Foster, J.M. (1969) Use of oxygen electrode in lecture and student laboratory to demonstrate properties of mitochondria. *Bioscience.*, 19, 541-543.

Fridovich, I. (1978) Superoxide radicals, superoxide dismutase and the aerobic lifestyle. *Photochem. Photobiol.*, 28, 733-741.

Fringes, B., Reith, A. y Riede, U.N. (1982) Peroxisome biogenesis in rat liver during adaptation to mild hypertyroidism: a morphometric/stereologic study by electron microscopy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 386, 514-517.

Glock, G.E. y McLean, P. (1953) Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.*, 55, 400-408.

Griffith, O.W. y Meister, A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl-homocysteine sulfoximine) *J. Biol. Chem.*, 252, 7558-7560.

Haber, R.S. y Loeb, J.N. (1984) Early enhancement of potassium efflux from rat liver by thyroid hormone: relation to induction of Na,K-ATPase. *Endocrinology*, 115, 291-297.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1986) Protection against oxygen radicals in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity, en Free radicals in biology and medicine. B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge editores, Oxford University Press, Oxford, pp. 67-138.

Hodgson, E.K. y Fridovich, I. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, 14, 5294-5299.

Hulbert, A.J. (1978) The thyroid hormones: a thesis concerning their action. *J. Theor. Biol.*, 73, 81-100.

Imamura, M., Aoki, N., Saito, T., Ohno, Y., Naruyama, Y., Yamaguchi, J y Yamamoto, T. (1986) Inhibitory effects of antithyroid drugs on oxygen radical formation in human neutrophils. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 112, 210-216.

Ishikawa, T., Akerboom, T.P.M. y Sies, H. (1986) Role of key defense systems in target organ toxicity, en *Target organ toxicity*. G. Cohen editor, CRC Press Inc., Boca Raton, Vol I, pp. 129-143.

Ismail-Beigi, F. y Edelman, I.S. (1970) Mechanism of thyroid calorogenesis. Role of active sodium transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 67, 1071-1078.

Ismail-Beigi, F. y Edelman, I.S. (1971) Mechanism of the calorogenic action of thyroid hormone. *J. Gen. Physiol.*, 57, 710-722.

Israel, Y., Videla, L., MacDonald, A. y Bernstein, J. (1973) Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol administration. Comparison between the effects produced by ethanol and by thyroid hormones. *Biochem. J.*, 134, 523-529.

Israel, Y., Videla, L., Fernández-Videla, V. y Bernstein, J. (1975) Effects of chronic ethanol treatment and thyroxine administration on ethanol metabolism and liver oxidative capacity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 192, 565-574.

Israel, Y., Speisky, H., Lanca, A.J., Imamura, S., Hirai, M. y Varghese, G. (1992) Metabolism of hepatic glutathione and its relevance in alcohol liver damage, en *Cellular and molecular aspects of cirrhosis*. B. Clément y A. Guillouzo editores, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., Vol. 216, pp. 25-37.

Javitt, N.B. (1978) Hyperthyroidism: Liver, en *The thyroid*. S.C. Werner y S.N. Ingbar editores, Harper & Row, Publishers Inc. New York, 4ª edición, pp. 702-704.

Just, W.W., Hartl F.U. y Schimassek, H. (1982) Rat liver peroxisomes. I. New peroxisome population induced by thyroid hormones in the liver of male rats. *Eur. J. Cell Biol.*, 26, 249-254.

Just, W.W. y Hartl, F.U. (1983) Rat liver peroxisomes. II.

Stimulation of peroxisomal fatty-acid beta-oxidation by thyroid hormones. Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1541-1547.

Kaplowitz, N., Kuhlenkamp, J. y Clifton, G. (1975) Drug induction of hepatic glutathione-S-transferases in male and female rats. Biochem. J., 113, 400-419.

Kaplowitz, N., Aw, T.K. y Ooktens, M. (1985) The regulation of hepatic glutathione. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 36, 715-744.

Kappus, H. y Sies, H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. Experientia, 37, 1233-1241.

Kappus, H. (1985) Lipid peroxidation: mechanism, analysis, enzymology and biological relevance, en Oxidative Stress. H. Sies editor, Academic Press, London, pp. 273-310.

Kato, R. y Gillette, J.R. (1965) Sex differences in the effects of abnormal physiological states on the metabolism of drugs by rat liver microsomes. J. Pharmacol. Exp. Ther., 150, 285-291.

Kato, R. y Takahashi, A. (1968) Thyroid hormone and activities of drug-metabolizing enzymes and electron transport systems of rat liver microsomes. Mol. Pharmacol., 4, 109-120.

Kono, Y. y Fridovich, I. (1975) Superoxide radical inhibits catalase. J. Biol. Chem., 257, 5751-5754.

Lanca, A.J. e Israel, Y. (1991) Histochemical demonstration of sinusoidal gamma-glutamyl-transferase activity by substrate protection fixation: comparative studies in rat and guinea pig liver. Hepatology, 14, 857-863.

Landriscina, C., Petragallo, V., Morini, P. y Marcotrigiano, G.O. (1988) Lipid peroxidation in rat liver microsomes. I. Stimulation of the NADPH-cytochrome P-450 reductase-dependent process in hyperthyroid state. Biochem. Int., 17, 385-393.

Larsen, P.R. (1982) Thyroid pituitary interaction: feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones. N. Engl. J. Med., 306, 23-32.

Lauterburg, B.H., Vaishnav, Y., Stillwell, W.G. y Mitchell,

J.R. (1980) The effects of age and glutathione depletion on hepatic glutathione turnover in vivo determined by acetaminophen probe analysis. J. Pharmacol. Exp. Ther., 213, 54-58.

Lissi, E.A., Videla, L.A., González-Flecha, B., Giulivi, C. y Boveris, A. (1992) Metabolic regulation in oxidative stress. Inactivation of superoxide dismutase and catalase by oxygen active species: an overview, en Oxidative damage and repair. K.J.A. Davies editor, Pergamon Press, Oxford. En prensa.

Loeb, J.N. (1986) Thyroid diseases. Metabolic changes, en The thyroid a fundamental and clinical text. S.H. Ingbar y L.E. Braverman editores. J.B. Lippincott company, Philadelphia. 5ª edición, pp. 949-956.

López-Barea, J., Bárcena, J.A., Bocanegra, J. A., Florindo, J., García-Alfonso, C., López-Ruiz, A., Martínez-Galisteo, E. y Peinado, J. (1990) Structure, mechanism, functions and regulatory properties of glutathione reductase, en Glutathione metabolism and physiological functions. J. Viña editor, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, pp.105-115.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

Martin Jr, J.P., Dailey, M y Sugarman, E. (1987) Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. Arch. Biochem. Biophys., 255, 329-336.

Marzoev, A.I., Kozlov, A.V., Andryushchenko, A.P. y Vladimirov, Y.A. (1982a) Activation of lipid peroxidation in liver mitochondria of hyperthyroid rabbits. Bull. Exp. Biol. Med., 93, 269-272.

Marzoev, A.I., Kozlov, A.V. y Vladimirov, Y.A. (1982b) Inhibition of lipid peroxidation in mitochondria isolated from liver of hypothyroid rabbits. Bull. Exp. Biol. Med., 93, 275-277.

McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemo cuprein). J. Biol. Chem., 244, 6049-6055.

McCord, J.M. (1989) Free radicals and myocardial ischemia:

- an overview and outlook. *Free Rad Biol. Med.*, 4, 9-14.
- McGuire, J.R. y Thomkins, G.M. (1959) The effects of thyroxine administration on the hepatic reduction of delta⁴-ketosteroids. *J. Biol. Chem.*, 234, 791-794.
- Misra, H.P. y Fridovich, I. (1971) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 247, 3170-3175.
- Moreno, F., Teschke, R. y Strohmeyer, G. (1979) Effect of thyroid hormones on the activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89, 806-810.
- Morton, S. y Mitchell, M.C. (1985) Effects of chronic ethanol feeding on glutathione turnover in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1559-1563.
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L. y Surks, M.Y. (1974) Tissue differences in the concentration of triiodo-thyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. *Endocrinology*, 95, 897-903.
- Oppenheimer, J.H. (1979) Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203, 971-979.
- Oppenheimer, J.H. (1985) Thyroid hormone action at the nuclear level. *Ann. of Internal Med.*, 102, 374-384.
- Orrenius, S. y Moldeus, P. (1984) The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.*, 5, 432-435.
- Pedersen, P.L., Greenawalt, J.W., Reynafarje, B., Hullihen, J., Decker, G.L., Soper, J.W. y Bustamante, E. (1978) Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues, en *Methods in Cell Biology*. Academic Press, Inc. N.Y., San Francisco, London. Vol 20, pp 411-481.
- Phillips, A.H. y Langdon, R.G. (1956) The influence of thyroxine and other hormones on the hepatic TPN-cytochrome c reductase activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 19, 380-382.
- Richman, P.G. y Meister, A. (1975) Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by non-allosteric feed-back inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.*, 250, 1422-1426.

- Rumbaugh, R.C., Kramer, R.G. y Colby, H.D. (1978) Dose-dependent actions of thyroxine on hepatic drug metabolism in male and female rats. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 2027-2031.
- Schwartz, H.L. y Oppenheimer, J.H. (1978) Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone. *Pharmacol. Ther.*, 3, 349-376.
- Shambaugh, G.E. (1986) Thyroid hormone action. Biologic and cellular effects, en *The thyroid, a fundamental & clinical text*. S.H. Ingbar y L.B. Braverman editores, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 5ª edición, pp 201-218.
- Sies, H. (1978) The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 Systems. *Methods Enzymol.*, 52, 48-59.
- Sies, H. y Akerboom, T.P.M. (1984) Glutathione disulfide efflux from cells and tissues. *Methods Enzymol.*, 105, 445-451.
- Sies, H. (1985) Introductory remarks, en *Oxidative stress*. H. Sies editor, Academic Press, London, pp.1-8.
- Sies, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 25, 1058-1071.
- Sir, T., Wolff, C., Soto, J.R., Pérez, G. y Armas-Merino, R. (1987) Relationship between hepatic levels of glutathione and sulphobromophthalein retention in hyperthyroidism. *Clin Sci.*, 73, 235-237.
- Sterling, K. (1979) Thyroid hormone action at the cell level. *N. Engl. J. Med.*, 300, 117-177.
- Sterling, K. (1986) Thyroid hormone action at the cellular level, en *The thyroid, a fundamental & clinical text*. S.H. Ingbar y L.B. Braverman editores, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 5ª edición, pp. 219-233.
- Szilagyi, A., Lerman, S. y Resnik, R.H. (1978) Ethanol, thyroid hormones and acute liver injury: is there a relationship? *Hepatology*, 3, 593-600.
- Tata, J.R., Ernster, L. y Lindberg, O. (1962) Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular functions. *Nature (London)*, 193, 1058-1060.
- Tate, S.S. y Meister, A. (1985) Gamma-glutamyl

- transpeptidase from kidney. *Methods Enzymol.*, 113, 400-419.
- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, 27, 502-522.
- Turrens, J.F. y Boveris, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, 191, 421-427.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A., Levitt, G.J. y Crapo, J.D. (1982a) The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.*, 217, 401-410.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A. y Crapo, J.D. (1982b) Hyperoxia increases H_2O_2 release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 217, 411-421
- Videla, L.A. y Valenzuela, A. (1982) Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic and pathological implications. *Life Sci.*, 31, 2395-2407.
- Videla, L.A., Fraga, C.G., Koch, O.R. y Boveris, A. (1983) Chemiluminescence of the in situ rat liver after acute ethanol intoxication: effect of (+)-cyanidanol-3. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 2822-2825.
- Videla, L.A. (1983) Assessment of the scavenging action of reduced glutathione, (+)-cyanidanol-3 and ethanol by the chemiluminescent response of xantine oxidase reaction. *Experientia*, 39, 500-502.
- Videla, L.A. (1984a) Hepatic antioxidant-sensitive respiration: effect of ethanol, iron and mitochondrial uncoupling. *Biochem. J.*, 223, 885-891.
- Videla, L.A. (1984b) Chemically induced antioxidant-sensitive respiration: relation to glutathione content and lipid peroxidation in the rat liver. *FEBS Lett.*, 178, 119-122.
- Videla, L.A., Sir, T. y Wolff, C. (1988) Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: suppression by propylthiouracil treatment. *Free Rad. Res. Comms.*, 5, 1-10.
- Videla, L.A. y Fernández, V. (1988) Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch. Biol. Med. Exp.*, 21, 85-92.

Wills, E.D. (1985) The role of dietary components in oxidative stress in tissues, en Oxidative stress. H. Sies editor, Academic Press, London, pp. 197-218.