



76

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“Efecto de la Adenosina en las Alteraciones  
Metabólicas del Eritrocito Inducidas por la  
Intoxicación Aguda y Crónica con Etanol  
en Rata”.**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO - BIOLOGO**

Presenta:

**LETICIA MUÑOZ GARCIA**

MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE OXIGEN**

1989.



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Generalidades sobre metabolismo del eritrocito	
-Glucólisis	3
-Ciclo del 2,3-Difosfoglicerato	7
-Ciclo de pentosas	10
-Metabolismo del glutati6n	10
-Metabolismo nucleotidico en eritrocitos	11
1.2 Aspectos generales sobre intoxicaci6n con etanol	21
1.2.1. Efectos del etanol en diferentes regiones del organismo .	
-Sistema Nervioso Central	22
-Higado	23
-P6ncreas	26
-Sistema cardiovascular	27
-Ri6n	27
-Efectos end6crinos	27
-Efectos hematopoy6ticos	28
-Sistema inmunol6gico	29
1.3. Metabolismo del etanol	30
1.3.1 Alcohol deshidrogenasa	30
1.3.2 Catalasa	31
1.3.3 Sistema microsomal de oxidaci6n del etanol (MEOS)	31

1.4	Antecedentes directos del efecto del etanol en los eritrocitos	33
1.5	Aspectos generales sobre adenosina y sus acciones en diferentes órganos	36
2.	MATERIALES Y METODOS	
2.1	Modelo Experimental	
	-Intoxicación Aguda con etanol	40
	-Intoxicación Crónica con etanol	42
2.2	Obtención de muestra	43
2.3	Métodos y fundamentos de las determinaciones de metabolitos	
	- Nucleótidos de Adenina (ATP,ADP Y AMP)	46
	- Fósforo inorganico	48
	- Lactato	49
	- Piruvato	50
	- 2,3-Difosfoglicerato	51
2.4	Cálculos	53
3.	RESULTADOS	
3.1	Optimización de técnicas	57
3.2.1.	Experimento "in vivo".Modelo de intoxicación aguda . Valores de metabolitos previos a la incubación.	66

3.2.2	Experimento "in vivo".Modelo de intoxicación aguda Valores de metabolitos después de la incubación	77
3.2.3	Experimento "in vivo".Modelo de intoxicación crónica Valores de metabolitos previos a la incubación	87
3.2.4	Experimento "in vivo".Modelo de intoxicación crónica Valores de metabolitos después de la incubación	97
3.2.5	Experimento "in vitro". Efecto del etanol y acetaldehído en el metabolismo del eritrocito	107
3.2.6	Experimento "in vivo". Intoxicación aguda con etanol. Determinación de Lactato en sangre total, plasma y eritrocitos	116
4.	D I S C U S I O N	
	Modelo Agudo	119
	Modelo Crónico	122
	Experimento "in vitro".Efecto del etanol y acetaldehído	125
	Lactato en sangre total,plasma y eritrocitos	126
5.	C O N C L U S I O N E S	128
6.	A N E X O	129
7.	B I B L I O G R A F I A	140

# i. Introducción

## R E S U M E N

Desde hace varios años ha sido de interés en el laboratorio estudiar el efecto de la adenosina durante el daño hepático causado por diversos agentes hepatotóxicos; entre ellos se encuentran el tetracloruro de carbono y el etanol, y se ha visto que la adenosina previene la formación de hígado graso y aumenta la oxidación del etanol. Por otra parte se ha encontrado que el hígado está implicado en el mantenimiento de la homeostasis energética del eritrocito, en cuanto al abastecimiento de precursores de purinas, adenina, inosina, hipoxantina; que le permita al eritrocito mantener constante su pool de nucleótidos de adenina y consecuentemente realizar adecuadamente sus funciones.

El objetivo de este estudio es conocer si la alteración del metabolismo hepático, inducida por etanol, se refleja en el metabolismo del eritrocito o si hay una influencia directa del etanol sobre el eritrocito que modifique su metabolismo.

Con este objeto se midieron los parámetros energéticos (relación ATP/ADP, carga energética y potencial de fosforilación: lactato, piruvato, 2,3-DPG, nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) y fósforo inorgánico durante la intoxicación aguda y la intoxicación crónica con etanol "in vivo" e "in vitro" incubando eritrocitos de rata normal en presencia de etanol o acetaldehído.

## GENERALIDADES SOBRE EL METABOLISMO DEL ERITROCITO.

El eritrocito maduro a diferencia de otras células y de sus precursores, carece de núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi, ribosomas o cualquier otro orgánulo subcelular; por lo tanto le es imposible sintetizar proteínas, glucógeno, lípidos y es incapaz de llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Por lo anterior su metabolismo es muy reducido, quedando limitado a:

- Glucólisis
- Ciclo de las Pentosas-Fosfato
- Ciclo del 2,3-Difosfoglicerato
- Algunas reacciones de oxidorreducción y
- Ciertos aspectos del metabolismo nucleotídico.

Estas vías metabólicas son justamente las necesarias para mantener sus necesidades energéticas durante sus 120 días de vida media celular. El eritrocito requiere esta energía para la realización del transporte iónico (sodio, potasio y cloro, fundamentalmente), para el mantenimiento del hierro hemoglobínico (en su forma divalente), de los grupos sulfhidrilo de algunas enzimas y de hemoglobina (en su forma reducida), así como para la conservación de su propia morfología celular. Por otro lado contiene fosfatos orgánicos en su mayoría (azúcares-fosfato y ATP), y gracias a la producción de 2,3-difosfoglicerato, el



eritrocito puede modular, en combinación con el pH y la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), el grado de eficiencia con que el oxígeno es cedido a los tejidos.

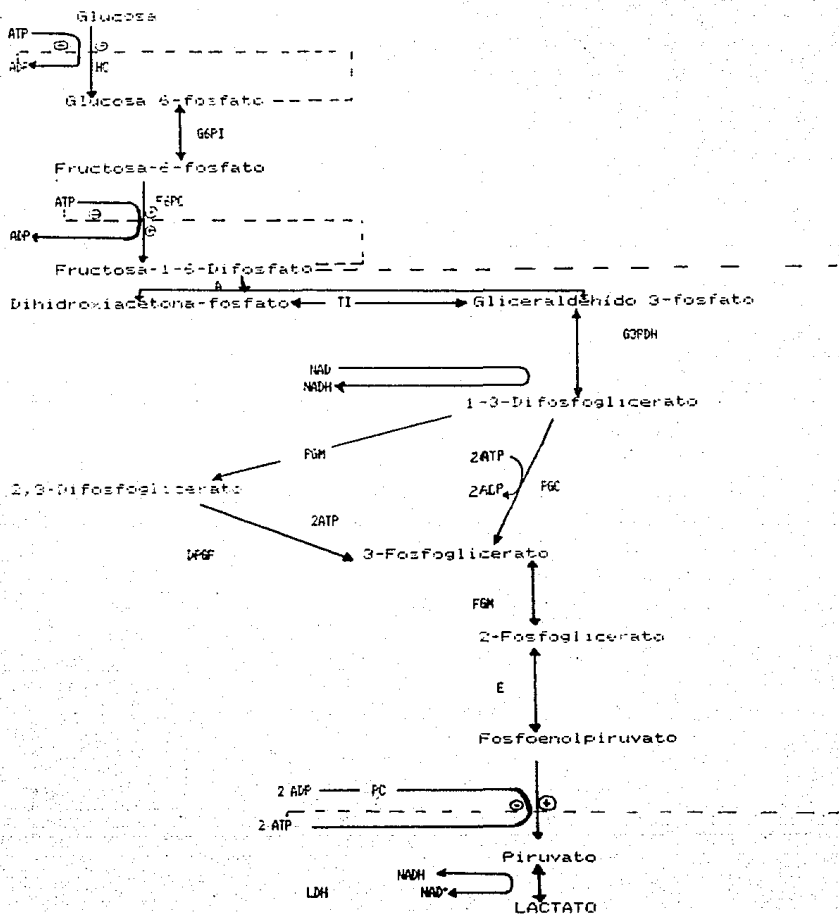
La mayor aportación de energía dentro del eritrocito la obtiene de la glucólisis, siendo esta vía importantísima para el metabolismo eritrocítico.

### GLUCOLISIS EN EL ERITROCITO

La glucólisis en eritrocitos comienza con la incorporación de monosacáridos a la célula roja, entre ellos se encuentra la manosa, la cual es convertida a manosa-6-fosfato y luego a fructosa-6-fosfato con la participación de las enzimas hexocinasa e isomerasa respectivamente. Mientras que la glucosa y la fructosa son transportadas al interior de la célula por difusión facilitada, mediante un transportador común y son fosforiladas por una hexocinasa, no específica.

La galactosa también es transportada por difusión facilitada y, una vez fosforilada a galactosa-1-fosfato, se introduce en la glicólisis convirtiéndose en glucosa-6-fosfato y de ahí se sigue toda la vía glucolítica hasta formar lactato.

Esquema general de la vía glucolítica que se lleva a cabo en el eritrocito:



**FIG.1 Glucólisis en el eritrocito.**

Donde:

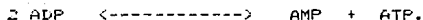
HC.- HEXOCINASA  
G6PI.- GLUCOSA-6-FOSFATO ISOMERASA  
PFC.- FOSFOFRUCTOCINASA  
A.- ALDOLASA  
TI.- TRIOSA FOSFOISOMERASA  
G3PDH.- GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA  
PGC.- FOSFOGLICERATO CINASA  
DPGM.- DISFOGLICERATO MUTASA  
PAF.- DIFOSFOGLICERATO FOSFATASA  
PGM.- FOSFOGLICERATO MUTASA  
E.- ENOLASA  
PC.- PIRUVATO CINASA  
LDH.- LACTATO DESHIDROGENASA.

La regulación de la glucólisis en el eritrocito se ejerce mediante la acción de diferentes metabolitos, sobre las tres únicas enzimas irreversibles:

- Hexocinasa (HC)
- Fosfofructocinasa (PFC)
- Piruvato cinasa (PC)

A) El efector más importante corresponde al ATP que, al sobrepasar determinados niveles, inhibe a la fosfofructocinasa y a la piruvato cinasa. Ello conlleva una disminución en la utilización de la glucosa y un aumento de

la concentración de los sustratos correspondientes a ambas enzimas, lo que ocasiona un aumento de la glucosa 6-fosfato, gracias a la reversibilidad de la fosfohexosaisomerasa. Al ser este metabolito inhibidor de la hexocinasa, se refuerza a este nivel la acción inhibitoria de la glucólisis ejercida por el ATP sobre la fosfofructocinasa. Cuando por altas concentraciones de ATP, disminuye la actividad de la fosfofructocinasa, también descenderá el nivel del producto de la reacción, la fructosa-1-6-difosfato, con lo que desaparece igualmente el efecto activador de este compuesto sobre la fosfofructocinasa, la piruvato cinasa. El efecto inhibitorio del ATP será contrarrestado y, por lo tanto, restaurada la actividad glucolítica gracias a la acción desinhibidora de determinados metabolitos frente a la inhibición de la fosfofructocinasa por el ATP (efecto alostérico positivo). Entre los efectores alostéricos destaca el AMP, resultante de la degradación del propio ATP, que tiene lugar a niveles altos del mismo mediante la intervención de la ATP-asa y la adenilato-cinasa



El descenso de los niveles de ATP hace que desaparezcan sus efectos inhibitorios directos sobre la fosfofructocinasa y la piruvato cinasa e indirectos sobre la hexocinasa.

8 Durante la oxigenación y desoxigenación de la hemoglobina, el eritrocito presenta cambios de pH.

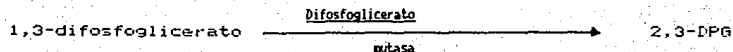


El principal punto de regulación ejercido por el pH, es a nivel de la fosfofructocinasa (3), cuya actividad responde positivamente al aumento del pH y negativamente a la disminución del mismo. Puesto que la liberación de oxígeno en tejidos supone un descenso de la concentración de iones hidrógeno ( $[\text{H}^+]$ ) en el eritrocito, es decir, un aumento del pH intracelular, ello equivale a un incremento de la actividad de la fosfofructocinasa y por tanto, de la glucólisis. (1)

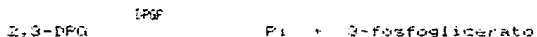
Mientras que en el proceso de oxigenación de la hemoglobina en los pulmones, aumenta la concentración de iones hidrógeno ( $[\text{H}^+]$ ), disminuye la glucólisis.

#### CICLO DEL 2,3-DIFOSFOGLICERATO.

En la glucólisis del eritrocito existe una desviación, a nivel de la 1,3-difosfoglicerato mutasa encargada de la formación del 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).



Su degradación:



Es bien conocido que los altos niveles del 2,3-DPG en el eritrocito desempeñan un papel fundamental en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por oxígeno. El control por el 2,3-DPG de la oxigenación de la hemoglobina radica en su capacidad para unirse específicamente a los residuos básicos de la cavidad existente entre las dos cadenas  $\beta$  de la desoxihemoglobina, pero no de la oxihemoglobina. Este no tiene afinidad por el 2,3-DPG, ya que, como consecuencia de la oxigenación, se produce el estrechamiento de la cavidad  $\beta$ . [1][4].

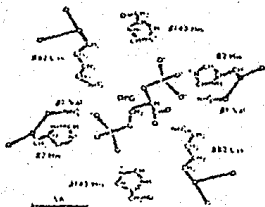
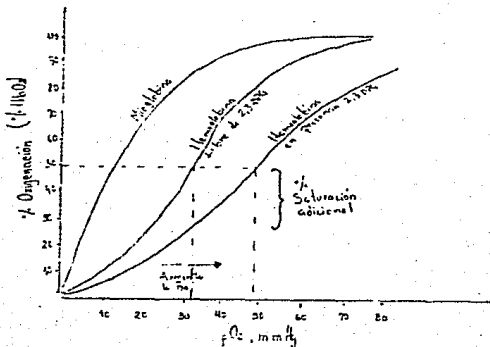


FIG.2 Estructura del lugar de unión para el 2,3-difosfoglicerato cargado negativamente en la hemoglobina humana [5].

En cierto modo, ello supone una competencia entre el 2,3-DPG y el oxígeno molecular, en el sentido de que el primero tiende a hacer prevalecer la forma no oxigenada a la cual pudo ligarse, mientras que el segundo tiende a formar oxihemoglobina con la consiguiente liberación del 2,3-DPG. El significado fisiológico del 2,3-DPG radica en su papel estabilizador de la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. En su ausencia, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno sería tan grande que prácticamente no habría liberación del gas al pasar la sangre por los capilares tisulares. La presencia del fosfato supone un descenso de la afinidad  $Hb-O_2$  y, por lo tanto, una mayor facilidad para liberar el oxígeno en tejidos. Ello se traduce en un desplazamiento hacia la derecha de la curva de oxigenación de la hemoglobina.



**FIG. 3. INFLUENCIA DEL 2,3-DPG SOBRE LA CURVA DE OXIGENACION DE LA HEMOGLOBINA.**

## CICLO DE LAS PENTOSAS

La glucosa degradada por esta vía en el eritrocito supone un 5-10 % del total degradado por vía glucolítica.

El producto más importante originado por esta vía es el NADPH.

El poder reductor que se genera por esta vía es utilizado por el eritrocito para contrarrestar los procesos de oxidación, mediante la reducción del glutatión oxidado (GS<sub>2</sub>) y la reducción de la metanemoglobina (Fe<sup>3+</sup>) a hemoglobina (Fe<sup>2+</sup>) [1].

## METABOLISMO DEL GLUTATIÓN

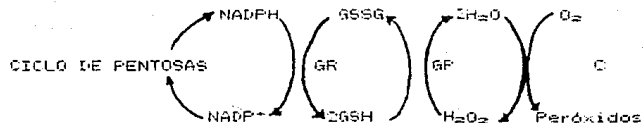
El glutatión (glutamil-cisteinil-glicina) se encuentra en eritrocitos a una elevada concentración (3mmol/L), con predominio de la forma reducida (99.5%). Se biosintetiza a partir del ácido glutámico.

Las funciones del glutatión reducido dentro del eritrocito son:

- 1.- Proteger de la oxidación a los grupos -SH de los residuos cisteína de las proteínas.
- 2.- Proteger al eritrocito de la presencia del agua oxigenada y peróxidos diversos.
- 3.- Es posible que el glutatión reducido también contribuya



al mantenimiento en estado férrico del hierro hemoglobinico.



Donde:

GR. - GLUTATION REDUCTASA

GP. - GLUTATION PEROXIDASA

C. - CATALASA

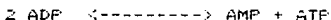
[1]

#### METABOLISMO NUCLEOTIDICO EN ERITROCITOS

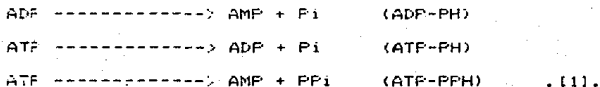
El eritrocito no puede llevar a cabo la síntesis de nucleótidos de las bases púricas o pirimidínicas y como se requieren estas púricas como punto de partida para la síntesis de mononucleótidos, es evidente la necesidad que tiene esta célula de una recuperación de las bases preformadas presentes en el plasma sanguíneo; como tales, o bajo la forma de nucleósidos (adenosina o inosina) [3]. El hígado es el órgano que abastece los precursores de purina, que la célula transformará en AMP y ADP, que son moléculasceptoras de energía producida por la actividad metabólica; por ello, funciona como donador de sustancias energéticas, para los tejidos periféricos. [3] [6] [7] [8].

Estos compuestos adquieren así en el eritrocito un papel relevante no sólo como intermediarios en la degradación sino también para la biosíntesis de mononucleótidos por vía directa, la cual parte de la adenina para dar lugar al mononucleótido correspondiente (AMP). De la incorporación de bases y nucleósidos al interior del eritrocito, dependerá su concentración en el interior de éste.

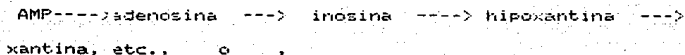
El recambio de nucleótidos de adenina (entre AMP, ADP y ATP, por ejemplo) se realiza en eritrocitos a través de la enzima adenilato cinasa (AC), que cataliza la reacción:



y se convierte así en la enzima determinante de la constancia del nivel del ATP (alrededor de 1 mmol/L) en el eritrocito humano. A ello contribuyen igualmente las reacciones de hidrólisis:



La degradación puede realizarse vía:



por el contrario, vía desaminación del nucleótido:

AMP → IMP → inosina → hipoxantina, etc.

( Fig. 4.)

Pero parece ser que la que predomina es la primera. Ello supone la formación de la ribosa-1-fosfato y por lo tanto supone un aporte energético complementario para la célula, al poder ser reintegrada la vía ciclo de las pentosas a la glucólisis; o ser reutilizada para originar el PRPP necesario para la biosíntesis "directa" de mononucleótidos. (A partir de la base púrica para dar el mononucleótido correspondiente). [1]

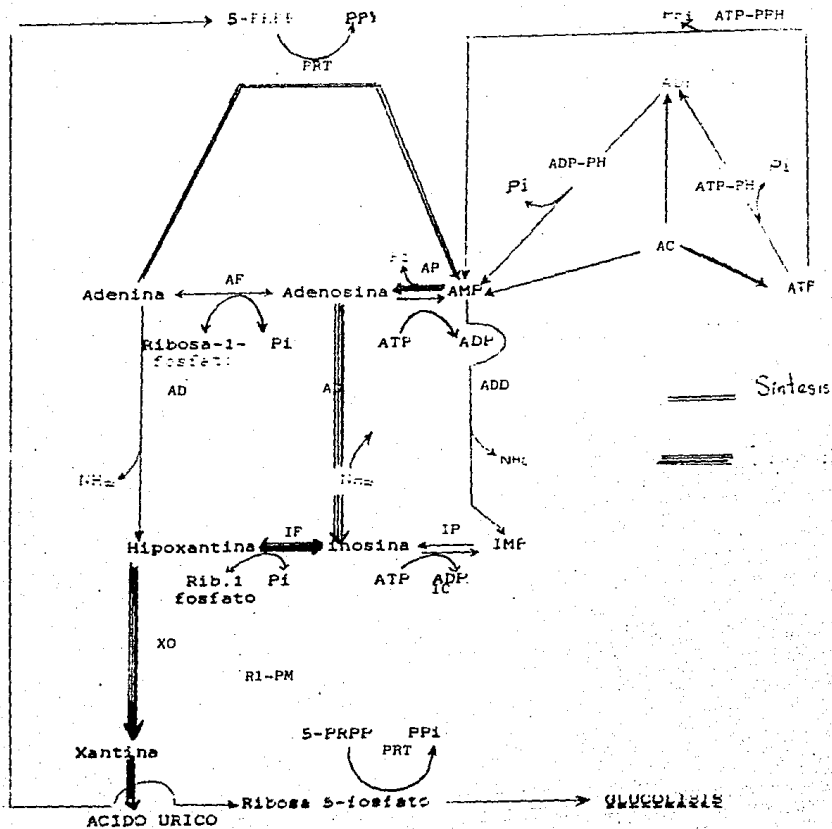


FIG. 2 METABOLISM IN THE PURINE PATHWAY

Da donde:

PRT. FOSFORRIBOSIL TRANSFERASA  
AF . ADENOSINA FOSFORILASA  
IF . INOSINA FOSFORILASA  
AC . ADENOSINA CINASA  
IC . INOSINA CINASA  
AD . ADENOSINA DESAMINASA  
ADD. ADENILICO DESAMINASA  
AP . ADENILICO FOSFATASA  
IP . INOSINICO FOSFATASA  
R1-PM. RIBOSA-1-FOSFATO MUTASA  
AC . ADENILICO QUINASA  
ADP-PH. ADP-FOSFOHIDROLASA  
ATP-PH. ATP FOSFOHIDROLASA  
ATP-PPH . ATP PIROFOSFOHIDROLASA  
5-PPPP. 5-FOSFORRIBOSILPIROFOSFATO

METABOLISMO DEL ERITROCITO

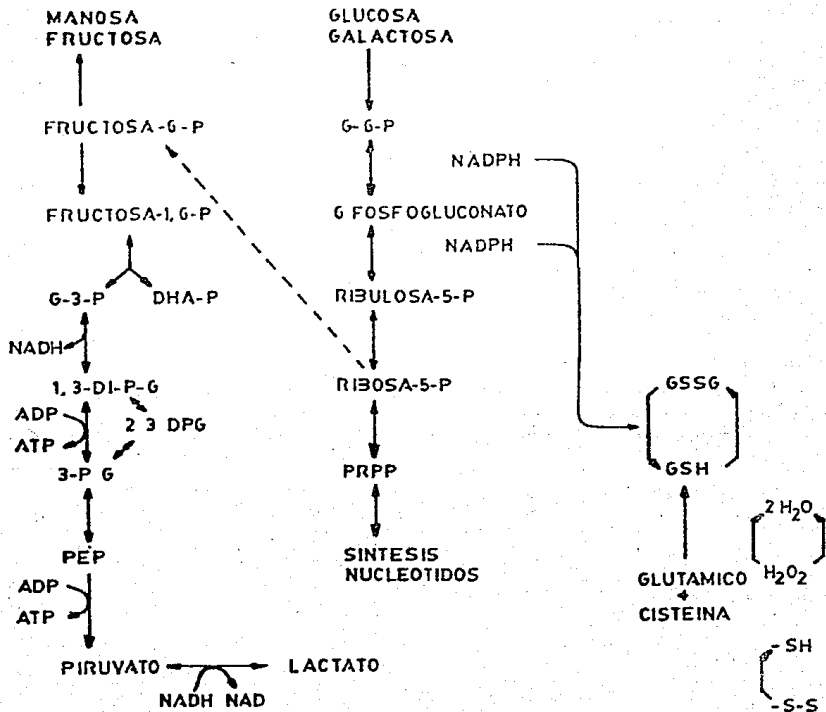


FIG. 5. METABOLISMO DEL ERITROCITO.

La intoxicación aguda y crónica con etanol es una de las afecciones de mayor trascendencia dentro de las patologías del hígado, el cual abastece de precursores energéticos al eritrocito . El equilibrio energético del hígado se ve afectado por el etanol, por lo que es de nuestro interés estudiar que tanto se afecta el metabolismo del eritrocito con este tipo de hepatotoxicidad.

El hígado es irrigado por la sangre procedente del aparato digestivo, bazo y páncreas por vía venosa y del corazón por vía arterial. Este órgano es de importancia vital, debido a que realiza algunas funciones que ningún otro órgano puede hacer, entre las más importantes tenemos:

FUNCIÓN	METABOLITOS
-Distribución de nutrientes Recibe, procesa y distribuye	Monosacáridos, aminoácidos, grasa.
-Donador de sustancias energéticas para los tejidos periféricos.	Glucosa y cuerpos cetónicos: acetoacetato y $\beta$ -hidroxibutirato
-Sintetiza proteínas	Para su funcionamiento y las plasmáticas.
-Síntesis de ácidos biliares	
-Eliminación de compuestos tóxicos del metabolismo.	Amonio (ciclo de urea), exceso lactato.
-Donador de precursores de nucleótidos de adenina hacia los tejidos periféricos .	Adenosina, adenina, ADP, AMP .

El objetivo principal de este trabajo se basa en la interrelación metabólica existente entre el hígado y los tejidos, siendo de gran importancia la vía de comunicación entre ellos: LA SANGRE, la cual nos va a reflejar el estado fisiológico y patológico de los tejidos y en este caso del hígado. (5).

La función de la sangre relacionada con la comunicación entre los tejidos está basada principalmente en el transporte de metabolitos:

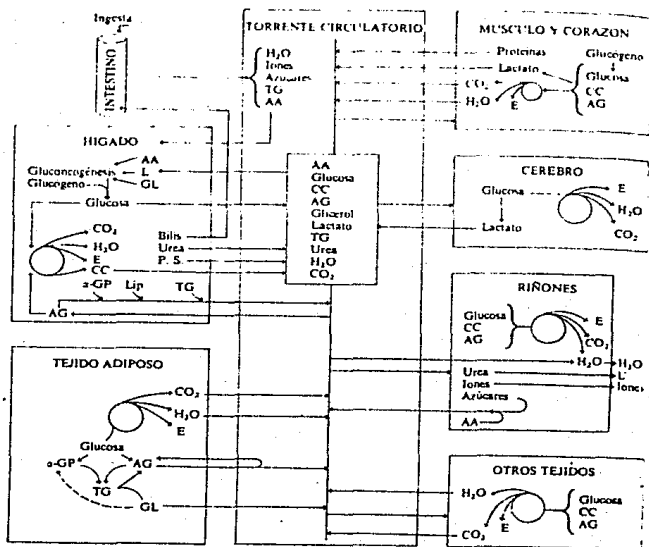
F U N C I O N	M E T A B O L I T O S .
-Transporte de nutrientes para abastecer procesos anabólicos celulares.	Nutrientes exógenos, endógenos y oxígeno a los tejidos.
-Transporte de productos de catabolismo celular	Agua, CO <sub>2</sub> , Urea, Acido Úrico Creatinina, etc.
-Transporte de sustancias coordinadoras del metabolismo de los tejidos.	Hormonas y otros mensajeros químicos.

Considerando la trascendencia y multiplicidad de las funciones desempeñadas por el hígado se puede comprender la diversidad de alteraciones metabólicas observadas en los procesos patológicos del hígado y que se ven reflejadas en la sangre (1,6).

De los aspectos que más nos interesan en este trabajo son aquellos que se relacionan con la intoxicación crónica y aguda con etanol, siendo que éste se metaboliza en el hígado y



además por el hecho de que una ingesta excesiva y prolongada de etanol produce una variedad de cambios metabólicos y alteraciones estructurales en el hígado.



**FIG.6 APORTE METABOLICO DE LOS DISTINTOS TEJIDOS.**  
 Abreviaturas: TG=Triacilglicéridos, AA=aminoácidos, E=energía, CC=cuerpos cetónicos, AG= ácidos grasos,  $\alpha$ -GP=alfa-glicerolfosfato, L=lactato, U=urea, P.S.=Proteínas séricas, GL= glicerol, Lip=lípidos. (Esquema tomado del Herrera E.P., BIOQUIMICA, pp.1183)

## ASPECTOS GENERALES SOBRE LA INTOXICACION CON ETANOL

El alcoholismo representa uno de los problemas de salud y socioeconómicos más importantes en el mundo entero. Un alcoholizado es usualmente una persona que consume una cantidad de etanol (alcohol etílico), capaz de producir alteraciones patológicas. La cantidad de etanol capaz de producir enfermedad es variable y depende de diversos factores que incluyen predisposición genética, malnutrición e infección viral hepática concomitante (hepatitis viral). [11]

En los seres humanos, el alcohol es principalmente un compuesto exógeno consumido en forma de bebidas alcohólicas y absorbido rápidamente en todo el tracto gastrointestinal. El alcohol ingerido se absorbe en el esófago, intestino delgado y colon. Aproximadamente del 90 al 95% de la cantidad total es absorbido y oxidado completamente, mientras que el resto del (2 al 10%) es eliminado primeramente a través del riñón y pulmones; una cantidad muy pequeña es excretada en la bilis, sudor, lágrimas, saliva y jugo gástrico.

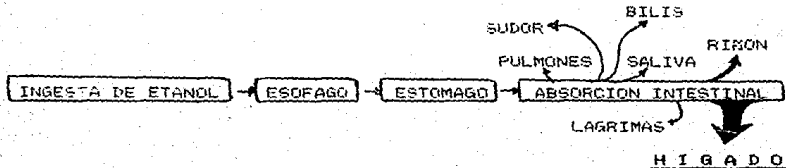


FIG.7 Esquema de absorción de etanol a través del tracto gastrointestinal y su distribución en el cuerpo.

## EFECCIOS DEL ETANOL EN DIFERENTES REGIONES DEL ORGANISMO

El alcohol etílico es un tóxico directo, produce lesiones en todos los tejidos según sea la dosis ingerida y la duración de la acción del alcohol. El grado de las lesiones varía en los diferentes sistemas orgánicos.

### -SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El efecto es siempre una depresión primaria de los centros principales y después se extiende a los mecanismos más vegetativos según se incrementa el porcentaje de alcohol en el sistema nervioso central. La idea común de que el alcohol es un estimulante es debido a su poder de disminuir las inhibiciones que entonces causan conductas impulsivas.

Entre los efectos más importantes del etanol sobre el sistema nervioso central tenemos los siguientes:

1. Efecto en la visión.
2. Incoordinación muscular.
3. Tiempo de reacción alargado.
4. Euforia.
5. Eliminación de inhibiciones.

Estas alteraciones funcionales usualmente son reversibles.

Algunos síntomas frecuentemente irreversibles que están asociados con la ingestión alcohólica prolongada y constante y, en la mayoría de los casos, con deficiencias

nutricionales. incluyen :

6.- El síndrome de Wernicke-Korsakoff, neuropatía periférica, ambliopía (pérdida de la visión), degeneración cerebelar y cerebral y demencia progresiva con desmielinización del cuerpo calloso.

b). HIGADO.-

El hígado es el órgano en el cual el alcohol es metabolizado y ejerce una acción más prolongada; por lo tanto, la incidencia y la severidad de las lesiones son más importantes en el hígado.

-La producción de daño hepático alcohólico estaría determinada por factores nutricionales, genéticos y sexuales, dosis y periodo de ingesta alcohólica, el fenómeno de la autoinmunidad, la hepatomegalia, variaciones del flujo sanguíneo hepático y alteraciones metabólicas. No todos ellos se presentan simultáneamente ni en la misma cuantía, la hepatotoxicidad del etanol se manifiesta de diversas formas.

Se ha postulado que la necrosis hepática inducida por el alcohol podría ser la consecuencia de :

- Diversas acciones tóxicas ejercidas directamente por el acetaldehído (17,15)

-La producción de un estado hipermetabólico asociado a un mayor consumo de oxígeno hepático e hipoxia centrolobulillar.

La estimulación de procesos lipoperoxidativos asociados a una disminución de los sistemas de defensa antioxidantes. [12].

Se pueden desarrollar tres tipos de patología hepática:

- La forma leve se caracteriza por una infiltración grasa (Hígado graso alcohólico) y por un grado mínimo de inflamación y necrosis.

- En casos de hígado graso más severos, puede observarse la aparición de un proceso fibrótico, especialmente alrededor de los conductos venosos centrales. Clínicamente se manifiesta por hepatomegalia, dolor durante la palpación de la zona hepática y anorexia. Existen alteraciones bioquímicas como son elevaciones leves de la aspartato amino transferasa (AST), bilirrubina y fosfatasa alcalina. El hígado graso alcohólico es considerado un cuadro benigno y reversible.

- La forma de lesión tóxica más severa, la hepatitis alcohólica, se caracteriza por una degeneración grasa con hepatomegalia, inflamación y necrosis importantes, la fibrosis es un rasgo prominente.

La fase final de la enfermedad hepática alcohólica crónica se manifiesta por el desarrollo de una cirrosis con una fibrosis hepática extensiva, regeneración nodular,

distorsión de la arquitectura hepática y finalmente insuficiencia hepática y muerte del paciente.

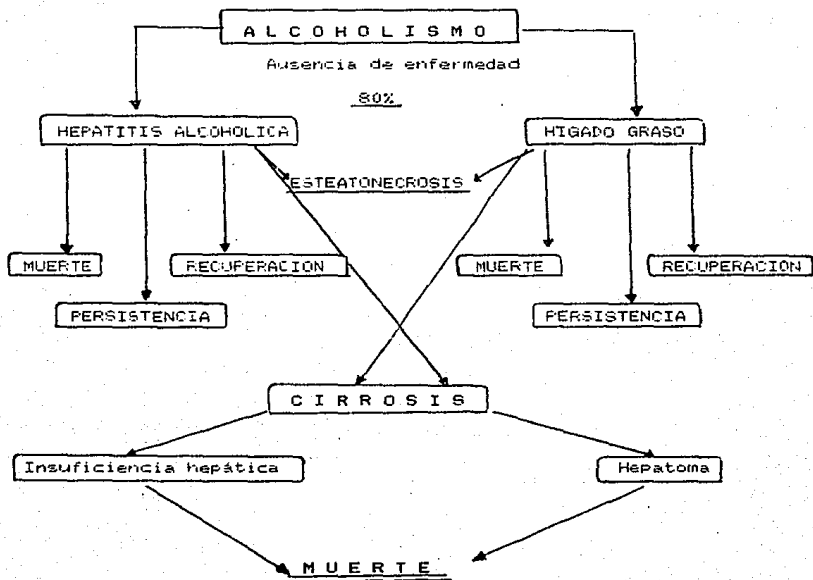


FIG.8. ENFERMEDAD HEPATICA ALCOHOLICA.

Tomada de :Química Clínica . Lawrence A.Kaplan.  
Ed. Panamericana (1984).Argentina,Buenos Aires.

En el hígado, debido a la ingesta de etanol, se pueden promover alteraciones bioquímicas del metabolismo de los lípidos, proteínas e hidratos de carbono.

Se ha observado una acumulación de proteínas (glucoproteínas y alfa-fetoproteínas), la cual se produce concomitantemente con la acumulación de grasas, contribuye al desarrollo de la hepatomegalia. [15].

La gluconeogénesis se encuentra alterada de modo similar por el etanol a través de diversas vías.

Hay una disminución en el almacenamiento de glucógeno en el hígado, resultado de una ingestión disminuida y de la enfermedad hepática asociada frecuentemente con el alcoholismo crónico (hígado graso, hepatitis alcohólica, cirrosis alcohólica).

En ausencia de enfermedad hepática, malnutrición u otras condiciones predisponentes, el etanol propiamente dicho, provoca un incremento leve de la glucosa sanguínea.

#### c). PÁNCREAS.

La ingestión de alcohol lleva como consecuencia a un cuadro de mala absorción y crisis dolorosas. Aparte de esto, hay destrucción de las células secretoras de enzimas y también de las secretoras de insulina y glucagón. Cuando ocurre esto, el paciente desarrollará una diabetes



mellitus insulino-dependiente. Debido a que también ha disminuido el nivel de glucagon y ya no es suficiente como para estimular la síntesis de glucosa, estos pacientes son lábiles y propensos a padecer crisis de hipoglucemia.

#### d). SISTEMA CARDIOVASCULAR.-

Cantidades moderadas de alcohol causan dilatación considerable de los vasos sanguíneos de la piel, produciendo una sensación de calor. El consumo crónico de alcohol es uno de los principales causantes de una gran variedad de anomalías cardiovasculares, entre ellas la hipertensión. La causa por la cual el alcohol produce hipertensión sanguínea, es la disminución en la excreción urinaria de iones sodio y un aumento en el volumen plasmático. [13].

#### e). RINON.-

El consumo de alcohol es generalmente seguido de un incremento en el volumen de orina de relativa acidez alta. Esta acción es un resultado de una depresión del sistema nervioso central y no es debida a un efecto directo sobre el riñón.

#### f) EFECTOS ENDOCRINOS.-

El consumo moderado de alcohol ejerce un efecto de escasa magnitud sobre la liberación adrenal de cortisol. Sin embargo, la presencia de un nivel sanguíneo de alcohol

superior a 1 g/l puede generar una elevación de los niveles plasmáticos de cortisol. Algunos alcohólicos muestran indicios de una insuficiencia hipofisiaria. La disminución de glucosa en sangre produce una elevación de cortisol plasmático. Esta respuesta se encuentra disminuida o ausente en un 25% de alcohólicos crónicos debido que la hipófisis no segrega una cantidad suficiente de hormona adenotrópica como para estimular la glándula adrenal. Otro indicio de la insuficiencia hipofisiaria serían los niveles bajos de hormona de crecimiento y de prolactina después de una estimulación a través de un descenso de la glucosa en sangre.

#### g) EFECTOS HEMATOPOYETICOS.-

Los efectos del alcohol sobre la sangre y la médula ósea son el resultado de una acción directa tóxica y de las deficiencias nutricionales asociadas. Los alcohólicos muestran niveles sanguíneos reducidos de folato debido a que el alcohol inhibe directamente el metabolismo de éste. La absorción de la vitamina B<sub>12</sub> también es inhibida por el alcohol. El exceso de alcohol, puede provocar la aparición de una anemia hemolítica aguda. El alcohol también es capaz de alterar la función de leucocitos y la cirrosis alcohólica se acompaña de una disfunción plaquetaria la que puede conducir a la aparición de infecciones y diabetes hemorrágicas.

#### h). SISTEMA INMUNOLOGICO.-

En los pacientes con enfermedad hepática alcohólica hay un incremento de anticuerpos y células B circulantes; en pacientes con hepatitis alcohólica crónica, frecuentemente hay elevación de la IgA. Existe una disminución del número total de células T, porque su capacidad de sintetizar DNA se encuentra disminuida, por lo que su respuesta ante antígenos mitógenos, está suprimida y sus propiedades citotóxicas están aumentadas (respuesta alterada a las vacunas, mayor susceptibilidad a las infecciones, disminución del recuento linfocitario).

#### i). ALTERACIONES NUTRICIONALES ASOCIADAS CON EL ALCOHOLISMO.

La malnutrición en la forma de la deficiencia calorico-proteica es el resultado de diversas causas:

- a) Ingestión dietaria reducida.
- b) Mala absorción de las sustancias ingeridas.
- c) Alteración de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos.

Las formas más graves de enfermedad hepática están asociadas con una malnutrición severa, es posible que se desarrolle una lesión hepática en ausencia de malnutrición. Aunque las necesidades calóricas del alcohólico se encuentren satisfechas por las calorías que aporta el alcohol en sí, este tipo de calorías no son nutritivas

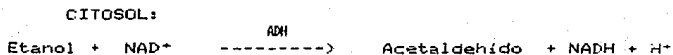
y pueden llevar a los alcohólicos a sufrir una malnutrición primaria, ya que se encuentran disminuidos otros nutrientes como son las proteínas. [11.15].

### METABOLISMO DEL ETANOL.

La mayor parte del alcohol absorbido es degradado por medio de procesos oxidativos, principalmente en el higado, para formar en primer lugar acetaldehído y luego acetato. El acetato libre, el producto final principal de la oxidación del etanol en el hígado, deja el hígado y es metabolizado en otros tejidos. La oxidación ocurre en dos etapas, etanol a acetaldehído y acetaldehído a acetato.

En el metabolismo del etanol están involucrados tres sistemas enzimáticos, principalmente:

1.- La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH); que está presente en todos los vertebrados que se han estudiado. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Y en la mitocondria se lleva a cabo la conversión de :

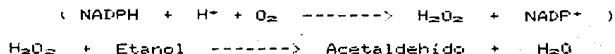


Este sistema enzimático es llevado a cabo cuando se presenta el etanol a bajas concentraciones.

Para mantener la oxidación del etanol a acetaldehído de manera eficiente, es necesario remover los dos productos: NADH y acetaldehído.

A altas concentraciones, arriba de 20 mmol/L, la oxidación puede ser por medio de la catalasa y el MEOS (Sistema de Oxidación Microsomal del Etanol).

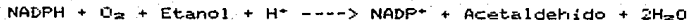
2.- Catalasa.- Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del etanol bajo condiciones en las cuales exista un sistema regenerador del peróxido de hidrógeno, por lo cual contribuye con no más de 2 % de la oxidación del etanol "in vivo". La reacción es la siguiente:



### 3.- MEOS (Sistema de Oxidación Microsomal del Etanol).-

El MEOS representa un sistema enzimático secundario en la depuración del etanol. Se considera importante dentro del modelo crónico de ingesta del etanol, ya que es un sistema inducible bajo estas condiciones debido a la elevada concentración de etanol que se presenta en ese caso.

Bajo este sistema, la reacción que cataliza la oxidación del etanol es la que se indica a continuación :



El MEOS y la vía de la catalasa, pueden disminuir la necesidad de transferir equivalentes reductores dentro de la mitocondria. Ya que la coenzima usada en estos procesos es la NADPH, se requiere un mecanismo de transhidrogenación del NADH al NADP<sup>+</sup>. Una posibilidad es la que se muestra en la figura siguiente, en donde la enzima málica está involucrada :

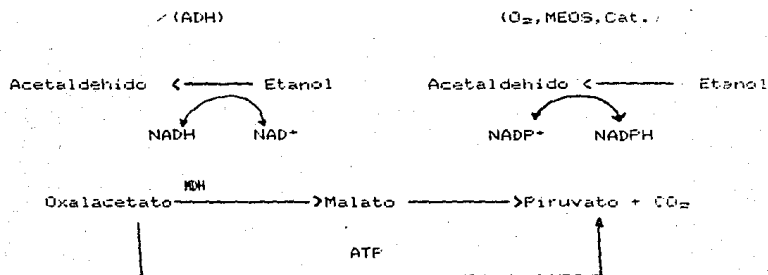


FIG. 9. Oxidación simultánea del etanol por ADH (NAD<sup>+</sup>) y vías que requieren NADH. Si las dos reacciones suceden simultáneamente no habría un transporte neto de equivalentes reductores de la mitocondria o hacia ella.

Esta transhidrogenación requiere del gasto de una molécula de ATP para la carboxilación del piruvato. [15].

## ANTECEDENTES DIRECTOS DEL EFECTO DEL ALCOHOL EN LOS

### ERITROCITOS.

Una condición comúnmente asociada con el alcoholismo es la anemia. Esta puede estar producida por muchos efectos relacionados con el alcohol que pueden preceder al daño hepático como las hemorragias debidas a gastritis alcohólica o problemas nutricionales.

Una distribución ineficiente de oxígeno también puede ocurrir en alcoholicos debido a "anemias funcionales", es decir, alteraciones en donde la curva de disociación del oxígeno de la hemoglobina está desplazada hacia la derecha. Uno de los tipos de anemia funcional ocurre en la alcalosis, una condición que se da en los alcohólicos causada por una discontinuidad en la ingestión de etanol, y esto es debido al aumento en la actividad respiratoria que acompaña al síndrome de abstinencia (alcalosis respiratoria).

Otro tipo diferente de anemia funcional se puede relacionar al hecho de que se han observado bajos niveles de ATP y 2,3-DPG (ambos modificadores alostéricos de la curva de disociación de la hemoglobina) en glóbulos rojos de alcohólicos malnutridos en donde sus niveles de fosfato en plasma están reducidos. [19].

Debido a los múltiples trastornos que ocasiona la ingestión crónica y aguda de etanol sobre el sistema hematopoyético, es de vital importancia tener en cuenta

los efectos que causa el etanol directamente sobre los eritrocitos circulantes, ya que éstos ejercen una acción importantísima para todo el cuerpo: la del transporte de oxígeno a todos los tejidos.

Los múltiples efectos patológicos del etanol sobre el tejido hematopoyético se pueden dividir en tres categorías:

- 1.- Aquellos resultantes de los efectos directos del etanol.
- 2.- Aquellos resultantes de una deficiencia nutricional y
- 3.- Los causados por alguna enfermedad hepática.

Estos efectos involucran tanto glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas como otros factores hemostáticos.

#### 1.- Efectos directos del etanol.

La ingestión aguda causa una eritropoyesis reducida con disminución en la celularidad de la médula, produciendo vacuolización en los precursores de glóbulos rojos, siendo ésta múltiple, en el citosol y en el núcleo.

Otro de los efectos que ejerce el alcohol en los eritrocitos es en cuanto a su hemostasis. La hemostasis normal depende de una interacción compleja entre plaquetas y un grupo de proteínas plasmáticas específicas (factores de coagulación), que resultan en la formación de la precipitación de un polímero de fibrina y por medio de un agente fibrinolítico (plasmina), la fibrina es degradada naturalmente.



La ingestión aguda con etanol ,causa los siguientes efectos:

- Trombocitopenia. Se reduce la producción y la vida media de las plaquetas, además muestran una respuesta deficiente a los agentes agregantes (ADP,epinefrina).
- Un aumento del tiempo de sangrado.

La ingestión crónica de alcohol, sin que se encuentre presente cirrosis hepática, produce los siguientes defectos de la hemostasis:

-Hay trombocitopenia acompañada de una deficiencia de ácido fólico y frecuentemente los pacientes muestran un sangrado significativo, con aparición de petequias.

Durante el alcoholismo crónico asociado con cirrosis hepática, podemos observar una trombocitopenia acompañada de una deficiencia de ácido fólico y una disminución de los factores de coagulación (excepto el factor VIII) .[16].

En el laboratorio se ha trabajado mucho sobre los efectos que causa la adenosina en la intoxicación con tetracloruro de carbono y etanol, en el metabolismo del hígado, se ha encontrado, entre otras cosas, que la administración de adenosina previene la formación de hígado graso, aumenta la oxidación del etanol y estimula varias vías sintéticas, además de que aumenta los niveles de nucleótidos de adenina y los parámetros energéticos en sangre de ratas tratadas con adenosina [6].Por lo que resulta interesante , ver los

efectos de la adenosina en el metabolismo del eritrocito durante la administración crónica y aguda con etanol a la que se sometieron a las ratas.

### ASPECTOS GENERALES SOBRE ADENOSINA

La adenosina es la 6-amino-9-D-ribofuranosil-9 purina, un nucleósido formado por ADENINA Y RIBOSA. Es una molécula precursora de nucleótidos como el AMP, ADP y ATP, indispensables en el metabolismo energético y en la constitución de coenzimas y de material genético.

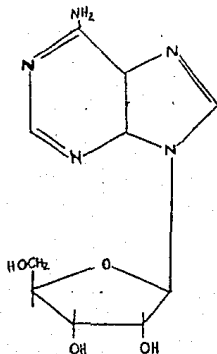
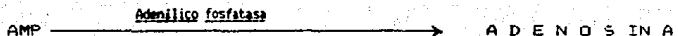


FIG. 10 . ESTRUCTURA DE LA ADENOSINA

La adenosina es transportada a las células por difusión facilitada y puede ser sintetizada por las células a partir de:



o por una 5'nucleotidasa específica o también por la degradación de :

S-adenosil homocisteína por la S-adenosil - homocistein hidrolasa.

Algunos tejidos como el miocardio y tejido adiposo son capaces de liberar adenosina.

La adenosina ejerce múltiples acciones sobre diferentes órganos, principalmente:

1.- Efectos neuronales .- La adenosina y ATP tienen efectos depresores sobre el Sistema Nervioso Periférico [21]

2.- Efectos cardiovasculares .- En condiciones de hipoxia el corazón muestra una reducción en la resistencia vascular coronaria asociada con un incremento en la liberación de adenosina. La adenosina está implicada en la regulación local del flujo sanguíneo coronario originando así vasodilatación. [22].

3.- Efectos sobre acciones hormonales .- La adenosina estimula la esteroidogénesis en las glándulas adrenales y células de Leyding así como la secreción de glucagon [23] y hormona del crecimiento [22] mientras que inhibe la liberación de insulina por estímulo con glucosa " in vivo " : Bajo condiciones de ayuno la adenosina produce una hiperglicemia que no es atribuible a cambios en la

secreción ni de insulina ni de glucagón. La administración de adenosina altera la secreción de hormonas por los islotes de Langerhans (aumenta la liberación de glucagón y disminuye la secreción de insulina). [20,23]

4.- Efectos citotóxicos.- principalmente se deben a que la adenosina inhibe la síntesis de pirimidinas, además de que tiene efectos que impiden o dificultan la respuesta inmune [24].

5.- Acciones bioquímicas.- entre algunas de las acciones bioquímicas de la adenosina se pueden mencionar las siguientes:

a) Disminución de la lipogénesis hepática.-

-La adenosina produce una disminución de triacilglicérols hepáticos en la formación de lípidos [25].

-El nucleósido revierte el hígado graso inducido por intoxicación con etanol, [26], tetracloruro de carbono [27] y cicloheximida [28], sin afectar la inhibición de síntesis de proteínas producidas por los dos últimos. La adenosina previene el hígado graso por limitar la disponibilidad de los precursores para la síntesis de triacilglicérols: alfa-glicerol fosfato y acil-CoA. [29].

b) En hígado deprime "in vivo" e "in vitro" la oxidación de cadenas de ácidos grasos. [30]. reflejando este efecto por una disminución en la cantidad de cuerpos cetónicos en la

sangre.

c) Aumenta la lipogénesis en el tejido adiposo del epididimo. El nucleósido produce un incremento de 5 veces en la incorporación de glucosa marcada en la grasa epididimal. [31].

d) El nucleósido es capaz de cambiar el patrón metabólico inducido por intoxicación aguda con etanol ya que la adenosina parcialmente previene y revierte la formación de hígado graso inducido por etanol y aumenta el aclaramiento de etanol de la sangre; ambos efectos están relacionados por el factor de que el nucleósido mejora la reducción en la relación  $NAD^+/NADH$  mitocondrial producido por el metabolismo del etanol. [32]

e) El patrón metabólico que se observa en presencia de la adenosina se caracteriza por una tendencia a incrementar los procesos anabólicos como la síntesis de glucógeno y disminuir los catabólicos como la oxidación hepática de ácidos grasos, lo que nos conduce a la conclusión que por un mecanismo aún no muy claro, la adenosina cambia el patrón metabólico de animal ayunado a uno de animal alimentado. Probablemente el eje alrededor del cual gira este cambio, sea el aumento de la carga energética que se sabe favorece secuencias anabólicas e inhibe las catabólicas. [33].

f) Aumenta los parámetros energéticos (ATP/ADP, carga energética) en células hepáticas [27].

**2. Materiales**

**y**

**Metodos**

## MATERIALES Y METODOS.

### MODELO EXPERIMENTAL:

Se estudiaron dos modelos experimentales:

- a. Intoxicación aguda con etanol
- b. Intoxicación crónica con etanol.

### INTOXICACION AGUDA CON ETANOL

Se trabajó con ratas macho cepa Wistar de peso aproximado de 180-200 g. a las que se les puso en ayunas de 18-20 h. antes del experimento.

Se trabajó con 5 grupos de ratas, de acuerdo al tipo de tratamiento que se les administró:

- 1) GLUCOSA-SALINA
- 2) GLUCOSA-ADENOSINA
- 3) ETANOL-SALINA
- 4) ETANOL-ADENOSINA
- 5) GRUPO DE RATAS INTACTAS

1) Grupo Glucosa-Salina.- Es un grupo control, en el cual a la ratita se le administró glucosa por medio de una sonda gástrica. inmediatamente después se les inyectó por vía intraperitoneal solución salina isotónica. (SSI).

2) Grupo Glucosa-Adenosina.-Es un grupo control de adenosina. se les administra por sonda gástrica una carga

isocalórica de glucosa con el etanol : por vía intraperitoneal se le administró una suspensión de adenosina

3) Grupo Etanol-Salina. - A este grupo de ratas se le administró por medio de una sonda gástrica una dosis de etanol al 63 % y por vía intraperitoneal se les inyectó solución salina isotónica.

4) Grupo Etanol-Adenosina. - se le administró por medio de sonda gástrica una solución de etanol al 63 % y por vía intraperitoneal una suspensión de adenosina .

5) Grupo de ratas intactas. - Corresponde el grupo control, al cual no se le dio ningún tipo de tratamiento.

Los animales fueron sacrificados por decapitación después de 2 horas de tratamiento, obteniéndose sangre heparinizada. El tiempo de tratamiento y las dosis empleadas en la administración de etanol y adenosina son equivalentes a las que se han manejado en el laboratorio anteriormente. (36,37)

#### Dosis de sustancias utilizadas para el tratamiento

- Glucosa.- Dosis isocalórica con el etanol. 9.3 g/Kg.peso.
- Etanol.- 5 g./Kg. de peso en solución al 63% (p/p)
- Adenosina.- Disuelta en solución salina ajustada a pH 7.4  
200 mg /Kg peso
- Solución salina isotónica (1 ml /100 g de peso) .



## INTOXICACION CRONICA CON ETANOL

En este modelo se trabajó con 4 grupos de ratas :

I. ALCOHOL-ADENOSINA

II. ALCOHOL-SALINA

III. AGUA-ADENOSINA

IV. AGUA-SALINA

Se trabajó con ratas macho cepa Wistar, de un peso aproximado de 125g (100-150 g ).A las cuales se les mantuvo en luz/obscuridad 12/12 h. durante todo el tiempo de tratamiento, que fue aproximadamente de 2 meses.

A las ratas de los grupos de alcohol, se les dio este por vía oral, en los bebederos , a diferentes concentraciones de acuerdo al siguiente esquema:

Etanol 10%	10 días
Etanol 12%	10 "
Etanol 14%	8 "
Etanol 16%	8 "
Etanol 18%	8 "
Etanol 20%	8 "
Etanol 22%	8 "

Las ratas que forman los dos grupos restantes, simplemente se les dio a beber agua en los bebederos.En cuanto a la alimentación que se les daba, fué la misma para los cuatro grupos .

Al término del tratamiento con etanol, se procedió a la administración de adenosina y solución salina, por vía intraperitoneal a las concentraciones mencionadas en el modelo de intoxicación aguda. El tiempo de tratamiento con estas dos sustancias fue de dos horas antes del experimento, después las ratas fueron sacrificadas por decapitación obteniéndose inmediatamente hígado, cerebro y sangre, siendo ésta la que se utilizó para el presente trabajo.

Las concentraciones de alcohol y los tiempos de tratamiento se obtuvieron de trabajos previos en el laboratorio (37).

#### Método de obtención de muestra.

Se obtiene sangre con anticoagulante (heparina) en una proporción 1:10 (heparina/sangre), la sangre se centrifuga a 2500 rpm, 5 min./4°C. Se elimina el sobrenadante que contiene plasma, glóbulos blancos y plaquetas, para obtener el paquete globular. Los eritrocitos se lavan 3 veces con solución salina isotónica (SSI), centrifugando a las mismas condiciones anteriores. Después de obtener el paquete globular, se ponen en un medio de incubación Krebs-Ringer bicarbonato, hasta ajustar el pH a 7.4 que contiene glucosa a una concentración final de 10 mmol/L al cual previamente se le hace pasar una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 95%/ 5%.

Se colocan 0.5 ml de paquete globular con 3.5 ml de solución de Krebs-Ringer anterior.

El medio de reacción se preincuba durante 25 minutos a temperatura ambiente (TA), con el fin de que los eritrocitos se adapten a su nuevo medio.

Por cada rata se cuenta con 2 muestras de paquete globular:

Una muestra corresponde a los niveles basales de los metabolitos y otra muestra se incuba durante dos horas a 37°C en un oscilador metabólico a una velocidad de 50 rev/min esta última muestra es para medir el metabolismo del eritrocito.

En la muestra control, se le agrega ácido perclórico al 4% para desproteínicarla (0.8 ml. de ácido perclórico a 4% en la mezcla de reacción, para obtener una solución final 0.2% de ácido perclórico).

De la misma manera se desproteíniza la muestra incubada durante 2 horas. Después de la incubación se centrifuga a 10,000 rpm/10 min /4 °C. Se obtiene el extracto perclórico, eliminándose el precipitado.

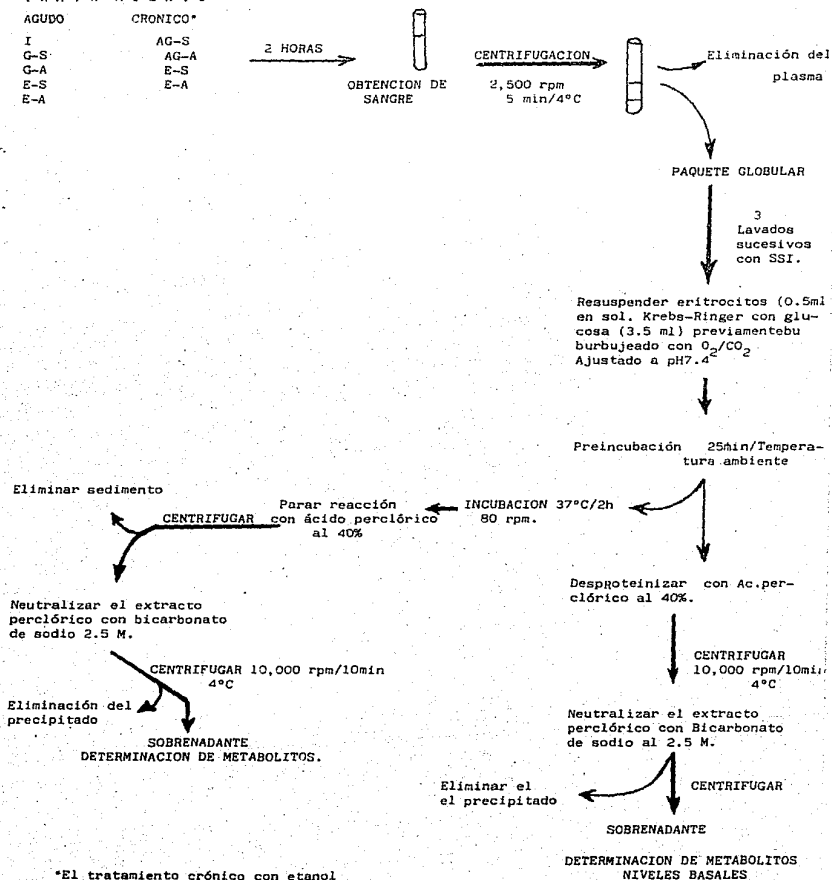
Los extractos perclóricos se neutralizan con bicarbonato de potasio al 2.5 mol/L, se centrifuga a 10,000 rpm/10min/4 °C. de estos extractos se hacen las determinaciones de los diferentes metabolitos.

El método para la preparación de los eritrocitos y las condiciones de incubación se explica con detalle en la sección de estandarización de métodos. (33).

TRATAMIENTO

AGUDO	CRONICO*
I	AG-S
G-S	AG-A
G-A	E-S
E-S	E-A
E-A	

MODELO EXPERIMENTAL



\*El tratamiento crónico con etanol fué de 8 semanas aprox.

## Métodos y Fundamentos de la determinación de metabolitos.

Para estudiar el metabolismo del eritrocito se hicieron las siguientes determinaciones:

- 1.- Nucleótidos : ATP, ADP y AMP.
- 2.- Fósforo inorgánico
- 3.- Lactato
- 4.- Piruvato
- 5.- 2,3-Difosfoglutarato

### 1.- DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS:

Se determinaron por cromatografía líquida de Alta Presión o Alto Rendimiento, conocido también como HPLC o cromatografía líquida de alta velocidad: HPLC, CLAE o cromatografía líquida de alta eficacia.

#### Aparatos:

HPLC Milto: RoyalDLC Modelo CI-10B

M45 con sistema de disolución específico, modelo 061, inyector de muestra, un detector 440 y columna de fase reversa, (R15-Bondapak (30 x 0.4 cm I.D.) .

#### Sustancias:-

-Metanol (puridad espectral) (Fisher Scientific).

Todos los líquidos fueron prefiltrados a través de un Filtro Millicore de 0.2 micras

- Los estándares se obtuvieron de Sigma y se

prepararon a una concentración de 0.1 mol/L en agua destilada. Las soluciones estándar se mantuvieron congeladas a una temperatura de 0°C.

-Solución amortiguadora.-

Fosfato de amonio  $[(NH_4)_2HPO_4]$  0.2 mol/L. pH 6.1. Se prepara en agua bidestilada y se ajusta el pH con  $NH_4^+$  o  $H_2PO_4^-$ . Se filtra y se elimina el sed.

-Solución de metanol-agua (30:70). para el lavado del aparato, se usa filtrado en Millipore.

-Metanol grado cromatográfico y cloroformo para activación de la columna.

Condiciones cromatográficas.-

Se usa una columna C18- $\mu$ bondapak. La columna se activa con una solución metanol-agua (30:70), antes y después de usarla. El flujo de líquido que pasa a través de la columna es de 1 ml/minuto (1,000-2000 psi). [39]

Fundamento.-

La separación en cromatografía líquida de alta presión se puede llevar a cabo a través de distintas formas o métodos de cromatografía, basados fundamentalmente en la interacción de distintos tipos de disolventes (fase móvil) y en las distintas resinas poliméricas (fase estacionaria).

La Cromatografía Líquido-Líquido se basa en la separación de compuestos por su distinta distribución en una fase móvil líquida y en otra fase estacionaria líquida de

acuerdo con sus coeficientes de reparto que se traduce en una distinta relación de migración.

**Cromatografía Líquido-Líquido en fase REVERSA:**

Sistema formado por una fase estacionaria menos polar que la fase móvil. Se puede utilizar para la separación de compuestos más hidrofóbicos que los que se usan para la fase normal.

Así, en fase reversa, la polaridad de la resina o relleno sería alta.

El disolvente utilizado en la fase reversa tiene una polaridad de media a alta. por lo tanto, eluyen primero los compuestos más polares. Por otra parte, en este tipo de cromatografía al incrementar la polaridad del disolvente se incrementará el tiempo del cromatograma. (40).

## 2.- DETERMINACION DE FOSFORO INORGANICO

Para esta determinación se usó un espectrofotómetro Karl Zeiss (M4 J III) en el cual se midió la absorción ( $A$ ) a una longitud de onda de 820 nm. después de incubar la muestra con el molibdato de amonio y el ácido ascórbico durante 25 min/45°C.

Reactivos.- Molibdato de amonio 0.42 %  
Acido sulfúrico 1 N (0.05 mol/L)  
Acido ascórbico 10 %  
Estandar de  $K_2HPO_4$  grado reactivo.

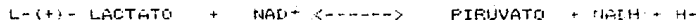
### 3.- DETERMINACION DE LACTATO

Se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. empleando un método enzimático con LDH y  $NAD^+$  a temperatura ambiente utilizando celdas de 1 cm, volumen final de 1 ml.

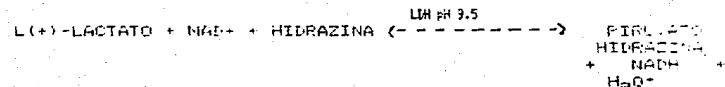
Aparato.- Carl Zeiss M4 OIII

Fundamento:

La Lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la sig.reacción:



El equilibrio de la reacción, la cual tiende a desplazarse hacia la izq.tiene una constante  $K_e = 2.9 \times 10^{-12}$  (moles/L) a 25 °C. El piruvato es atrapado como hidrazina debido al medio alcalino de la reacción. La ecuación básica del ensayo espectrofotométrico del lactato es:



Lo que se mide es la reducción de la coenzima en su forma oxidada ( $NAD^+$ ), por medio de la (LDH) deshidrogenasa láctica, la coenzima pasa a su forma reducida ( $NADH$ ) que absorbe a 340 nm. La forma oxidada  $NAD^+$ , absorbe a 260 nm. La reacción se lee a 340 nm, por lo que se lee el aumento de absorción al agregarle la enzima específica (LDH) [43].



Reactivos .-  
- Amortiguador Glicina-Hidrazina pH 7.5  
- NAD<sup>+</sup> oxidado  
- Lactato deshidrogenasa. (LDH)

El volumen total en la mezcla de reacción es de 1 ml, que contiene 0.1 ml de muestra problema

#### 4.- DETERMINACION DE PIRUVATO.

La determinación de Piruvato se hace enzimáticamente, utilizando un espectrofotómetro Zeiss modelo N4 QIII. Celdas de 1 cm. a temperatura ambiente.

Se usa un volumen de muestra de 0.5 ml siendo el volumen final en la celda de 1 ml.

Se lee la absorción a 340 nm.

#### Fundamento:

Se mide la oxidación de la coenzima a partir de su forma reducida (NADH<sub>2</sub>), que absorbe específicamente a 340 nm. Por acción de la LDH la coenzima pasa a su forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) que no absorbe a 340 nm, sino a 260 nm.

Se mide la desaparición de absorción de la coenzima al utilizar la enzima adecuada LDH, para que el piruvato presente en la reacción pase totalmente a lactato. [42].

Reactivos.-  
- Amortiguador de Cloruro de trietanolamina  
- NADH reducido.  
- Lactato deshidrogenasa.

## 5.- DETERMINACION DEL 2,3-DIFOSFOGLICERATO

La determinación del 2,3-Difosfoglicerato, se hace en un espectrofotómetro Karl Zeiss, con celdas de 1 cm a 340 nm de longitud de onda y un volumen final de 1 ml. a temperatura de 37°C/15 minutos o a temperatura ambiente 10 minutos.

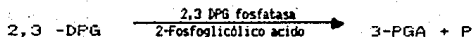
Método descrito por Lowry et al (43), solo que aquí se determina espectrofotométricamente y no con fluorómetro.

### FUNDAMENTO:

Se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm, midiendo el decremento en absorción causado por la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>, el cual nos refleja aproximadamente la cantidad de 2,3-DPG originalmente presente.

Las reacciones enzimáticas acopladas en esta determinación son:

1.- El 2,3-DPG es hidrolizado a 3-PGA y fósforo inorgánico. La enzima que cataliza la reacción es la 2,3-DPG fosfatasa. El ácido 2-fosfoglicólico es necesario como un estimulador para esta reacción.

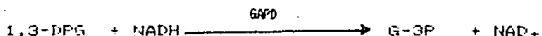


2.- 3-PGA reacciona con ATP en la presencia de PGK para.

formar 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) y ADP.



3.- 1,3-DPG oxida NADH a NAD en la presencia de GAPD y es reducido a G-3-P



Midiendo el decremento en absorción a 340 nm causado por la oxidación de NADH a NAD refleja el 2,3-DPG presente originalmente.

El significado de las abreviaturas usadas es el siguiente:

- NADH .....: Nicotinamida adenindinucleótido (reducido).
- ATP .....: Adenosina-5'-trifosfato
- GAPD/PGK ....: Mezcla de las enzimas gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y 3-fosfoglicerato fosfoquinasa
- Mutasa.....: fosfoglicerato mutasa.
- 2,3-DPG.....: 2,3-Difosfoglicerato
- ADP.....: Dinucleótido de adenina
- 3-PGA.....: 3-fosfoglicerato
- P.....: Fósforo inorgánico
- PGK.....: 3-Fosfoglicerato fosfoquinasa
- 1,3-DPG.....: 1,3-difosfoglicerato
- G-3-P.....: Gliceraldehido 3 fosfato
- NAD.....: Nicotinamida adenindinucleótido oxidado.

## C A L C U L O S :

### -NUCLEOTIDOS (ATP, ADP, AMP)

Para la determinación de los nucleótidos en la muestra, se necesita preparar soluciones estándares, las cuales nos van a servir de referencia para los cálculos. es decir, se prepara de cada nucleótido (ATP, ADP, AMP) un estándar de concentración 0.1 mmol/L. Se hace una mezcla de los tres nucleótidos y se hace pasar por el cromatógrafo la mezcla. El resultado de área que registre el aparato corresponderá a la concentración del nucleótido.

Por consiguiente para obtener el valor de nucleótidos en la muestra problema, sólo se tiene que relacionar el área del problema con la del nucleótido estándar y su concentración. De la siguiente manera:

$$\text{nm nucleótido/ml sangre} = \frac{\text{Ap} \times (\text{St}) \times \text{Vt} \times 0.45 \text{ ml}}{\text{Ast} \times \text{Pr} \times 0.5}$$

De donde :

Ap. ....: Área del problema

Ast. ....: Área del estándar (de cada uno de los nucleótidos)

(St) ....:Concentración del estándar dada en nm.

Vt .....: Volumen total del extracto perclórico neutralizado (ml).

- Pr. ....: Volumen (ml) de la muestra problema  
inyectada en el aparato.
- 0.5 ....: Volumen de paquete globular con el  
que se trabajo al principio.
- 0.45 ....: Corresponde al hematocrito.

Para convertir los nmoles en  $\mu$ moles, solo se tiene que  
dividir el resultado entre 1000 .

### PARAMETROS ENERGETICOS

-Carga Energética [1]

$$C.E. = \frac{\% [ADP] + [ATP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

-Potencial de Fosforilación [44].

$$PF = \frac{[ATP]}{[ADP] [HPO_4^{2-}]}$$

-Relación ATP/ADP [1]

$$\frac{[ATP]}{[ADP]}$$

### FOSFORO INORGANICO, LACTATO Y PIRUVATO

Para los cálculos de la determinación de estos metabolitos, se  
aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{Ap \times dil \times 0.45 \times P}{a \times d \times 0.5} = \mu\text{mol/ml sangre}$$

Donde:

A<sub>p</sub>- Corresponde A<sub>1</sub> -A<sub>2</sub> para el piruvato

A<sub>2</sub> -A<sub>1</sub> para el lactato y fósforo inorgánico

ε- Coeficiente de extinción molar ( cm<sup>2</sup>/μmol)

dil- Dilución de la muestra en la celda de reacción.

0.45-Corresponde al volumen de eritrocitos en 1 ml. de sangre. (hematocrito)

0.5-Cantidad de paquete globular utilizados en el volumen total de reacción.

d - longitud de la celda ,cm.

P - Dilución del extracto.

### 2,3-DIFOSFOGLICERATO-

Para obtener el resultado del 2,3-difosfoglicerato que hay en la muestra problema, se toma en cuenta la diferencia de absorbencia obtenidas:

La A<sub>1</sub> se obtiene antes de agregarle el acido fosfoglicólico y la A<sub>2</sub> corresponde a la absorbencia de la muestra después de incubarla durante 30 min/a temperatura ambiente, que nos indica el final de la reacción.

$$A = A_2 - A_1$$

$$A \text{ corregida} = A - 0.03$$

De donde el valor de 0.03 es sustraído de A para corregir la interferencia de absorción que causa la adición de acido fosfoglicólico.

Según la siguiente fórmula, se calcula la concentración del 2,3-DPG que hay en la sangre:

$$2-3,DPG (\mu \text{ mol/ml}) \text{ sangre} = A \text{ corregida} \times 2.52$$

El valor de 2.52 deriva de:

$$2.52 = \frac{0.97 \text{ ml} \times 0.42 \text{ ml}}{\epsilon \times 0.026 \text{ ml} \times 1 \text{ ml}}$$

Donde:

- 0.97 Volumen (ml) de la mezcla de reacción en la celda de reacción (VT)
- $\epsilon$  - Coeficiente de extinción
- 0.026 Volumen (ml) de muestra original en la mezcla de reacción (Vm)
- 0.42 Volumen (ml) de paquete globular que hay en 1 ml de sangre (tomando en cuenta el hematocrito de la sangre de rata).
- 1 ml Volumen de paquete globular con que se trabajó.

## RESULTADOS

El trabajo experimental de la tesis realizada, consistió en 3 partes fundamentalmente:

A. Optimización de técnicas para obtención y manejo de muestras.

B. Determinación de los efectos que causa el tratamiento "in vivo" de etanol y adenosina sobre el metabolismo del eritrocito.

C. Determinación de los efectos que causa el etanol y el acetaldehído directamente sobre el eritrocito. Experimento "in vitro".

### A. Optimización de técnicas

Se basó principalmente en:

- a. Obtención de las muestras
- b. Manejo de la muestra
- c. Medio de incubación
- d. Tiempo de incubación
- e. Concentración de paquete globular.

a. Obtención de las muestras.

Para trabajar con el eritrocito, es de suma importancia la obtención de sangre total y posteriormente trabajar con el eritrocito. Se probaron tres maneras de obtener sangre:

1. Por decapitación de la rata, recibiendo la sangre del cuello.



2. Obtención de sangre de la cola de la rata.

3. Obtención de sangre arterial.

Se optó por utilizar la primera opción ya que ofrece varias ventajas sobre las otras:

- El volumen de sangre que se puede obtener es mayor.
- La obtención de sangre es rápida, evitando así la coagulación de ésta.
- No es necesario usar anestésicos

Mientras que de la sangre de la cola, se obtienen apenas algunas gotas de sangre, la cual es insuficiente para los pasos posteriores, además, la rata se tiene que anestésicar y no se sabe qué tanto puede influir este paso en la determinación de los metabolitos a estudiar. Esta misma desventaja la presenta la sangre obtenida a través de la arteria, además de que el volumen obtenido sigue siendo insuficiente.

Se usó heparina líquida (1:10001) como anticoagulante en una concentración 1:10 en relación con la sangre.

#### b. Manejo de la muestra.-

Es importante que los eritrocitos se separen completamente del plasma y las plaquetas, ya que si se desea medir el metabolismo de eritrocitos, éstos pueden interferir y dar resultados falsos. Por lo que la sangre se centrifuga inmediatamente después de obtenerla, la velocidad y el tiempo es el que se usa rutinariamente en la clínica

( 2,500 rpm/5 min). Una vez teniendo el paquete globular, se debe lavar perfectamente con solución salina isotónica (SSI) de preparación reciente para eliminar residuos de plasma, posteriormente se centrifuga a una temperatura de 4° C, para mantener la viabilidad del eritrocito. Se suspenden los lavados cuando se obtenga un sobrenadante transparente. Los lavados y el manejo de la muestra, se realizan en el menor tiempo posible para mantener viable al eritrocito.

c. Medio de incubación.-

Una vez obtenidos los eritrocitos, es necesario que se coloquen en un medio de incubación, el cual debe reunir ciertas características, en cuanto a su composición y que sea el adecuado para que la célula lleve a cabo su metabolismo.

Se usó la solución de Krebs-Ringer Bicarbonato pH 7.4, por ser ésta la más adecuada para los fines que interesan. La composición de la solución de Krebs-Ringer se indica a continuación:

8.8 ml	NaCl	al 8.01 %	
8.9 ml	KCl	al 0.40 %	
15 ml	MgSO <sub>4</sub>	al 0.10 %	
5.0 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	al 0.11 %	Se ajusta el pH a 7.4
5.0 ml	CaCl <sub>2</sub>	al 0.38 %	
10.0 ml	NaHCO <sub>3</sub>	al 2.01 %	
47.3 ml	A G U A.		

Se burbujeó previamente con  $O_2/CO_2$  95%/5 %, respectivamente.

La vía glucolítica representa una de las vías fundamentales dentro del metabolismo del eritrocito, por lo que a la solución de Krebs-Ringer se le adicionó glucosa a una concentración final de 10 mmol/L.

Es necesario un tiempo de adaptación de la célula a su nuevo medio, por lo que los eritrocitos se dejaron reposar durante 25 min a temperatura ambiente en la solución de Krebs-Ringer bicarbonato. [39].

#### d. Tiempo de incubación.-

Se eligió el tiempo mínimo que necesita la célula para alcanzar el equilibrio energético necesario para la realización de sus funciones metabólicas. Se midieron los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) a diferentes tiempos de incubación (15, 30, 60 y 120 minutos) y posteriormente se determinaron los parámetros energéticos del eritrocito:

- Carga Energética
- Relación ATP/ADP

Estos dos parámetros representan la relación que existe entre los niveles de los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) y su equilibrio, dependiendo del cual la célula puede llevar o no a cabo su metabolismo de manera eficiente.

## VALORES DE REFERENCIA EN SANGRE DE RATA (61)

## METABOLITOS

---

A T P	0.68	±	0.03	μmol/ml.sangre
A D P	0.16	±	0.02	"
A M P	0.044	±	0.01	"
ATP/ADP	4.2			
Carga Energética	0.86			
Potencial de Fosforilación	3598		mol <sup>-1</sup>	

---

Los valores de referencia corresponden a metabolitos determinados en sangre total anteriormente en el laboratorio. Los valores obtenidos en el trabajo experimental actual, corresponden al paquete globular y se expresan en unidades de μmol/ml sangre, tomando en cuenta el valor promedio de hematocrito de sangre de algunas ratas.

Para obtener los valores de referencia se usaron ratas macho Wistar, peso 180-200 g., en ayuno durante 18 horas, sin ningún tipo de tratamiento. La sangre se obtuvo por decapitación y los eritrocitos fueron incubados en Krebs-Ringer con glucosa pH 7.4, al cual previamente se le burbujó durante 10 min. una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95/5 %, a diferentes tiempos: 15, 30, 60, 120 minutos.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla siguiente:

TIEMPO INCUBACION	NUCLEOTIDOS DE ADENINA			PARAMETROS ENERGETICOS	
	A T P *	A D P *	A M P *	ATP/ADP	C.E.
0	0.260	0.147	0.054	1.76	0.77
15	0.307	0.169	0.017	1.82	0.79
30	0.418	0.200	0.038	2.09	0.78
60	0.185	0.124	0.035	1.49	0.71
120	0.565	0.136	0.043	4.15	0.85

TABLA 1. Determinación de Nucleótidos de Adenina y parámetros energéticos a diferentes tiempos de incubación del eritrocito.

\* $\mu$ mol/ml de sangre.

Como se puede observar en la tabla 1, la carga energética se ve completamente restablecida después de una incubación de 2 horas, de igual manera sucede con los valores de los nucleótidos de adenina, obteniéndose valores parecidos a los reportados en el Laboratorio [6] (ver valores de referencia reportados en la hoja anterior a ésta) por lo que se estableció el tiempo de incubación de 2 horas, por ser el más adecuado para medir el metabolismo del eritrocito.

Se realizó 3 veces el mismo experimento, obteniéndose valores parecidos a los que se reportan.

#### e. Volumen de Paquete Globular.-

En lo que concierne al volumen de paquete globular, se

hicieron varios experimentos utilizando diferentes volúmenes de paquete globular ( 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1 ml);siendo el volumen de 0.5 ml. el adecuado para nuestros fines, ya que resulta ser el sistema más adecuado y accesible.

## B. EFECTOS DE LA ADENOSINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ERITROCITO EN LA INTOXICACION AGUDA Y CRONICA CON ETANOL.

Lo que nos interesa es apreciar los efectos que ejerce un tratamiento agudo y crónico de etanol sobre el eritrocito y su metabolismo, además de los efectos de la adenosina. Para ello se midieron los siguientes metabolitos:

- Nucleótidos de Adenina (ATP, ADP y AMP)

De aquí se obtuvieron los parámetros energéticos : Carga energética , relación ATP/ADP y el potencial de fosforilación utilizando los niveles de fósforo inorgánico.

- Fósforo inorgánico

- Lactato

- Piruvato

- 2,3-Difosfoglicerato

Los modelos experimentales se explican detalladamente en la sección de Materiales y Métodos. Es importante aclarar que se trata de dos modelos experimentales completamente diferentes , y por tanto sus resultados no son comparables entre sí. Existen diferencias en cuanto a tratamiento (dosis, tiempo de duración de tratamiento) y edad de las ratas, siendo de mayor edad las que corresponden a las del modelo de intoxicación crónica, por lo que se discutirán los resultados de manera independiente.

Los resultados de cada modelo experimental se dividen en dos secciones:

- I. Los que corresponden a los niveles de metabolitos en el eritrocito, antes de incubarlos, considerando el proceso de degradación que normalmente ocurre al preparar el paquete globular
- II. Los que se refieren al metabolismo del eritrocito, siendo éstos los que se incubaron durante dos horas y reflejan la capacidad de readaptación metabólica.



**EXPERIMENTO**  
**"IN VIVO"**

**MODELO DE**  
**INTOXICACION**  
**AGUDA**

**VALORES PREVIOS**  
**A LA INCUBACION**

NIVELES BASALES DE METABOLITOS  
EXPERIMENTO "IN VIVO"

MODELO DE INTOXICACION AGUDA

En el modelo de intoxicación aguda, como se mencionó anteriormente, hay un grupo de ratas intactas, a las que no se les aplicó ningún tratamiento: un grupo control de glucosa-salina y otro de glucosa-adenosina (control de adenosina); además de los grupos tratados con etanol-salina y etanol-adenosina.

Determinación de Nucleótidos de Adenina

1. Nucleótidos totales

Como se observa en la tabla siguiente, curiosamente el etanol aumenta los valores de nucleótidos totales, en un 40% en relación a los obtenidos en las ratas intactas. Sin embargo, también se manifiesta el efecto de la adenosina, aumentándolos de un 50 a 63 % tanto en ratas tratadas con etanol-adenosina como en las de glucosa-adenosina.

TRATAMIENTO	NUCLEOTIDOS TOTALES μmol/ml sangre	%
INTACTAS	0.648	100
GLUCOSA-SALINA	0.614	95
GLUCOSA-ADENOSINA	0.969	150
ETANOL-SALINA	0.907	140
ETANOL-ADENOSINA	1.057	163

TABLA 2. Determinación de nucleótidos totales en eritrócitos en ratas con tratamiento agudo con etanol.

## 2. Niveles de ATP

En la Fig.1 A, con respecto a las ratas intactas se observa un efecto discreto del etanol sobre los niveles de ATP, con un aumento ligero, siendo más importante el aumento de ATP que muestran aquellas que son tratadas con etanol-adenosina. En las ratas tratadas con glucosa-salina, el valor del ATP se encuentra significativamente disminuido ( $p < 0.05$ ) con respecto a las ratas intactas. Los niveles de ATP en ratas con glucosa-adenosina aumentan, inclusive son un poco más elevados que los que se obtuvieron en las ratas intactas. Sin embargo, se observa que en presencia de adenosina no se observa el efecto de la glucosa, observándose una elevación significativa de ATP. ( $p < 0.05$ ).

## 3. Niveles de ADP

En la FIG.1B, se pueden apreciar los niveles de ADP, en donde los efectos de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las ratas, ocasionan un aumento significativo de ADP ( $a = p < 0.05$  y  $b = p < 0.025$ ) con respecto a las ratas sin tratamiento, en sí, no hay un efecto exclusivo del etanol o la adenosina sobre los niveles de ADP.

## 4. Niveles de AMP

Analizando la Fig.1C, se observa un aumento de AMP en ratas tratadas con glucosa-salina ( $p < 0.05$ ) y glucosa-adenosina, sin embargo en el tratamiento con etanol y etanol-adenosina no se observa efecto sobre los valores de AMP.

## 5. Niveles de Fósforo Inorgánico (Pi).

En la Fig.1 D, se observa una disminución significativa ( $p < 0.025$ ) del Pi correspondientes al tratamiento agudo con etanol, respecto a las intactas, no recuperándose con el tratamiento conjunto con la adenosina. Sin embargo, el Pi disminuye en mayor proporción con el tratamiento con la glucosa-salina ( $p < 0.01$ ).

## Parámetros Energéticos.

Estos resultados se pueden interpretar mejor, viendo la Fig.2 en la cual expresamos los parámetros energéticos en forma de carga energética (C.E.), la cual representa el equilibrio energético de la célula para un mejor metabolismo y función: relación ATP/ADP que es una constante que nos indica la síntesis o degradación de nucleótidos y el potencial de fosforilación (PF), como su nombre lo indica es la capacidad de la célula para fosforilar metabolitos tales como AMP,ADP para formar ATP, por ejemplo.

## 6. Relación ATP/ADP

Analizando la Fig.2A, la relación ATP/ADP, disminuye de manera significativa ( $p < 0.005$ ) con tratamiento de glucosa-salina, aproximadamente 50% del valor obtenido en las intactas, sin embargo, tiende a recuperarse al tratar a las ratas con glucosa-adenosina. La relación también se encuentra disminuida ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento con el

etanol, no habiendo una franca recuperación al tratar a las ratas con etanol-adenosina.

#### 7.- Carga Energética. (CE)

En la Fig.2B, la carga energética se ve moderadamente disminuida en ratas tratadas con etanol-salina, no habiendo una respuesta de recuperación en las ratas tratadas con etanol-adenosina. En las tratadas con glucosa-salina, la Carga energética tiende a disminuir, observándose que con el tratamiento con glucosa-adenosina se mantienen los valores comparables con los de las intactas.

#### 8. Potencial de Fosforilación.

Como se aprecia en la Fig. 2C, el potencial de fosforilación de la célula se ve aumentado en gran medida con tratamiento con etanol y se mantiene por arriba de los niveles encontrados en las ratas intactas con tratamiento con etanol-adenosina y glucosa-adenosina.

#### GLUCOLISIS

La glucólisis representa una de las vías principales que se llevan a cabo en el eritrocito, por ser ésta su mejor fuente de energía, por lo que se midieron niveles de lactato y piruvato como productos finales de la glucólisis.

### 9. Niveles de Lactato.-

En el modelo de intoxicación aguda, los niveles de lactato que se encontraron fueron los siguientes:

En la Fig. 3A, se ve claramente el efecto del etanol sobre los niveles de lactato, haciéndolo disminuir significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto a las ratas intactas, sin embargo hay una disminución adicional ( $p < 0.01$ ) al tratar a las ratas con etanol-adenosina. Con lo que respecta a las ratas control de glucosa-salina y glucosa-adenosina, en las primeras hay un aumento extremadamente significativo ( $p < 0.002$ ) con respecto a los demás grupos; efecto que no se observa en el grupo tratado con adenosina, observándose valores disminuidos comparables con los obtenidos en las ratas tratadas con etanol.

### 10. Niveles de Piruvato.-

En los datos obtenidos de piruvato, Fig. 3B, se observa el efecto del etanol, haciendo disminuir los niveles de piruvato en forma significativa ( $p < 0.002$ ) con respecto a las ratas intactas, este efecto se ve bloqueado con la adenosina, al tratar a las ratas con etanol-adenosina, inclusive aumentando los valores de manera significativa ( $p < 0.01$ ) con respecto a las intactas.

### 11. Relación Lactato/Piruvato

En la Fig. 3C, se aprecia la relación Lactato/Piruvato en los diferentes tratamientos. Hay un aumento de aproximadamente un 50% de la relación con tratamiento de etanol-salina con respecto a las intactas y con el tratamiento con etanol-adenosina sucede lo contrario, disminuye. Por lo que la adenosina bloquea el efecto del etanol y lo revierte. La relación se ve fuertemente afectada por el tratamiento con glucosa-salina, aumentando casi 6.5 veces del valor obtenido en las ratas intactas y este efecto se revierte por la adenosina obteniéndose valores semejantes a las intactas.

### 12. Niveles de 2,3-Difosfoglicerato

El 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), representa el fosfato orgánico que se encuentra en mayor proporción en el eritrocito y además los altos niveles de este fosfato en el eritrocito desempeñan un papel fundamental en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por oxígeno en tejidos. Es por esta razón el interés por estudiarlo debido a que hay antecedentes de que la intoxicación con etanol ocasiona un estado de hipoxia tisular.

Como se puede apreciar en la Fig.4, el efecto del etanol sobre los niveles de 2-3,DPG aumentan con respecto al de las ratas intactas. El efecto de la adenosina sobre los niveles del 2-3,DPG en ratas tratadas con etanol, es el de

una tendencia a contrarrestar el aumento del 2,3-DPG ocasionado por el etanol; sin embargo, en el control de glucosa-adenosina, el valor del 2,3-DPG se encuentra por arriba del que se encontró en ratas intactas.



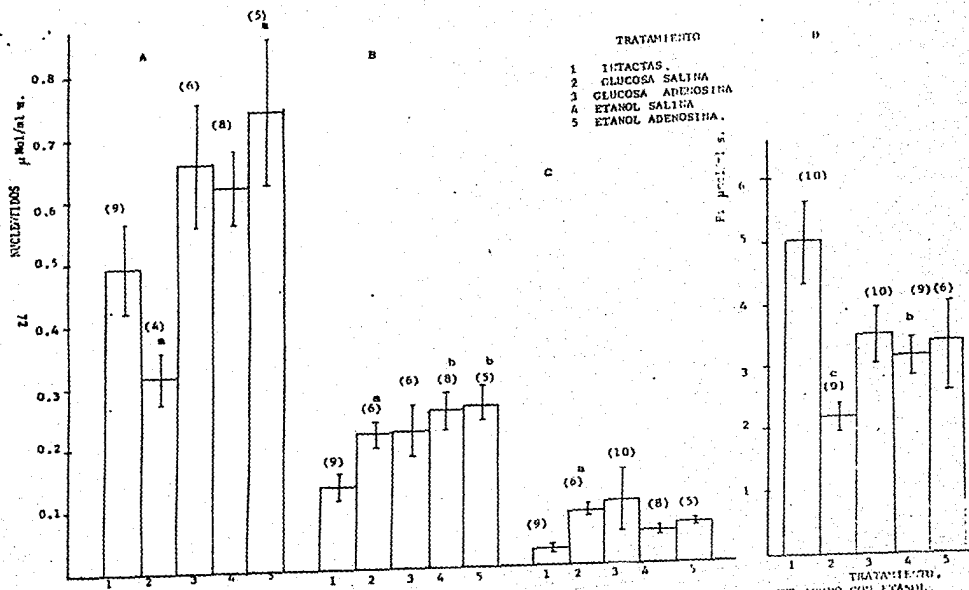


FIG. 1 DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA EN ERITROCITOS DE RATA CON TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL.  
 A= ATP B=ADP C AMP D= FOSFORO INORGANICO.

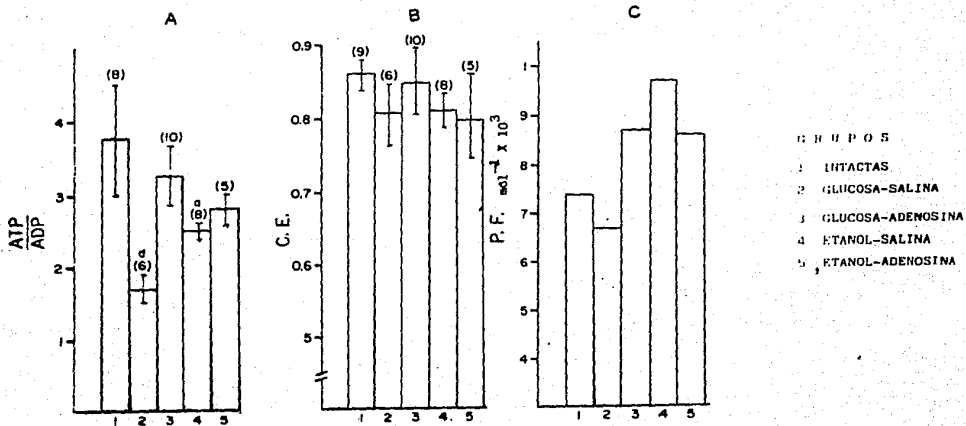


FIG.2 PARAMETROS ENERGETICOS DE ERITROCITOS DE RATAS TRATADAS CON INTOXICACION AGUDA CON ETANOL.

A = RELACION ATP/ADP

B = CARGA ENERGETICA (CE)

C = POTENCIAL DE FOSFORILACION (PF)

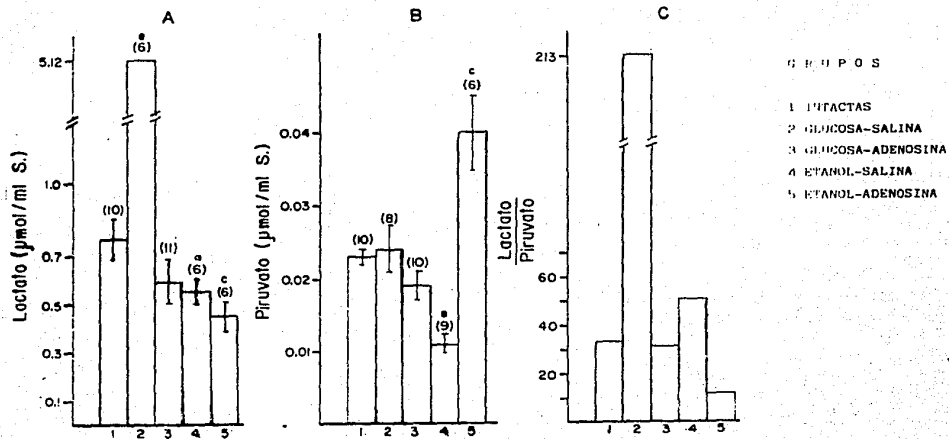


FIG. 3 NIVELES DE LACTATO (A), PIRUVATO (B) Y RELACION LACTATO/PIRUVATO (C)

MODELO DE INTOXICACION AGUDA.

- TRATAMIENTO
1. INTACTAS
  2. GLUCOSA-SALINA
  3. GLUCOSA-ADENOSINA
  4. ETANOL-SALINA
  5. ETANOL-ADENOSINA

2,3-DIFOSFOGLICERATO  
 $\mu\text{mol/ml sangre}$

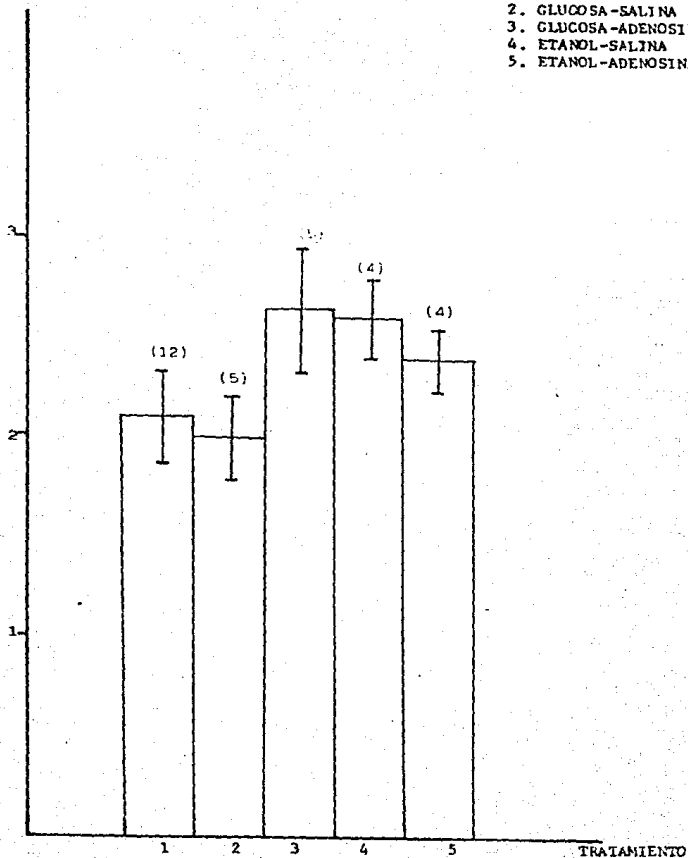


FIG. 4 DETERMINACION DE 2,3-DIFOSFOGLICERATO (2,3-DPG) EN ERITROCITOS DE RATAS TRATADAS CON ETANOL

**EXPERIMENTO  
"IN VIVO"**

**MODELO DE  
INTOXICACION  
AGUDA**

**VALORES  
POSTERIORES  
A LA INCUBACION**

## VALORES DE METABOLITOS DESPUES DE LA INCUBACION.

### MODELO DE INTOXICACION AGUDA

En el trabajo actual, se estimó el metabolismo del eritrocito dándoles tratamiento de 2 horas de etanol y glucosa intragastricamente y con inyecciones intraperitoneales de solución salina isotónica y adenosina, como se indica detalladamente en la sección de Materiales y Métodos.

Después de éste tratamiento, se obtienen los eritrocitos y se preparan para incubarlos durante 2 horas en un medio de Krebs-Ringer con glucosa y al final de está incubación se espera que los eritrocitos hayan recuperado su capacidad para metabolizar la glucosa y su equilibrio energético se encuentre en buenas condiciones, por lo que se midieron parametros energéticos, lactato, piruvato, y fósforo inorgánico, para determinar los efectos del etanol y adenosina.

Determinación de nucleótidos de adenina

#### 13. Nucleótidos Totales

En la Tabla 3 se pueden apreciar un aumento de los niveles de nucleótidos totales con cualquier tratamiento que se les haya dado a las ratas, en relación con aquellas que no se les dio tratamiento, pero el mayor aumento de nucleótidos lo observamos en las ratas tratadas con etanol-salina. El efecto de la adenosina en ratas tratadas con etanol no es

muy claro , puesto que los niveles de nucleótidos totales son bastante similares, pero con respecto a los controles de glucosa-salina y glucosa-adenosina .

TRATAMIENTO	NUCLEOTIDOS TOTALES µmol/ml sangre	%	% RELATIVO CON RESPECTO AL % DE BASALES
INTACTAS	0.509	100	78.5
GLUCOSA-SALINA	0.606	119	99.0
GLUCOSA-ADENOSINA	0.541	106	55.8
ETANOL-SALINA	0.651	128	72.0
ETANOL-ADENOSINA	0.633	124	60.0

TABLA 3 Determinación de nucleótidos totales de eritrocitos de ratas con tratamiento agudo con etanol.

#### 14. Niveles de ATP

En la Fig.5 ,están indicados los niveles de cada uno de los nucleótidos. Se puede observar el efecto del etanol sobre los niveles de ATP ocasionando un aumento discreto con respecto al obtenido en ratas intactas. El incremento en las tratadas con etanol-adenosina es ligeramente mayor, sin embargo, la respuesta a la adenosina en el grupo tratado con glucosa-adenosina indica una disminución del valor de ATP con respecto al de las intactas. Esta disminución se hace significativa al comparar a los dos grupos de adenosina : glucosa-adenosina y etanol-adenosina.

#### 15. Niveles de ADP

En lo que se refiere a los valores de ADP, en la Fig. 5B, se observa el efecto que ejerce el tratamiento agudo con etanol respecto a las ratas intactas, hay un aumento significativo en los niveles de ADP, comparable con el obtenido en las ratas control de glucosa-salina. En el control de glucosa-adenosina, sin embargo, el nivel de ADP se mantiene dentro de los valores normales, pero con el tratamiento con etanol-adenosina los valores de ADP son comparables a los obtenidos con etanol-salina.

#### 16. Niveles de AMP

En la Fig. 5C, se muestran los resultados de AMP, el único cambio importante es con el tratamiento de glucosa-adenosina observándose un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de AMP con relación a las intactas.

#### 17. Niveles de Fósforo Inorgánico. (Pi).

Analizando la Fig. 5D, se observa que el Pi disminuye de manera significativa ( $a = p < 0.05$ ,  $c = p < 0.01$ ,  $d = p < 0.005$ ) con los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las ratas. La disminución causada por el etanol no se recupera por el tratamiento con etanol-adenosina. En el tratamiento con glucosa-salina se observa una disminución mayor con respecto a los demás grupos ( $p < 0.005$ ).



## Parámetros energéticos

### 18. Relación ATP/ADP

En la Fig. 6A, se indica la relación que existe entre los niveles de ATP y ADP. La relación cercana a 3 para las ratas intactas se ve fuertemente ( $p < 0.05$ ) afectada por el tratamiento agudo con etanol y disminuye en casi un tercio del valor obtenido en las ratas intactas. La relación se restaura a valores normales al tratar a las ratas con etanol-adenosina, lo que indica que la adenosina tiende a aumentar la relación. El mismo efecto de la adenosina se manifiesta en los controles de glucosa-adenosina, donde la relación aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto al control de glucosa-salina.

### 19. Carga Energética.-(C.E.)

Después de la incubación de 2 horas, se espera que la célula haya recuperado su equilibrio energético, por lo que en la Fig. 6b se observa el efecto de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los grupos de ratas.

La C.E. de los eritrocitos de las ratas intactas es de 0.76, no hubo efecto por el tratamiento agudo con etanol sobre la recuperación de la carga energética, ya que los valores se mantienen muy cerca a los obtenidos con las ratas intactas. Las que se trataron con etanol-adenosina parecen aumentar la C.E., pero este aumento no es muy evidente. Lo

que sí se puede apreciar es que hay un aumento de la C.E. en las ratas control de glucosa-salina, con respecto a las intactas, y en las de glucosa-adenosina se mantiene cerca de los valores normales.

#### 20. Potencial de Fosforilación.- (PF).

Analizando la Fig.6 C, se observa que el potencial de fosforilación es abatido de manera importante por el tratamiento con etanol, efecto que es contrarrestado por la adenosina. Al tratar a las ratas con etanol-adenosina, el PF, se recupera y aumenta aún más que el PF observado en las ratas intactas. El aumento del PF causado por la adenosina, se observa también en las ratas tratadas con glucosa-adenosina, el tratamiento con glucosa-salina incrementa significativamente el PF en relación con las intactas.

#### GLUCOLISIS.-

Para estudiar los efectos del etanol y la adenosina sobre el metabolismo del eritrocito, se tomó como referencia la vía glucolítica, valorando los niveles de lactato y de piruvato como productos finales de la glucólisis, en esta célula, después de una incubación de 2 horas.

#### 21. Niveles de Lactato.-

Los niveles de lactato en ratas intactas cercanos a 5  $\mu$ mol/ml sangre, presentados en la Fig.7A, tienden a disminuir

en las ratas tratadas con etanol, pero no significativamente ( $p > 0.05$ ). En las ratas tratadas con etanol-adenosina los niveles de lactato no cambia con respecto a las intactas y lo mismo se observa en el grupo tratado con glucosa-adenosina. Por otro lado con glucosa-salina hay una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la producción de lactato con respecto a los de las ratas intactas.

#### 22.- Niveles de Piruvato

Como se muestra en la Fig. 7B, casi no se observa efecto del etanol sobre los niveles de piruvato, las ratas tratadas con etanol-adenosina aumentan considerablemente ( $p < 0.001$ ) sus niveles de piruvato, comparados con cualquiera de los tratamientos, inclusive con los valores de las ratas intactas. Este efecto no es el mismo que se observa en los controles de glucosa, ya que en las ratas tratadas con glucosa-salina el piruvato disminuye con respecto a las ratas intactas, pero no es significativo ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, la disminución de piruvato es más importante ( $p < 0.05$ ) con glucosa-adenosina.

#### 23.- Relación Lactato/Piruvato.-(L/P).

En la Fig. 7C, se observa que el tratamiento con etanol-adenosina, desequilibra la relación L/P, disminuyéndola de manera importante con respecto a las intactas. Sin embargo,

la relación aumenta a poco más del doble en las ratas tratadas con glucosa-adenosina. No se observa efecto del tratamiento de etanol sobre la relación L/P.

#### 24. Velocidad de Formación de Lactato.-

Como se muestra en la tabla siguiente, la velocidad de formación de lactato se ve disminuida en un 16 % por el tratamiento con etanol, restableciéndose el tratamiento con etanol-adenosina. Con el tratamiento con glucosa-salina, la velocidad se reduce en un 30 % sobre el valor obtenido con las ratas intactas, sin embargo con el tratamiento de glucosa-adenosina la velocidad se mantiene cerca de la obtenida con las ratas intactas.

Tratamiento	Velocidad de formación de lactato $\mu\text{mol/ml.sangre/minute}$	%
INTACTAS	0.041	100
GLUCOSA-SALINA	0.029	70
GLUCOSA-ADENOSINA	0.038	92
ETANOL-SALINA	0.034	84
ETANOL-ADENOSINA	0.040	97

TABLA.4.Velocidad de formación de lactato, en eritrocitos de animales con tratamiento agudo con etanol despues de una incubación de 2 horas.

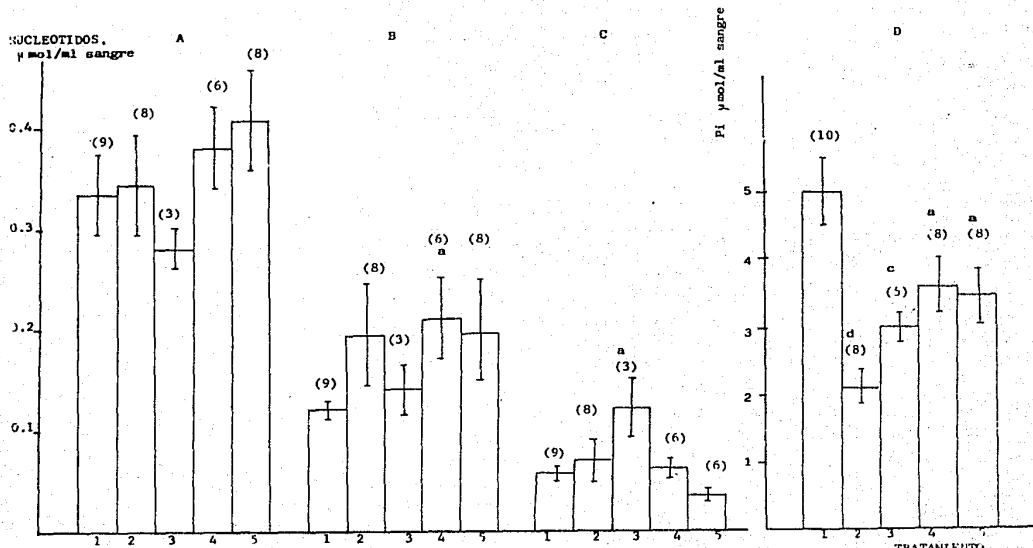


FIG. 5. DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS EN ERITROCITOS DE RATAS CON TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL.

A = ATP    B = ADP    C = AMP    D = FOSFORO INORGANICO (Pi)

TRATAMIENTO:    1 INTACTAS    4 ETANOL-SALINA

                          2 GLUCOSA-SALINA    5 ETANOL-ADENOSINA

                          3 GLUCOSA-ADENOSINA

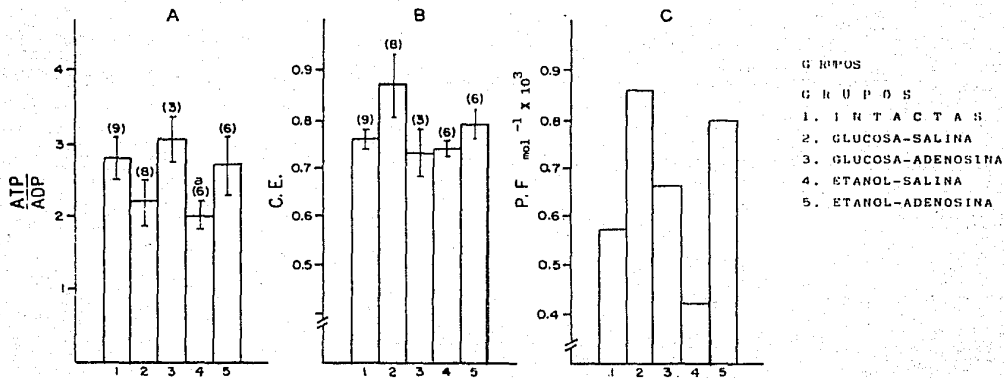


FIG.6 PARAMETROS ENERGETICOS DE ERITROCITOS DE HATAS CON TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL.

A = ATP/ADP

B = CARGA ENERGETICA (CE)

C = POTENCIAL DE FOSFORILACION (PF).

**EXPERIMENTO  
"IN VIVO"**

**MODELO DE  
INTOXICACION  
CRONICA**

**VALORES PREVIOS  
A LA INCUBACION**

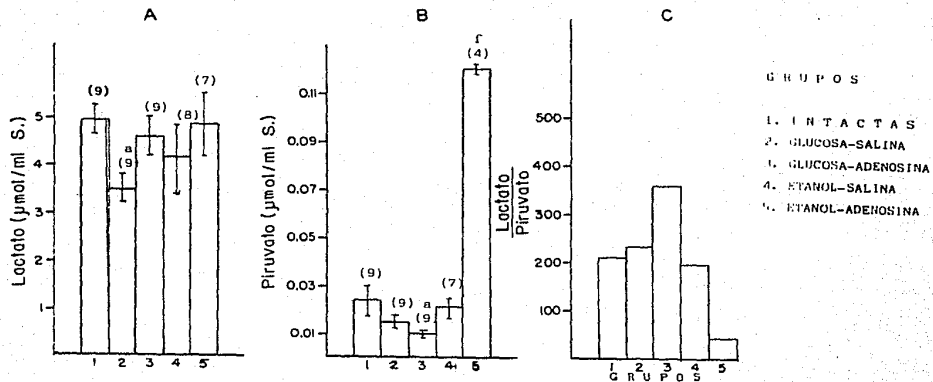


FIG. 7

LACTATO (A), PIRUVATO (B) Y RELACION LACTATO/PIRUVATO (C)

MODELO DE INTOXICACION AGUDA



EFFECTOS DEL ALCOHOL SOBRE LOS NIVELES BASALES DE METABOLITOS  
EXPERIMENTO "IN VIVO"  
MODELO CRONICO

Para el caso del modelo crónico de intoxicación con etanol se realizaron las mismas determinaciones que en el modelo de intoxicación aguda. El tratamiento crónico sólo se refiere a la ingestión de etanol, que duró aproximadamente 8 semanas. En cuanto al tratamiento con adenosina, se aplicó una inyección intraperitonealmente 2 horas antes de sacrificar a la rata. Los detalles del modelo experimental se encuentra explicados en la sección de materiales y métodos.

25. Niveles basales de nucleótidos de adenina.-

En la siguiente tabla se consideran los valores de nucleótidos totales de adenina. En ella se observa un aumento importante con el tratamiento agua-adenosina, siendo que el etanol evita ese aumento en el tratamiento con etanol-adenosina, al contrario, disminuye con respecto al valor correspondiente al grupo de agua-salina. El etanol, "per se", aumenta los valores de nucleótidos totales, pero no en la magnitud observada con el tratamiento con adenosina.

TRATAMIENTO	NUCLEÓTIDOS TOTALES pmol/ml. sangre	N
AGUA-SALINA	0.479	100
AGUA-ADENOSINA	1.019	213
ALCOHOL-SALINA	0.701	140
ALCOHOL-ADENOSINA	0.401	84

TABLA 5. Determinación de nucleótidos totales en eritrocitos de animales con tratamiento crónico con etanol.

#### 26. Niveles de ATP

Observando la FIG. 8A el etanol presenta valores parecidos a los encontrados en las ratas con tratamiento agua-salina. Sin embargo, disminuye en el tratamiento crónico con etanol + adenosina, siendo que el tratamiento con agua + adenosina evita esta disminución y por el contrario se incrementa el nivel de ATP. Parece por lo tanto, que el tratamiento crónico con etanol evita el efecto de aumentar los niveles de ATP que tiene la adenosina, el tratamiento crónico con etanol evita el efecto de la adenosina de aumentar los niveles de ATP.

#### 27. Niveles de ADP

En la FIG. 8B se consideran los niveles de ADP. En ella se observa que el etanol no ejerce un efecto sobre este nucleótido, y en presencia de la adenosina, el ADP disminuye

en forma significativa ( $p < 0,05$ ) en relación con el grupo de agua-salina. La respuesta al tratamiento con agua-adenosina es una discreta disminución del ADP con respecto al tratamiento de agua-salina.

#### 28. Niveles de AMP

En la Fig.8C, se puede detectar un aumento de AMP como efecto del tratamiento del etanol, sin embargo, la adenosina bloquea este efecto en ratas tratadas con etanol-adenosina, al contrario disminuye ligeramente el AMP con este tratamiento.

#### 29. Niveles de Fósforo Inorgánico. (Pi)

En la Fig.8 C se observa que el Pi aumenta discretamente con el tratamiento crónico con etanol. La adenosina revierte este efecto en ratas tratadas con etanol-adenosina, representando valores similares a los encontrados en el grupo de agua-salina. La respuesta al tratamiento de agua-adenosina es una disminución ligera de Pi, con respecto al de agua-salina.

#### Parámetros energéticos.-

#### 30. Relación ATP/ADP.

Como se indica en la FIG.9A, la relación ATP/ADP no se modifica por el tratamiento crónico con etanol-salina. Sin embargo la respuesta a la adenosina se refleja claramente en

un incremento importante, tanto en las ratas tratadas con agua-adenosina ( $p < 0.001$ ) como en las tratadas con etanol-adenosina ( $p < 0.005$ ) con respecto a las tratadas con agua-salina.

### 31. Carga Energética. (CE)

Analizando la Fig.9B se puede apreciar que la CE disminuye por el tratamiento con etanol y que la adenosina revierte este efecto, en ratas tratadas con etanol-adenosina; en éstas la CE, inclusive, aumenta en relación al grupo de agua-salina ( $p < 0.05$ ). El mismo efecto de la adenosina se observa en las ratas tratadas con agua-adenosina, observándose un aumento importante ( $p < 0.05$ ) de la CE en relación con las de agua-salina.

### 32. Potencial de Fosforilación. (PF)

El PF, como se muestra en la Fig.9C, no se modifica con el tratamiento con etanol, mientras que con el tratamiento con adenosina, el PF aumenta de manera considerable con respecto a las ratas control tanto en las ratas tratadas con agua-adenosina como en las de etanol-adenosina.

## GLUCOLISIS.

### 33. Niveles de Lactato

Existen antecedentes, que en el alcoholismo crónico aumentan los niveles de lactato en la sangre, no sucediendo así en los eritrocitos; por el contrario con el tratamiento crónico

con etanol los niveles basales de lactato tienden a disminuir con respecto a los de agua-salina (FIG.10A). Por otro lado el efecto de la adenosina, tiende a aumentarlos, como se observa en la misma figura, por los tratamientos crónicos con etanol-adenosina, siendo mayor el aumento con agua-adenosina que con etanol-adenosina.

#### 14. Niveles de Piruvato.-

Como se indica en la FIG.10B el efecto del tratamiento crónico con etanol-salina, baja considerablemente ( $p<0.05$ ) los niveles de piruvato con respecto a los de agua-salina y por el contrario con agua-adenosina los niveles de piruvato aumentan ( $p<0.05$ ) - siendo bloqueado este efecto de la adenosina por el etanol en el tratamiento con etanol-adenosina ( $p<0.05$ ), disminuyendo el piruvato a niveles más bajos que los obtenidos con el tratamiento con etanol.

#### 15. Relación Lactato/Piruvato

En la Fig. 10C se muestra la relación Lactato/Piruvato. la cual no se afecta por el tratamiento crónico con etanol. Curiosamente con el tratamiento con etanol-adenosina, la relación aumenta casi 3 veces el valor obtenido en las de agua-salina, debido al aumento de lactato y la disminución de Piruvato.

### 36. Niveles de 2,3-Difosfoglicerato. (2,3-DPG)

Analizando la Fig.11 se puede observar que el etanol no ejerce un efecto "per se" sobre los niveles del 2,3-DPG. Inclusive bloquea el incremento observado del 2,3-DPG por la adenosina en las ratas tratadas con agua-adenosina.

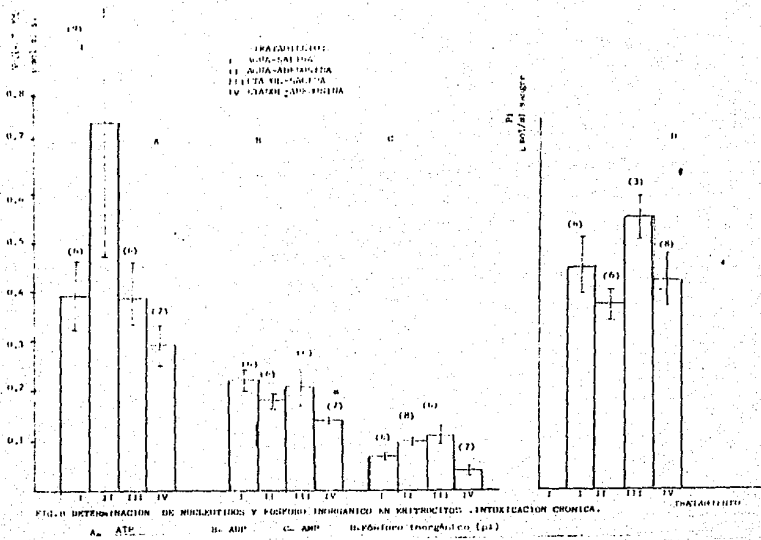


FIG. 11 DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS Y PIRIDINA ENRIANCO EN EXTRACTOS DE YERVA EN INTOXICACION CRONICA.

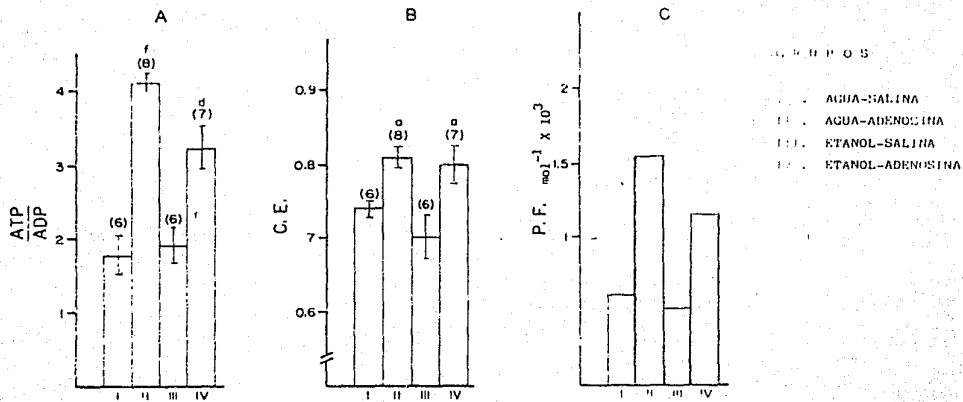


FIG. 9 PARAMETROS ENERGETICOS DE ERITROCITOS DE RATAS CON TRATAMIENTO CROCIADO CON ETANOL.

A = RELACION ATP/ADP B = CARGA ENERGETICA (CE) C = POTENCIAL D. FOSFORILADA (P.F.).



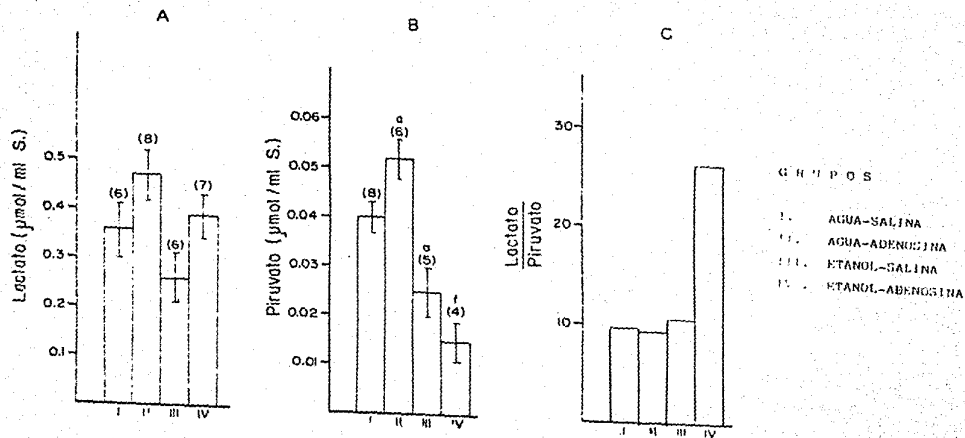


FIG. 10 NIVELES BASALES DE LACTATO = A ; B = PIRUVATO , C LACTATO-PIRUVATO.  
TRATAMIENTO CRÓNICO CON ETANOL.

TRATAMIENTO

- I AGUA-SALINA
- II AGUA -ADENOSINA
- III ETANOL-SALINA
- IV ETANOL-ADENOSINA

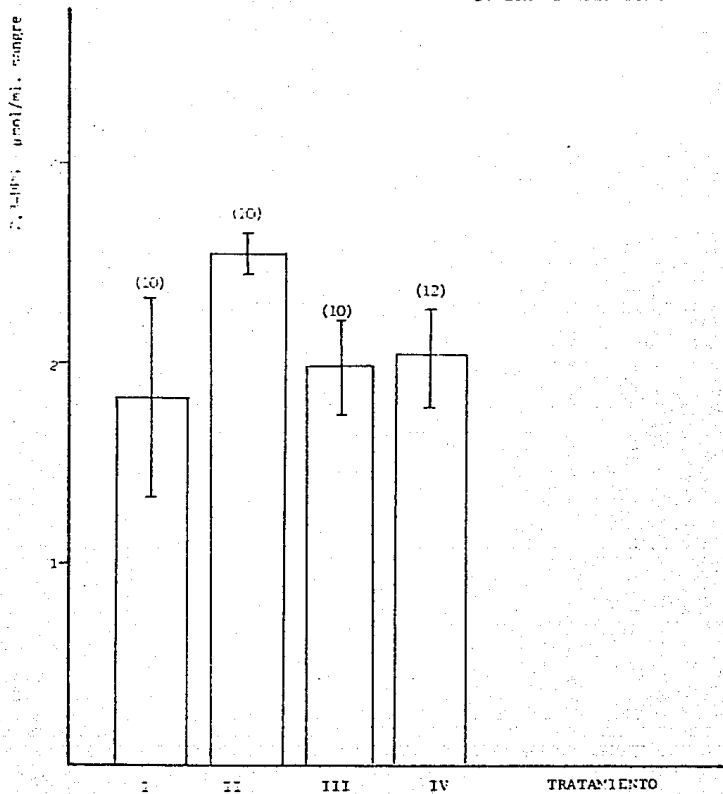


FIG. 11 DETERMINACION DE 2,3-DIFOSFOGLICERATO (2,3-DPG) EN ERIPTOCITOS DE RATAS CON TRATAMIENTO CRONICO CON ETANOL.

EFEECTO DEL ETANOL EN EL METABOLISMO DEL ERITROCITO  
EXPERIMENTO "IN VIVO"  
MODELO CRONICO

Se hicieron las mismas determinaciones de metabolitos ,pero en este caso se valoró la respuesta del eritrocito al tratamiento crónico con etanol. Se determinó la capacidad de oxidar la glucosa hasta lactato, además de mantener los parámetros energéticos para su metabolismo.

Determinación de nucleótidos de Adenina

37. Nucleótidos totales.-

Observando la siguiente tabla, se puede detectar que no existen cambios apreciables en el total de nucleótidos, excepto en el caso de tratar a los animales con etanol - adenosina, donde se presenta una disminución casi del 30% con respecto al de agua-salina.

Por lo que se refiere al cambio relativo a los niveles basales, (ver última columna) se observa que los nucleótidos totales disminuyen casi en un 50% en las ratas tratadas con agua-adenosina y un 25 % en las de etanol-salina con respecto al grupo de ratas con agua-salina.

**EXPERIMENTO  
"IN VIVO"**

**MODELO DE  
INTOXICACION  
CRONICA  
VALORES  
POSTERIORES  
A LA INCUBACION**

TRATAMIENTO	NUCLEOTIDOS TOTALES µmol/ml.sangre	%	CAMBIO RELATIVO A LOS NIVELES BASALES %
AGUA-SALINA	0.502	100	100
AGUA-ADENOSINA	0.516	103	51
ETANOL-SALINA	0.530	105	76
ETANOL-ADENOSINA	0.361	72	90

TABLA . 6. Determinación de nucleótidos totales en eritrocitos de animales con distintos tratamientos experimentales.

### 38. Niveles de ATP

En la FIG.12A se consideran los valores de ATP. En ella se observa un aumento con el tratamiento crónico con etanol, en tanto que el tratamiento crónico con etanol-adenosina evita este aumento, e inclusive parece disminuirlos por abajo de los niveles correspondientes para las ratas tratadas con agua-salina. La acción de la adenosina de bajar el valor de ATP se manifiesta también en el grupo tratado con agua-adenosina.

### 39. Niveles de ADP

Con respecto al ADP, en la FIG.12B no se observan cambios significativos por el tratamiento con etanol. Con el tratamiento crónico de etanol-adenosina hay una ligera

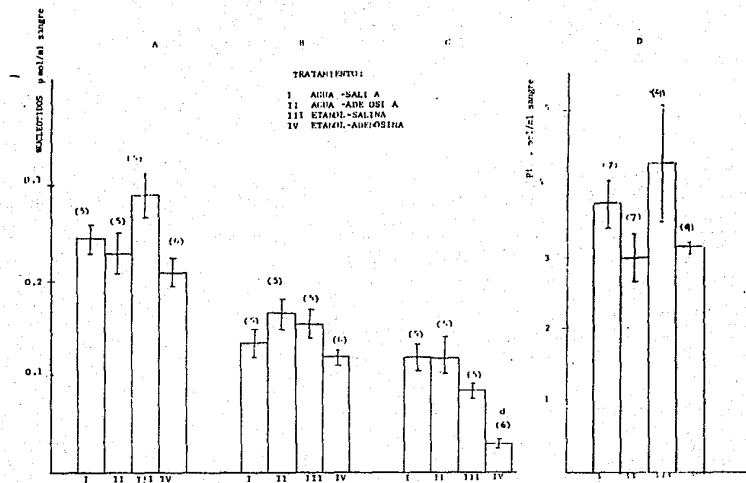


FIG. 12 INCORPORACION DE ADRENALINA Y FOSFORO L.OBICUO, A- ATP B- ADP C- ADP D- FOSFORO INORGANICO (P<sub>i</sub>)

disminución en relación con las de aguasalina, que es significativa al compararla con el grupo de aguasalina, que muestra valores un poco más elevados que el de aguasalina.

#### 40. Niveles de AMF

Como se observa en la Fig. 12 C el tratamiento crónico con etanol, disminuye apreciablemente el valor de AMF con respecto a las de aguasalina, esta respuesta hacia el etanol no es evitada por la adenosina, al contrario parece aumentar los efectos del etanol disminuyendo en forma considerable ( $p < 0.005$ ) los niveles de AMF, como se observa en el tratamiento con etanol-adenosina. La adenosina por sí sola no ejerce ningún cambio en el tratamiento con aguasalina.

#### 41. Niveles de Fosforo inorgánico (Pi)

Como se muestra en la Fig. 13 D, el Pi muestra un ligero incremento, que no es significativo ( $p > 0.05$ ), en el tratamiento crónico con etanol; sin embargo, este efecto del etanol de aumentar el Pi, se evita con el tratamiento de etanol-adenosina donde se observa una disminución discreta de Pi. Lo mismo se ve con el tratamiento con aguasalina, el Pi disminuye levemente con respecto al tratamiento con aguasalina.

#### 42. Anestros energético:

##### 13. Relación ATP/ADF

En la Fig. 13 A. se observa que no existen cambios significativos de la relación ATP/ADF, excepto con el tratamiento con agua-adenosina, donde se observa una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la relación con respecto a las de agua-salina.

##### 43. Carga Energética (CE).-

Por lo que se refiere a la CE, el análisis de la Fig. 10B, indica que el tratamiento crónico con etanol, refleja un ligero aumento en relación con las de agua-salina, y aunado este efecto con el de la adenosina, aumenta más. En el tratamiento de agua-adenosina no hay modificación alguna.

##### 44. Potencial de Fosforilación (PF)

En la Fig. 13C, viene indicado el PF del eritrocito, y se observa que el etanol no tiene un efecto real sobre el PF. Con el tratamiento de etanol-adenosina, hay un incremento del potencial, con respecto al control de agua-salina. El grupo tratado con agua-adenosina no ejerce efectos sobre el PF.

#### GLUCOLISIS

Como productos finales de la vía glucolítica del eritrocito están el lactato y el piruvato, por lo que se valoraron estos



metabolitos para determinar la capacidad de oxidación de glucosa del eritrocito después de un tratamiento crónico con etanol.

#### 45. Niveles de Lactato.

En la FIG. 14A, se aprecia la formación de lactato, aumentada de una manera significativa, en el tratamiento crónico con etanol-salina ( $p < 0.025$ ) y etanol-adenosina ( $p < 0.005$ ), en este último caso el incremento es mayor. La respuesta de la célula a la adenosina es aumentar la producción de lactato, como se aprecia en la figura con respecto a las de agua-salina.

#### 46. Niveles de Piruvato.

En la FIG. 14 B, la formación de piruvato muestra una disminución apreciable con los tratamientos que se les aplicó a las ratas en relación con aquellos que sólo recibieron agua-salina. La adenosina por sí sola, baja notablemente ( $p < 0.002$ ) los niveles de piruvato y lo mismo sucede con el tratamiento crónico con etanol, siendo mucho más significativo ( $p < 0.001$ ) en el tratamiento etanol-adenosina.

#### 47. Relación Lactato/Piruvato

Los efectos que ejercen tanto el etanol, como la adenosina sobre la producción de lactato y piruvato, alteran consecuentemente la relación Lactato/Piruvato. ( FIG. 15 C ).

La relación de un valor de 62.4 en ratas tratadas con agua-salina, aumenta 3 veces su valor con el tratamiento crónico con etanol, y aumenta de manera importante al tratar a las ratas con etanol-adenosina. En este caso el aumento observado es de 20 veces mayor que el obtenido en el control. Con el tratamiento de agua-adenosina, hay un incremento de 4 veces el valor obtenidos de las control.

#### 48. Velocidad de Formación de Lactato

Como se muestra en la tabla siguiente, la velocidad de formación de lactato se encuentra aumentada en un 75% por el tratamiento con etanol, con respecto a las tratadas con agua-salina. Sin embargo, el tratamiento conjunto de etanol-adenosina, la velocidad se duplica. Se observa que tanto el etanol como la adenosina aumentan la velocidad de formación de lactato, siendo los efectos aditivos al tratar a las ratas con etanol-adenosina.

TRATAMIENTO	VELOCIDAD DE FORMACIÓN DE LACTATO µMol/ml.Sangre/minuto	%
AGUA-SALINA	0.020	100
AGUA-ADENOSINA	0.028	140
ETANOL-SALINA	0.035	175
ETANOL-ADENOSINA	0.043	264

TABLA 7. Velocidad de formación de lactato en eritrocitos de animales tratados crónicamente con etanol.

**EXPERIMENTO  
"IN VITRO"**

**EFECTO DEL  
ETANOL Y  
ACETALDEHIDO  
EN EL  
METABOLISMO  
DEL ERITROCITO**

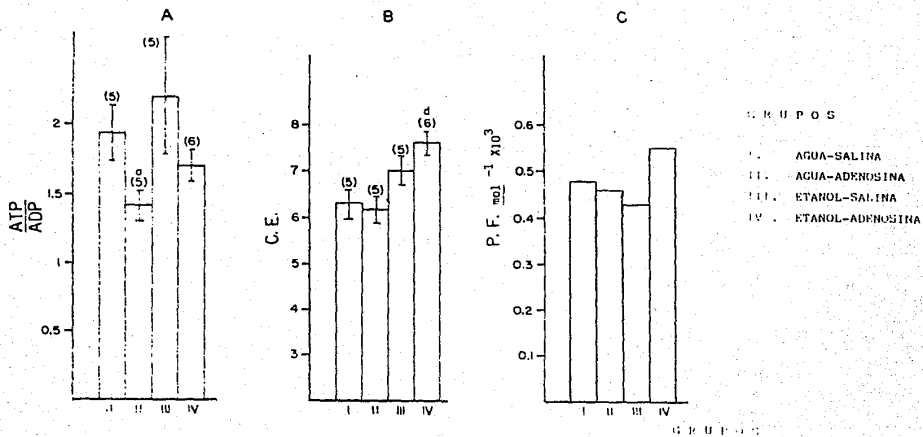


FIG. 13. PARAMETROS ENERGETICOS EN ERITROCITOS DE RATAS CON TRATAMIENTO ANTIBIOTICO CON ETANOL (INCUBADOS 2 H.).

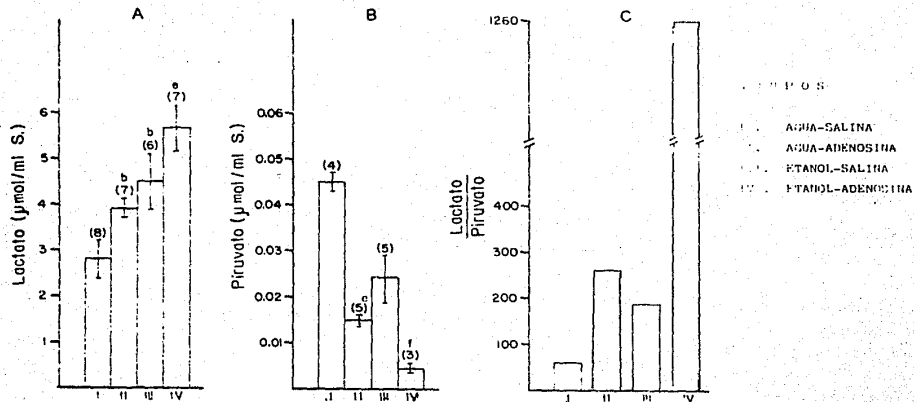


FIG. 14 NIVELES DE LACTATO -A; B=PIRUVATO Y C=LACTATO/PIRUVATO EN EL TERCER DÍA DE RATAS CON TRATAMIENTO CRONICO CON ETANOL.

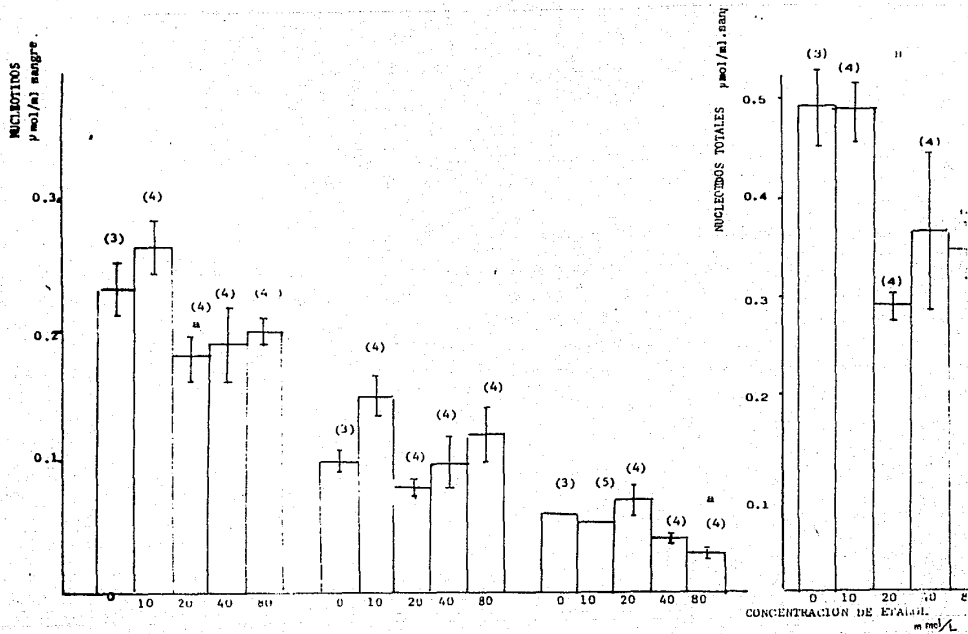


FIG. 15 Niveles de nucleótidos de Adenina (ATP = A. B=ADP C= ANP D=Nucleótidos de Adenina totales

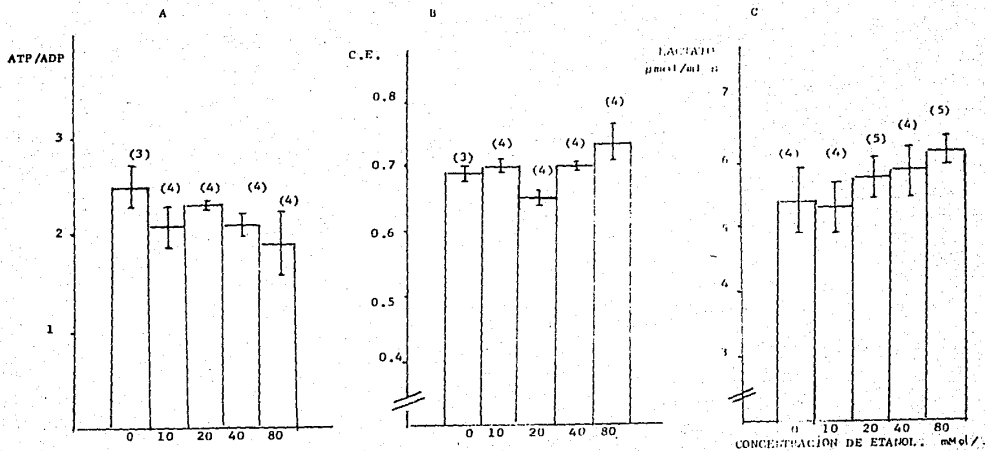


FIG. 16 PARAMETROS ENERGETICOS DE ERITROCITOS DE RATAS NORMALES INCUBADOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ETANOL.  
 A=ATP/ADP B= CARGA ENERGETICA (C.E.) C= LACTATO

DETERMINACION DE LOS EFECTOS DEL ETANOL Y EL ACETALDEHIDO EN  
LOS ERITROCITOS. EXPERIMETNO "IN VITRO"

Se ha hablado mucho sobre los efectos que las intoxicaciones crónicas y agudas con etanol causan sobre los diversos órganos del cuerpo [11,13,15,18 ]. En el trabajo actual, se investigaron los efectos "in vivo" que ejerce el etanol sobre el metabolismo de los eritrocitos en ratas con tratamiento agudo y crónico con etanol. Existe gran controversia sobre si la alteración del metabolismo eritrocítico es un reflejo de un daño hepático o si es un efecto directo del etanol o su metabolito, el acetaldehido. La acción de este último ha sido incriminada en manifestaciones severas del alcoholismo, como por ejemplo:

- Formación de falsos neurotransmisores
- Estimulación de la síntesis de colágena
- Mutagenicidad
- Inhibición de síntesis de proteínas cardíacas. [ 34,35 ]

La concentración mínima de etanol en la sangre que causa intoxicación es de 20 mmol/L [36], además que en trabajos previos en nuestro laboratorio [32] se utilizan concentraciones de etanol de 25 mmol/L, por lo que para ver el efecto directo del etanol sobre los eritrocitos se usaron concentraciones que oscilan alrededor de éstas. En cuanto al acetaldehido, la concentración mayor que se ha detectado en sangre en personas alcohólicas es la de 200  $\mu$ molar, tomándose como referencia esta concentración .



Se llevó a cabo un experimento "in vitro", incubando los glóbulos rojos con diferentes concentraciones de etanol y de acetaldehído, para determinar cual de ellos causó un mayor daño en los eritrocitos.

Para este experimento se emplearon ratas Wistar, peso aproximado de 180-200 g, mantenidas en ayuno durante 18-20 horas y sacrificadas por decapitación. La obtención de la muestra fue la misma que se utilizó durante los experimentos "in vivo".

El medio de incubación para los eritrocitos, fue el siguiente:

-Solución de Krebs-Ringer, ajustada a pH 7.4, a la cual previamente se le pasó una mezcla de  $O_2/CO_2$  durante 10 minutos.

-Glucosa a una concentración 10 mmol/L

-Concentraciones variables de etanol o acetaldehído:

etanol	10 mmol/L	Acetaldehído	25 $\mu$ mol/L
	20 "		50 "
	40 "		100 "
	80 "		200 "

-Un control sin etanol ni acetaldehído.

Se incubaron durante 2 horas a 37° C en un oscilador metabólico. Las muestras se desproteinizaron y se neutralizaron de la misma manera que se hizo en los

experimentos "in vivo".

Las determinaciones que se llevaron a cabo, fueron:

-Nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP)

-Lactato

De estas determinaciones se obtuvieron los parámetros energéticos y los niveles de lactato producidos durante la incubación.

Los resultados encontrados son los siguientes:

Efectos directos del etanol sobre el metabolismo del eritrocito. Experimento "in vitro"

#### 41. Nucleótidos totales.-

En la Fig. 15 D, se muestran los valores de nucleótidos totales a las diferentes concentraciones de etanol; en general los valores disminuyen, siendo más marcado este efecto a una concentración de 20 mmol/L con respecto al control. No se observa cambio a una concentración de 10 mmol/L.

#### 42. Niveles de ATP

En el análisis de la Fig. 15 A, se observa que el etanol a una concentración de 20 mmol/L disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) los niveles de ATP, en relación con los eritrocitos sin etanol, y éstos se mantienen disminuidos a concentraciones mayores de etanol. En la figura se observa

que a una concentración de 10mmol/L, los niveles de ATP aumentan con respecto al control y a las demás concentraciones de etanol.

#### 43. Niveles de ADP

Como se observa en la Fig.15 B, el ADP sólo se ve ligeramente disminuido a una concentración de 20 mmol/L de etanol, y aumenta a una concentración de 10 mmol/L de etanol. No hay respuesta a las concentraciones 40 y 80 mmol/L.

#### 44. Niveles de AMP

En la Fig. 15 C, no se observan modificaciones significativas de AMP con tratamiento a diferentes concentraciones de etanol con respecto al control: hay una disminución significativa ( $p<0.05$ ) con 80 mmol/L. de etanol.

#### 45. Relación ATP/ADP

En lo que se refiere a la relación ATP/ADP, en la Fig.16A se indican disminuciones no muy marcada de esta relación con respecto al control.

#### 46. Carga Energética . (CE).

El efecto del etanol sobre la carga energética se muestra en la Fig.16B y sólo se observa una disminución discreta con

una concentración de etanol de 20 mmol/L, las demás concentraciones mantienen prácticamente constante su CE en relación con el control .

#### 47. Niveles de Lactato

Analizando la Fig.16 C los niveles de lactato se mantienen relativamente constantes a las diferentes concentraciones de etanol.

### Efecto del acetaldehído sobre el metabolismo del eritrocito. Experimento "in vitro"

#### 48. Niveles de Nucleótidos totales

En la Fig.17 D se presentan los niveles de nucleótidos totales, los cuales disminuyen significativamente ( $a=p<0.05$ ,  $b=p<0.025$ ) en eritrocitos incubados con acetaldehído conforme a los del control.

#### 49. Niveles de ATP

El análisis de la Fig.17 A muestra los efectos del acetaldehído sobre los niveles de ATP, siendo significativa la disminución ( $a= p<0.05$ ,  $b= p<0.025$ ) a concentraciones mayores de 50  $\mu$ Molar, y más marcada conforme aumenta la la concentración de acetaldehído.

### 50. Niveles de ADP

El acetaldehído disminuye gradualmente los niveles de ADP conforme aumenta su concentración estabilizándose en las concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{mol/L}$ .

### 51. Niveles de AMP

Los niveles de AMP, también se muestran afectados por el acetaldehído, como se observa en la Fig.17 C, disminuye significativamente a una concentración de 50 y 200  $\mu\text{mol/L}$  y se mantiene ligeramente disminuido en las demás concentraciones.

### 52. Relación ATP/ADP

Observando la Fig. 18A, a concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{mol/L}$  de acetaldehído, la relación ATP/ADP muestra un incremento, siendo significativa ( $p < 0.05$ ) la de 50  $\mu\text{mol/L}$  en relación con el control, mientras que a concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{mol/L}$  la relación no se afecta.

### 53. Carga Energética. (CE) -

La carga energética no se ve alterada por la incubación con acetaldehído, por el contrario en las dos primeras concentraciones (25 y 50  $\mu\text{mol/L}$ ) aumenta y en las de 100 y 200  $\mu\text{mol/L}$  sólo se manifiesta un aumento ligero.

#### 54. Niveles de Lactato.-

En la Fig.18 C., se indica que a concentraciones de 50  $\mu\text{mol/L}$ , el lactato aumenta considerablemente ( $p < 0.05$ ) con respecto al control, sin embargo, a concentraciones más elevadas de acetaldehído (100 y 200  $\mu\text{mol/L}$ ), el lactato tiende a bajar a niveles menores que el control.

**EXPERIMENTO  
"IN VIVO"**

**DETERMINACION DE  
LACTATO**

**EN SANGRE TOTAL  
PLASMA  
Y ERITROCITOS**

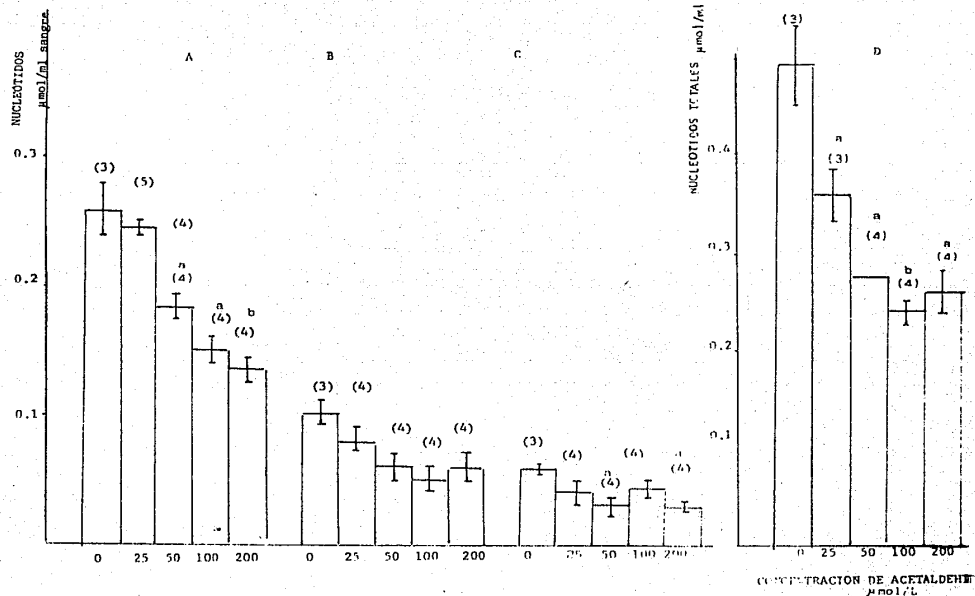


FIG. 17 NUCLEÓTIDOS DE ADENINA EN ERITROCITOS DE RATA NORMAL TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACETALDEHÍDO.

A=ATP B=ADP C=AMP D=NUCLEÓTIDOS TOTALES



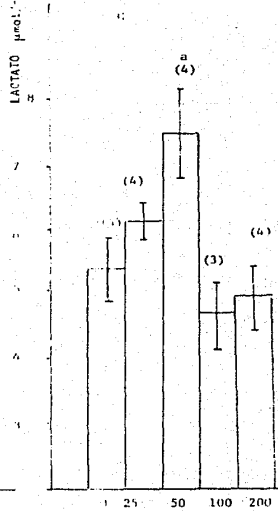
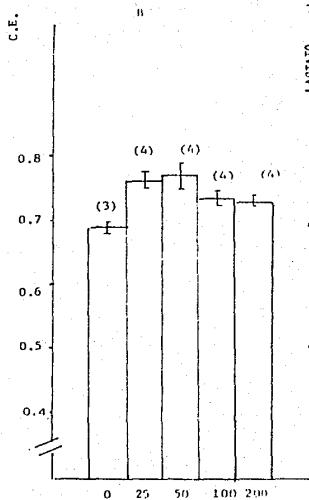
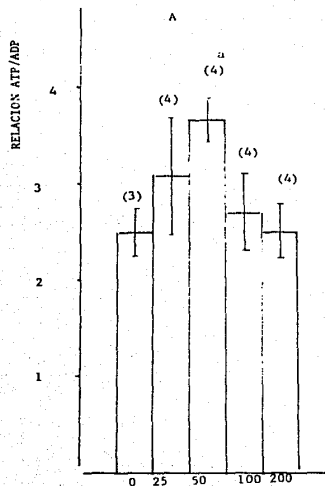


FIG. 18 PARAMETROS ENERGETICOS Y LACTATO EN ERITROCITOS DE RATA NORMAL EXPOSIDOS "IN VIVO" A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACETALDEHIDO .

A= RELACION ATP/ADP      B= LA AGA ENERGETICA (C.E.)      C= LACTATO

EXPERIMENTO "IN VIVO". MODELO AGUDO  
DETERMINACION DE LACTATO EN SANGRE TOTAL.

Existen antecedentes de que durante el daño hepático causado por intoxicación con etanol hay lactacidemia (17). En el trabajo actual se determinó lactato en eritrocitos durante intoxicación aguda y crónica con etanol en ratas, sin embargo, los resultados del lactato en el eritrocito, no representan el lactato total de la sangre, por lo que se diseñó el experimento que a continuación se describe:

Las ratas se sometieron al tratamiento agudo con etanol, y se determinó lactato en:

- a) sangre total,
- b) plasma y
- c) eritrocitos.

El modelo agudo de la intoxicación con etanol se describe en el capítulo de materiales y métodos. Al obtenerse la sangre, una parte se usó para determinar lactato en sangre total, otra parte se centrifugó y se separó el plasma de los eritrocitos y el paquete globular se lavó con solución salina isotónica. Las determinaciones de lactato se realizaron en extractos perclóricos de la sangre total, plasma y eritrocitos.

Los resultados que se obtuvieron son los siguientes.

### Lactato en sangre total

Analizando la Fig. 19A, se observa que el tratamiento agudo con etanol, no modifica los niveles de lactato obtenidos en sangre total con respecto a las intactas. Sin embargo, el lactato en sangre total de ratas tratadas con etanol-adenosina, disminuye en relación a las intactas. En el tratamiento con glucosa-salina se observa un incremento importante ( $p < 0.05$ ) de lactato y este efecto de la glucosa es contrarrestado por la adenosina en el tratamiento con glucosa-adenosina, en la cual se mantienen los valores de lactato semejantes al de las intactas.

### Lactato en Plasma

En la Fig 19 B, se muestra el valor de lactato en plasma, en donde se observa que el etanol tiende a disminuir el lactato, mientras que con el tratamiento con etanol-adenosina sólo hay una ligera disminución, la cual no es significativa con respecto a las intactas ( $p < 0.05$ ).

### Lactato en eritrocitos

En la Fig 19C, se observa que el tratamiento agudo con etanol, no muestra un efecto sobre los niveles de lactato. Al tratar a las ratas con etanol-adenosina el lactato en eritrocitos disminuye discretamente con respecto a las intactas. El tratamiento con glucosa-salina aumenta el lactato y este efecto es revertido por el tratamiento conjunto con la adenosina.

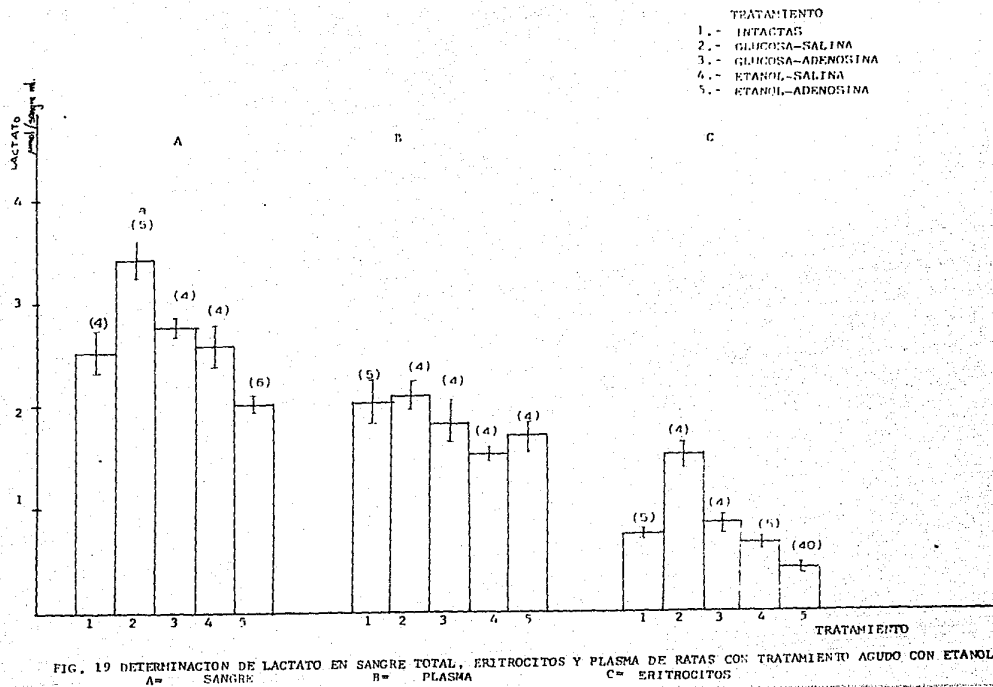


FIG. 19 DETERMINACION DE LACTATO EN SANGRE TOTAL, ERITROCITOS Y PLASMA DE RATAS CON TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL.

## MODELO AGUDO. DISCUSION DE RESULTADOS PREVIOS A LA INCUBACION

Considerando que la sangre constituye un vehiculo de comunicaci3n importante entre todos los tejidos de la economia, siendo el principal transportador de oxigeno a los tejidos, cualquier da1o en su funcionamiento celular por alguna circunstancia end3gena o ex3gena, repercutiria de manera importante en esta actividad funcional.

La mejor evaluaci3n de que una c3lula se encuentra desarrollando adecuadamente su funci3n es que disponga de los mecanismos homeostáticos energéticos necesarios, por lo que nos avocamos a realizar este estudio evaluando parámetros energéticos, actividad metab3lica y reflejo de actividad celular a trav3s de cuantificar los nucleótidos de adenina : ATP, ADP y AMP, f3sforo inorgánico, lactato, piruvato, 2,3-DPG.

-El objeto de determinar los valores previos a la incubaci3n sirven como punto de partida para evaluar la capacidad de formaci3n de estos compuestos despues del periodo de incubaci3n. Desde luego que se considera el proceso de obtenci3n de las muestras, el cual debe afectar los valores individuales de los parámetros estudiados.

- Llamam la atenci3n las modificaciones encontradas en el grupo tratado con glucosa-salina, una disminuci3n de ATP y f3sforo inorgánico con una consecuente elevaci3n de ADP y AMP, con respecto al grupo que no se le dio ning3n tratamiento (Fig. 1), ya que representa el grupo control para el caso del

tratamiento de glucosa-adenosina.

-Los animales que fueron tratados con etanol y etanol-adenosina presentaron una elevación importante de los niveles de ATP, lo que sugiere que los distintos tratamientos repercuten en los mecanismos reguladores y formadores de ATP. Estas modificaciones se manifiestan en los parámetros energéticos, tales como la carga energética (CE), y el Potencial de fosforilación (PF).

-La disminución de los parámetros energéticos en el grupo tratado con glucosa, se acompaña de un aumento muy importante en el contenido de lactato de estos eritrocitos, puede reflejar un estado de hipoxia, posiblemente por cambios de pH a través del acumulo excesivo de lactato; en estas condiciones los niveles de 2,3-DPG no se modifican de manera importante (Fig. 2,3 y 4).

-El tratamiento con etanol-adenosina, refleja un aumento discreto en los niveles de ATP, aunque es más notable su acción en la valoración del estado REDOX de la célula, calculado por la relación Lactato/Piruvato, en ésta se observa un aumento importante en los niveles de sustrato oxidado (piruvato) (Fig.3). Estos cambios observados con el etanol, no se reflejan en los niveles de 2,3-DPG (Fig.4) consecuentemente en la afinidad del oxígeno por la hemoglobina, si se considera que este metabolito es un indicador de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y su funcionalidad.

MODELO AGUDO. DISCUSION DE RESULTADOS DESPUES DE LA  
INCUBACION.

Es importante considerar la plasticidad del metabolismo del eritrocito, ya que después de incubarlo en condiciones adecuadas, las disminuciones observadas en los parámetros energéticos ( ATP, ADP, CE y PF ) desaparecen hasta alcanzar un equilibrio semejante al de las 4 condiciones experimentales: es decir, el equilibrio recuperado en los eritrocitos de estos animales puede ser a expensas de la disminución de fosforo inorgánico. (Fig.5 y 6)

-Esta capacidad no se manifiesta en los animales tratados con etanol, en los que se observa que el PF está muy disminuido. La adenosina, en presencia de etanol, es capaz de elevar nuevamente el PF, la CE y la relación ATP/ADP. (Fig. 6)

-La actividad glucolítica, evaluada por los niveles de lactato después de 2 horas de incubación no muestra diferencias significativas entre los distintos tratamientos experimentales, aunque el flujo glucolítico evaluado también a través del Piruvato, se ve modificado. Esto se refleja en una elevación de los niveles de Piruvato como sucedió en los animales tratados con etanol-adenosina. (Fig.7)

MODELO CRONICO. DISCUSION DE RESULTADOS PREVIOS A LA  
INCUBACION. EXPERIMENTO "IN VIVO"

El modelo crónico representa animales que durante 8 semanas han estado sujetos a dosis progresivas de etanol.

Con el tratamiento único con etanol no se observaron cambios importantes en los niveles de nucleótidos de adenina, ATP y ADP. El fósforo inorgánico se eleva, observándose que hay una disminución en la CE y en el PF. (Fig. 8 y 9)

-Los animales que fueron tratados con etanol perdieron la capacidad de responder a la adenosina, como se muestra en la Fig. 8 A, B y C, sugiriendo cambios en el efecto de este nucleósido.

-La adenosina eleva la concentración de ATP, la relación ATP/ADP, la CE y el PF; (20), todo este efecto se previene por tratamiento conjunto con etanol. (Fig. 8 y 9)

-En el grupo de ratas tratadas con etanol-adenosina, las modificaciones en los nucleótidos de adenina y fósforo inorgánico son discretas, excepto en el caso de AMP, que disminuye significativamente. (Fig. 8)

-Las modificaciones de los niveles de Lactato y Piruvato en los animales tratados con etanol, no reflejan cambios del estado REDOX, como se puede ver en la relación



Lactato/Piruvato (Fig. 10 ). Sin embargo los animales tratados crónicamente con etanol y a los cuales se les administró adenosina, si reflejaron cambios importantes hacia una disminución significativa de Piruvato, que promueve un incremento notable de la relación Lactato/Piruvato (Fig.10).

-Es de notar que la respuesta de los eritrocitos tratados con etanol-adenosina, es opuesta a la observada con el tratamiento agudo con etanol viéndose nuevamente que la respuesta a la adenosina se ve modificada por el tratamiento crónico con etanol.

-En lo que se refiere a los niveles de 2,3-DPG, únicamente se observaron modificaciones del mismo con el tratamiento de la adenosina, indicando que hay una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, cediéndolo más fácilmente a los tejidos, lo cual no se observó en los demás grupos experimentales (Fig.11).

MODELO CRONICO. DISCUSION DE RESULTADOS DESPUES DE LA  
INCUBACION, EXPERIMENTO "IN VIVO"

-El tratamiento crónico, no afecta significativamente los niveles de nucleótidos de adenina, los niveles de fosforo inorganico ni los parametros energéticos. (Fig.12 y 13).

-Cuando se valoró la actividad glucolítica, se observó con el tratamiento con etanol, un aumento importante de lactato simultáneo a la disminución de Piruvato, por lo que sí se modifica la relación Lactato/Piruvato. (Fig.14).

-La adenosina per se, produce efectos equivalentes en Lactato, Piruvato y la relación Lactato/Piruvato, pero cuando se administró con el etanol, se observó más claramente la formación del lactato y una disminución del Piruvato, detectándose una respuesta opuesta a la que se dió en el modelo de intoxicación aguda.

EXPERIMENTO "IN VITRO". EFECTO DEL ETANOL Y ACETALDEHIDO EN  
EL ERIIROCITU".

-Las modificaciones encontradas sugieren cambios en el metabolismo del eritrocito despues de la administración aguda y crónica con etanol. Tratando de discernir si los cambios observados son debido a:

-Un reflejo de las alteraciones en otros tejidos. Principalmente del hígado

- O a efectos directos del tóxico o de su principal metabolito, el acetaldehido, sobre el metabolismo de la célula roja.

Se hicieron experimentos "in vitro" para tratar de aclarar este punto.

El etanol sólo promueve cambios significativos en los nucleótidos de adenina a una concentración de 20 mmol/L a 80 mmol/L. (Fig.15)

-Sin embargo, cuando se aplicaron diferentes concentraciones de acetaldehido, se encontró que los niveles de nucleótidos de adenina si se afecton marcadamente, siendo la disminución dócis -respuesta. (Fig.17)

-Llama la atención, de manera importante, que ante las disminuciones de ATP, ADP y AMP, el equilibrio entre éstos no se pierde, como lo reflejan la invariabilidad de los parámetros energéticos observada a diferentes concentraciones de acetaldehido. (Fig.18)

-El aumento de lactato a concentraciones 15 y 50  $\mu\text{mol/L}$  de acetaldehído puede estar ligado a la recuperación de rec oxidación de NADH por la aldehído deshidrogenasa, acelerando de esta manera la formación de lactato a partir de piruvato por la lactato deshidrogenasa, sin embargo a concentraciones mayores de acetaldehído (100 y 200  $\mu\text{mol/L}$ ) el lactato disminuye pudiendo deberse a una menor disponibilidad de equivalentes reductores, o que a concentraciones mayores de acetaldehído, este pueda estar dañando la acetaldehído deshidrogenasa del eritrocito o en su defecto a posible inhibición de la lactato deshidrogenasa por exceso de sustrato.

-Al haber una disminución de lactato a concentraciones elevadas de acetaldehído (100 y 200  $\mu\text{mol/L}$ ) hay una menor producción de ATP, por lo que la relación ATP/ADP se ve afectada manifestándose por una disminución.

#### MODELO AGUDO. DISCUSION DE RESULTADOS DE LACTATO EN SANGRE TOTAL, PLASMA Y ERITROCITOS

-Es de llamar la atención, el aumento de lactato en la sangre total en el grupo de glucosa-salina, que puede deberse a un aumento en el metabolismo del eritrocito. (Fig.19A)

**4. DISCUSSION**

**Y**

**CONCLUSIONES**

## C O N C L U S I O N E S

-El tratamiento con etanol-adenosina si ocasiona desajustes en el Estado REDOX del eritrocito.

-Existe un efecto opuesto de la adenosina en la relación Lactato/Piruvato, en animales tratados en forma crónica y aguda con etanol.

-Una posible explicación de la respuesta opuesta a la adenosina en los 2 modelos experimentales en cuanto al estado REDOX, es precisamente en cuanto al metabolismo del etanol; es decir, en la intoxicación aguda con etanol, la oxidación se lleva a cabo preferencialmente por medio de la alcohol deshidrogenasa (ADH), produciéndose equivalentes reductores (NADH) lo cual posiblemente se vea reflejado en sangre. En la intoxicación crónica con etanol, se promueve el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS), el cual sólo funciona a concentraciones elevadas de este metabolito en la sangre, como en el caso de una intoxicación crónica. Por lo que la respuesta a la adenosina será diferente en los dos modelos experimentales.

-Las modificaciones metabólicas encontradas "in vitro" explican efectos directos del acetaldehído sobre los nucleótidos de adenina, pero no sobre el equilibrio energético del eritrocito.

-En ratas con tratamiento agudo con etanol, no se manifestó elevación de lactato en sangre, plasma y eritrocitos.

-El tratamiento con glucosa no funciona como control, por ser una sustancia que acelera ciertos procesos metabólicos.

А П Е Х О



# **3. Resultados**

## RESULTADOS

El tratamiento agudo con etanol afecta los mecanismos reguladores de la formación de ATP, reflejándose en un aumento de los nucleótidos totales (NT), del 40 %, y una disminución de la relación ATP/ADP; sin embargo la disminución de los niveles de fósforo inorgánico (Pi) origina un aumento del potencial de fosforilación (PF).

Cuando se administra simultáneamente adenosina con el etanol, no se modifica significativamente el efecto del etanol.

No así cuando evaluamos el estado REDOX de la célula, con la relación lactato/piruvato (L/P), el etanol sólo baja los niveles de estos metabolitos pero el índice se incrementa en un 50%. Cuando se administra adenosina, disminuye esta relación debido a un aumento de los niveles de piruvato, revirtiéndose de este modo el efecto del etanol.

El aumento de 2,3-DPG inducido por el etanol se sigue observando con la adenosina y aunque es discreto sugiere una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

Para resumir los cambios inducidos por el etanol, se observa una modificación del equilibrio de los nucleótidos de adenina, se afecta el estado REDOX de la célula y disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El tratamiento con adenosina, sólo modifica el estado REDOX inducido por el etanol.

Es importante que la célula proveniente de tratamiento con etanol, mantiene una velocidad de formación de lactato igual al control y que con adenosina esta se encuentra disminuida.

Los eritrocitos provenientes de animales tratados crónicamente con etanol, presentan un aumento de 45 % de los nucleótidos totales sin modificar los parámetros energéticos. Si los animales se tratan con adenosina se observa una disminución de nucleótidos totales con aumento de los parámetros energéticos.

La valoración del estado REDOX refleja que el tratamiento crónico con etanol no lo cambia, pero en presencia de la adenosina, se observa un efecto de disminución de piruvato y un aumento de la relación L/P.

Observaciones similares se tienen al incubarse los eritrocitos de animales tratados crónicamente con etanol. No hay cambios significativos en los niveles de 2,3-DPG por el tratamiento crónico con etanol.

El eritrocito de rata normal incubado en presencia de diferentes concentraciones de etanol, no manifiesta cambios significativos en cuanto a los nucleótidos de adenina, los parámetros energéticos y los niveles de lactato, excepto a una concentración de 20 mmol/L en donde se observa una disminución de NT acompañada de una disminución de los niveles de ATP.

Los eritrocitos incubados en presencia de acetaldehído muestran cambios en los mecanismos formadores de GTP reflejándose en una disminución general de los nucleótidos de adenina, ATP y ADP, principalmente, manteniéndose los parámetros energéticos.

El tratamiento agudo con etanol "in vivo", no modifica los niveles de lactato en sangre total y eritrocitos, mientras que en plasma tiende a disminuirlos.

**OBJETIVO:**

-Estudiar el efecto de la administración aguda y crónica de etanol en el metabolismo del eritrocito.

-Estudiar el efecto de la adenosina durante tratamiento agudo y crónico con etanol en el metabolismo del eritrocito.

-Ver el efecto directo del etanol y acetaldehído sobre el metabolismo del eritrocito.

TRATAMIENTO	P A R A M E T R O S	
	LACTATO *	PIRUVATO *
AGUA-SALINA	2.81 ± 0.37 (8)	0.045 ± 0.002 (4)
ETANOL-SALINA	4.5 ± 0.63 (6)	0.024 ± 0.005 (5)
ETANOL-ADENOSINA	5.67 ± 0.47 (7)	0.0045 ± 0.001 (3)
AGUA-ADENOSINA	3.9 ± 0.21 (7)	0.015 ± 0.001 (5)

TABLA 18 . Producción de lactato y piruvato de eritrocitos de animales tratados crónicamente con etanol .

\*  $\mu\text{mol/ml}$  de sangre

EXPERIMENTOS "IN VITRO"  
R E S U L T A D O S

Tratamiento: Etanol a concentraciones :10,20, 40, 80 mmolar.

Etanol ( )	P A R A M E T R O S				
	A T P *	A D P *	A M P *		ATP/ADP
0**	0.257 ± 0.01 (3)	0.166 ± 0.008 (3)	0.079± (4)	0.007	1.88 ± 0.15 (3)
0	0.233 ± 0.022 (3)	0.100 ± 0.008 (3)	0.060± (3)	0.001	2.51 ± 0.24 (3)
10	0.268 ± 0.022 (4)	0.148 ± 0.016 (4)	0.053± (5)	0.005	2.14 ± 0.22 (4)
20	0.178 ± 0.017 (4)	0.078 ± 0.006 (4)	0.068± (4)	0.014	2.3 ± 0.06 (4)
40	0.189 ± 0.030 (4)	0.098 ± 0.018 (4)	0.037± (4)	0.004	2.1 ± 0.12 (4)
80	0.199 ± 0.01 (4)	0.118 ± 0.020 (4)	0.031± (4)	0.001	1.88 ± 0.35 (4)

TABLA 19. Determinación de nucleótidos de adenina, y relación ATP/ADP en eritrocitos incubados a diferentes concentraciones de etanol.

\*µmol / ml.de sangre

\*\* Eritrocitos sin incubar

	C.E	P A R A M E T R O S				LACTATO
			Nuc.Tot.			
0**	0.71 ± 0.009 (3)	0.553± (3)	0.04 (3)		0.887 ± 0.06 (3)	
0.	0.69 ± 0.010 (3)	0.493± (3)	0.043 (3)		5.39 ± 0.49 (4)	
10	0.70 ± 0.010 (4)	0.490± (4)	0.028 (4)		5.29 ± 0.43 (4)	
20	0.65 ± 0.010 (4)	0.289± (4)	0.016 (4)		5.75 ± 0.27 (5)	
40	0.70 ± 0.004 (4)	0.368± (4)	0.06 (4)		5.85 ± 0.37 (4)	
80	0.737± (4)	0.346± (4)	0.03 (4)		6.13 ± 0.25 (5)	

TABLA 20. Determinación de parámetros energéticos y Lactato en eritrocitos incubados a diferentes concentraciones de etanol.

\* µ mol. /ml.sangre.

\*\* Sin incubar

EXPERIMENTOS "IN VITRO"  
R E S U L T A D O S

Tratamiento: Acetaldehído 25, 50, 100, 200  $\mu$ molar.

**	P A R A M E T R O S								
	A T P		P A R A M E T R O S		A D P		A M P		ATP/ADP
0***	0.257 $\pm$ 0.010 (3)	0.166 $\pm$ 0.008 (3)	0.079 $\pm$ 0.007 (4)	1.88 $\pm$ 0.15 (3)					
0	0.233 $\pm$ 0.022 (3)	0.100 $\pm$ 0.008 (3)	0.060 $\pm$ 0.001 (3)	2.51 $\pm$ 0.24 (3)					
25	0.245 $\pm$ 0.006 (5)	0.080 $\pm$ 0.009 (4)	0.041 $\pm$ 0.012 (4)	3.12 $\pm$ 0.65 (4)					
50	0.184 $\pm$ 0.013 (4)	0.060 $\pm$ 0.009 (4)	0.033 $\pm$ 0.007 (4)	3.65 $\pm$ 0.26 (4)					
100	0.151 $\pm$ 0.011 (4)	0.051 $\pm$ 0.010 (4)	0.044 $\pm$ 0.008 (4)	2.71 $\pm$ 0.45 (4)					
200	0.133 $\pm$ 0.007 (4)	0.06 $\pm$ 0.009 (4)	0.028 $\pm$ 0.003 (4)	2.54 $\pm$ 0.26 (4)					

TABLA 21. Determinación de nucleótidos de adenina y relación ATP/ADP en eritrocitos incubados a distintas concentraciones de acetaldehído.

\*\*\* Sin incubar

**	P A R A M E T R O S		
	C.E .	Nuc.Tot. .	LACTATO .
0***	0.712 $\pm$ 0.009 (3)	0.553 $\pm$ 0.04 (3)	0.88 $\pm$ 0.06 (3)
0	0.69 $\pm$ 0.01 (3)	0.493 $\pm$ 0.043 (3)	5.39 $\pm$ 0.49 (4)
25	0.765 $\pm$ 0.026 (4)	0.362 $\pm$ 0.23 (4)	6.15 $\pm$ 0.29 (4)
50	0.77 $\pm$ 0.012 (4)	0.277 $\pm$ 0.020 (4)	7.5 $\pm$ 0.71 (4)
100	0.735 $\pm$ 0.01 (4)	0.240 $\pm$ 0.016 (4)	4.71 $\pm$ 0.49 (3)
200	0.727 $\pm$ 0.011 (4)	0.259 $\pm$ 0.026 (4)	4.98 $\pm$ 0.51 (4)

TABLA 23. Determinación de parámetros energéticos y Lactato en eritrocitos incubados a distintas concentraciones de acetaldehído.

$\mu$ Mol./ ml.Sangre. \*\* Concentración acetaldehído  $\mu$ mol/L\*\*\* Sin incubar



DETERMINACION DE LACTATO EN SANGRE TOTAL, PLASMA Y ERITROCITOS.

L A C T A T O

TRATAMIENTO

Sangre Total % Plasma % Eritrocitos %

INTACTAS	2.53 ± 0.21 (4)	100	2.02 ± 0.20 (5)	80	0.70 ± 0.033 (5)	27
GLUCOSA-SALINA	3.44 ± 0.16 (5)	"	2.09 ± 0.13 (4)	60	1.50 ± 0.148 (4)	43
GLUCOSA-ADENOSINA	2.77 ± 0.08 (4)	"	1.82 ± 0.19 (4)	65	0.844 ± 0.068 (4)	30
ETANOL-SALINA	2.57 ± 0.13 (4)	"	1.52 ± 0.057 (4)	59	0.642 ± 0.025 (5)	25
ETANOL-ADENOSINA	2.03 ± 0.08 (6)	"	1.68 ± 0.12 (4)	82	0.428 ± 0.025 (4)	21

TABLA 24. Determinación de lactato en sangre total, plasma y eritrocitos de animales con tratamiento agudo con etanol.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato
AMP	Adenosin monofosfato
2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenindinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenindinucleótido reducido
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
β	Beta
GSSG	Glutación oxidado
-SH	Grupo sulfhidrilo
P <sub>i</sub>	Fósforo inorganico
PP <sub>i</sub>	Pirofosfato
IMP	Inosin monofosfato
IgA	Inmunoglobulina A
DNA	Acido desoxirribonucleico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
mmol/L	Milimolar
μmol/L	Micromolar
SSI	Solución salina isotónica
3-PGA	3-Fosfoglicerato
PGK	3-Fosfoglicerato fosfoquinasa
1,3-DPG	1,3-Difosfoglicerato
GAPD	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
G-3P	Gliceraldehido 3-fosfato
A <sub>1</sub>	Absorción inicial
A <sub>∞</sub>	Absorción final

# 5. BIBLIOGRAFIA

- [1]. Herrera, E.P.,  
BIOQUIMICA  
Ed. Interamericana  
1a.ed., pp. 1031-1057.
- [2]. Meyskens, Frank I. and Williams, Hibbard E.  
ADENOSINE METABOLISM IN HUMAN ERYTHROCYTES.  
Bioch. et Bioph. Acta. (1971) 240 , pp.170-179
- [3]. Lerner, Marvin and David Rubistein,  
THE ROLE OF ADENINE AND ADENOSINE AS PRECURSORS FOR ADENINE NUCLEOTIDE SYNTHESIS BY FRESH AND PRESERVED HUMAN ERYTHROCYTES. Bioch.Biophys.Acta. (1970).
- [4]. Brewer, George and John Eaton,  
ERYTHROCYTE METABOLISM : INTERACTION WITH OXYGEN TRANSPORT.  
Science. (1971) Vol. 171 Núm.3977, pp.1205-1211
- [5]. White, Abraham.  
PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA  
Ed. Mc Graw Hill, 6a.edicion. (1982).
- [6]. Chagoya de Sanchez,V.; Hernández-Muñoz,R; Diaz-Muñoz. M.  
CIRCADIAN VARIATIONS OF ADENOSINE LEVEL IN BLOOD AND LIVER AND ITS POSSIBLE PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE.  
Life Science. (1983) Vol.33 No.11, pp 1057-1064
- [7]. Pritchard, J.B. /et al/.  
PURINES : SUPPLY BY LIVER TO TISSUES.  
American Journal of Physiology. (1970). Vol.219 Núm.5 pp.1263-1267.
- [8]. Lerner,Marvin H. and Lowy Bertram  
THE FORMATION OF ADENOSINA IN RABBIT LIVER AND ITS POSSIBLE ROLE AS A DIRECT PRECURSOR OF ERYTHROCYTE ADENINE NUCLEOTIDES  
The J.of Biological Chemistry. (1974). Vol 249 Núm.3 pp. 959-966
- [9] Oski, F.A. /et al/  
RED CELL 2,3-DPG LEVELS IN SUBJECTS WITH HIPOKEMIA  
J.Med. (1969). Vol.280:1165
- [10] Harrison, Thom George, Adams Raymond.  
MEDICINA INTERNA  
Ed.La Prensa Médica Mexicana. ed. Tomo I.  
pp.761-762
- [11].Laurence A. Kaplan,  
QUIMICA CLINICA.  
Ed. Panamericana. (1984)  
Argentina pp.701-720

- [112]. Videla, Luis A. /et al/.  
CITOTOXICIDAD DE MONOBIOTICOS . UN PROBLEMA METABOLICO.  
 BEB. 85 (1985). VOL .IV No.2. pp.35-39.
- [113]. Chan, Thomas C.K. and Sutter, Morley C.  
ETHANOL CONSUMPTION AND BLOOD PRESSURE.  
 Life Science. (1983). Vol. 33 Num.20. pp. 1965-1973.
- [114]. Drill's.  
PHARMACOLOGY IN MEDICINE  
 Ed. Mc.Graw Hill (1971).  
 4 th.ed. USA pp.275-302
- [115]. Edited by M.Fisher and Rankin  
ALCOHOL & THE LIVER  
 Canadian Hepatic Foundation  
 Plenum Press , N.Y.. 1977
- [116]. Larkin, Edwar and Watson-Williams.  
ALCOHOL AND THE BLOOD.  
 The Medical Clinical North America  
 (1984). Vol.68. Num.1 pp.105-119
- [17]. Chagoya de S.Victoria /et al/,  
THE PATHOPHYSIOLOGY OF ALCOHOL AND ACETALDEHYDE METABOLISM  
 IN THE LIVER .  
 E. J. of Clinical Investigation. (1978)  
 Vol 8. pp.263-265.
- [18]. Chagoya de S.,V. /et al/  
IN VIVO MODIFICATION OF THE ENERGY CHARGE IN THE LIVER CELL.  
 Biochem.Biophys.Res Comm . (1972) Vol.46 Num.3 pp. 1441-1445
- [19]. Y. Israel /et al/  
ALCOHOL INDUCED SUCEPTIBILITY TO HIPOXIC LIVER DAMAGE IN:  
 ALCOHOL AND THE LIVER.  
 Canadian Hepatic Foundation. Plenum Press., N.Y. (1977).  
 pp.337-338
- [20]. Arch, R.S. and Newsholme, E.A.  
THE CONTROL OF THE METABOLISM AND THE HORMONAL ROLE OF  
 ADENOSINE.  
 Essays in Biochemistry. (1978). Vol.14 :82-125
- [21]. Haulica I.,  
PRELIMINARY DATA ON THE POSSIBLE HIPNOGENIC ROLE OF  
 ADENOSINE .  
 J. of Neurochemistry. (1972). Vol. 21. pp 1019-1020

- [22]. Fox, Irving.  
THE ROLE OF ADENOSINE AND 2'DEoxyADENOSINE IN MAMMALIAN CELLS.  
Ann.Rev.Bioch. (1978).Vol. 47. pp. 655-686
- [23]. Suárez Munguía, J., Valles, V.E.; Chagoya de S..V.  
EFFECT OF ADENOSINE ON THE SERUM LEVELS OF GLUCOSE, INSULIN AND GLUCAGON IN VIVO.  
The Intern. J.of Biochem. (1987). Vol.19 Núm 1. pp.85-88
- [24]. Berne, R., Roll, T., Rubio, R.  
REGULATORY FUNCTION OF ADENOSINE.  
Martinus Nijhoff Publishers.  
U.S.A. (1983).
- [25]. Harris, R.A., /et al/  
ADENOSINE PRODUCES A DIMINUTION OF TRIACYLGLYCEROLS HEPATIC PRODUCTION LIPIDS.  
(1976). 10: 673-681
- [26]. Hernández Muñoz.R., /et al/.  
ON THE MECHANISM OF ETHANOL INDUCED FATTY LIVER AND ITS REVERSIBILITY BY ADENOSINE.  
Arch.Bioch.Biof. (1978).Vol. 190: pp 155-162.
- [27]. Hernández Muñoz. R.,Glender,Walter; Diaz-Muñoz; García-Sáinz.A  
EFFECTS OF ADENOSINE ON LIVER CELL DAMAGE INDUCED BY CARBON TETRACHLORIDE.  
Bioch.Pharm. (1984) .Vol.33 Núm.16. pp.2599-2604.
- [28]. García-Sáinz A. /et al/.  
MECHANISMS OF THE FATTY LIVER INDUCED BY CICLOHEXIMIDE AND ITS REVERSIBILITY BY ADENOSINE  
Bioch. Pharm. (1979).Vol. 28 pp.1409-1412.
- [29]. García-Sáinz A. /et al/  
EFFECTS OF ADENOSINE ON ETHANOL INDUCED MODIFICATIONS ON LIVER METABOLISM .  
Bioch.Pharm. (1980).Vol. 29 pp.1709-1714
- [30]. Chagoya de Sánchez, V., /et al/  
REGULATION OF FATTY ACID OXIDATION BY ADENOSINE AT THE LEVEL OF ITS EXTRAMITOCHONDRIAL ACTIVATION.  
Bioch. and Biof. Res.Comm., (1977).Vol. 76. pp 804-812.
- [31]. Chagoya de Sánchez,V.and Piña,E.  
ADENOSINE, A GLUCOGENIC AND LIPOGENIC COMPOUND.  
FEBS Letters. (1972).Vol. 19 Núm. 4 pp. 331-334.
- [32]. Hernández-Muñoz,R; Diaz-Muñoz and Chagoya de Sánchez.V.  
IN VIVO AND IN VITRO ADENOSINE STIMULATION OF ETHANOL OXIDATION BY HEPATOCYTES, AND THE ROLE OF THE MALATE-ASPARTATE

SHUTTLE.

Bioch. Bioph. Acta. (1987) Vol. 930. pp 254-263

- [33]. González R., Patricia  
ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE INDUCCION DE GLUCONEOGENESIS Y UREOGENESIS POR ADENOSINA IN VIVO.  
TESIS de Licenciatura. (1987). Facultad de Química, UNAM
- [34]. Baraona, Enrique; Lieber, Charles ;Di Padova, Carlo and Tabasco, J  
RED BLOOD CELLS : A NEW MAJOR MODALITY FOR ACETALDEHYDE TRANSPORT FROM LIVER TO OTHER TISSUES.  
Life Sciences. (1987). Vol 40 Núm 3. pp.253-258.
- [35]. Goth, Andrés.  
FARMACOLOGIA MEDICA.  
Ed. Interamericana.  
Sa. ad., (1977)  
México, D.F., pp 217-254.
- [36]. Hernández-Muñoz, R; García-Sáinz, A; Chagoya de S., V.  
ON MECHANISM OF ETHANOL-INDUCED FATTY LIVER AND ITS REVERSIBILITY BY ADENOSINE.  
Arch. of Biochemistry and Biophysics. (1978) Vol. 190. No. 1 pp.155-162.
- [37]. García-Sáinz, A; Hernández-Muñoz R. and Chagoya de Sánchez, V.  
EFFECTS OF ADENOSINE ON ETHANOL-INDUCED MODIFICATIONS OF LIVER METABOLISM.  
Biochemical Pharmacology. Vol. 29 pp 1709-1714.
- [38]. Travis, Susan F.; Morrison, Anthony D.  
METABOLIC ALTERATIONS IN THE HUMAN ERYTHROCYTE PRODUCED BY INCREASES IN GLUCOSE CONCENTRATION.  
The J. of Clinical Investigation. (1971). Vol. 50 pp.2104-2114.
- [39]. -M.W. Taylor. H.V.; Hershey, R.A.; Levine, K. Co., and S. Olivelle.  
AN IMPROVED METHOD OF RESOLVING NUCLEOTIDES BY REVERSED-PHASE CHROMATOGRAPHY.  
Department of Biology Indiana University.  
Bloomington, Indiana 47405.
- [40]. Liras Martín, Antonio.  
FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION Y SUS APLICACIONES EN BIOMEDICINA.  
BEB. (1985). Vol IV #2 PP.52-58
- [41]. Ham Jürgen, Hchorst,  
Biochem. (1957) Vol. 326, 509.  
In Methods of Enzymatic Analysis (H.U. Bernmeyer)  
Academic Press, New York (1965) pp 266-270.

- [42]. W. Lamprecht and E. Latzko.  
In Methods of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer)  
Academic Press, New York (1965) pp.253-258.
- [43] Lowry OH, Passonneau J.V. ; Schulz D.W.:  
EFFECT OF ISCHEMIA ON KNOWN SUBSTRATES AND COFACTORS OF THE  
GLYCOLITIC PATHWAY IN BRAIN .  
Journal Biol.Chem.(1964). Vol. 239 Nm.18
- [44]. Marion. Stubbs., and Krebs  
CONTROL OF THE REDOX STATE OF THE NICOTINAMIDE-ADENINE  
DINUCLEOTIDE COUPLE IN RAT LIVER CITROPLASM.  
Biochem. Journal (1972) Vol. 126 .pp.59-65