



00361
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

37
Teje.

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DAÑO CELULAR POR ALCOHOLISMO:
PAPEL DE UN ANTI - INFLAMATORIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

MARTHA ZENTELLA MAYER

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EN BIOQUIMICA ENRIQUE PIÑA GARZA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

- 1 - RESUMEN
- 2 - INTRODUCCION
- 3 - METABOLISMO DEL ETANOL
- 4 - CONCEPTO ACTUAL DEL DAÑO CELULAR HEPATICO CAUSADO POR LA INGESTION DE ALCOHOL
- 5 - GENERACION DE RADICALES LIBRES INDUCIDA POR ETANOL
- 6 - MECANISMOS DE PROTECCION CONTRA LOS RADICALES LIBRES.
- 7 - METODOS
- 8 - RESULTADOS
- 9 - DISCUSION Y CONCLUSIONES
- 10 - BIBLIOGRAFIA

Agradezco sobre todo al equipo humano que con un alto espíritu de trabajo y un gran sentido de colaboración me escuchó, criticó, discutió, disintió una y otra vez mis presentaciones ó las de mis alumnos (asesorados en servicio social o en tesis) hasta que se logró la realización de este trabajo. Gracias Yolanda Saldaña B., Aída Hernández T., Alma Rocha H., Raquel Ginzberg P., José Gutiérrez S., Roger Gutiérrez J., Sergio Corona, Antonio Díaz, Eugenia, Cecilia, Asunción, Marcela, Norma, Claudia, Rosalba, Armando Díaz Belmont, Lucelly Rodríguez L., Héctor Riveros y Enrique Piña Garza.

1

RESUMEN

Esta tesis versa sobre el control de las alteraciones celulares producidas durante la intoxicación con etanol, mediante el empleo de un antiinflamatorio no esteroideo. Inicialmente se plantea la importancia del alcoholismo con base en que el alcohol es el tóxico de mayor consumo en el mundo y es causante de gran número de muertes en personas en edad productiva.

El metabolismo del etanol y las hipótesis que se han postulado para explicar el por qué se lesiona el hepatocito, son cubiertos mediante la información más actual.

Las evidencias experimentales revisadas permiten apuntar hacia la generación de radicales libres como iniciadora de la degradación peroxidativa de los ácidos grasos insaturados estructurales de las membranas celulares. A partir de estos hallazgos se abren varias posibilidades de manejo como son el empleo de sustancias atrapadoras de radicales libres o bien, de sustancias capaces de aumentar las defensas antioxidantes de la célula para contrarrestar el daño producido por radicales libres.

En la parte experimental de este trabajo se describe un modelo de intoxicación aguda con etanol en la rata, que se valora a través de varios indicadores metabólicos. Al administrar el etanol junto con el antiinflamatorio se logra el control de los parámetros modificados por la acción del etanol. Tiene especial importancia la inhibición de la lipoperoxidación y la restauración de los niveles de glutatión disminuídos por el etanol.

Por último, se discuten los resultados a la luz de la bibliografía más reciente sobre el tema y se concluye que deben ser explorados nuevos enfoques terapéuticos para el posible manejo de las alteraciones hepáticas producidas por el consumo exagerado del etanol. Cabe mencionar que los antiinflamatorios no esteroideos es el grupo de drogas más empleado como agentes terapéuticos por la humanidad.

INTRODUCCION

En este trabajo se intenta profundizar en el conocimiento del daño celular por alcoholismo, sus posibilidades de control y de revertir este proceso.

A pesar de que la ingestión de bebidas alcohólicas ha acompañado a la humanidad desde los primeros años de su existencia, en las diversas culturas que se establecieron sobre nuestro planeta, nunca como ahora el alcoholismo ha sido causa de un problema social y económico muy serio porque afecta la salud de, sobre todo, hombres cada vez más jóvenes (1). Aunque las estadísticas recientes, particularmente en países desarrollados, indican que también se está dando un incremento de mujeres alcohólicas (2) y sigue siendo mayor el problema entre individuos del sexo masculino. En México, en la Clínica de Atención de Problemas Relacionados con el Alcoholismo (CAPRA) del Hospital General de México se mantiene una relación de 8:1. Las edades más frecuentes en las que aparece es entre los 30 y los 50 años. Todos los estratos socioeconómicos se ven afectados por el alcoholismo (1).

El daño ocasionado por el alcoholismo incluye patología que afecta diversos órganos y tejidos, por ejemplo a nivel del cerebro, del estómago, del páncreas, la sangre, y el hígado. Concretamente al daño celular hepático es al que se hará referencia en esta tesis por dos razones; primera: porque el metabolismo del alcohol se realiza principalmente en el hígado. La segunda es que es el órgano más frecuentemente afectado por la ingestión consuetudinaria de etanol.

El término "alcoholismo" lleva la connotación de hábito y efectivamente es la costumbre exagerada de consumir etanol en forma consuetudinaria la que generalmente conduce al daño celular. Existe otra situación, como es el caso de gente joven no habituada a ingerir bebidas alcohólicas y que una de las primeras veces que lo hace es a través de una intoxicación aguda que en ocasiones la conduce a la muerte. Con ciertas restricciones menores, ambas situaciones: el modelo de intoxicación aguda y el alcoholismo crónico son reproducibles en animales de laboratorio. De ello nos servimos para la realización de este trabajo.

En una primera parte se abordará el metabolismo del etanol en las células del hígado y las enzimas que participan en su oxidación. A continuación se plantea el daño celular hepático por alcoholismo, tal como ahora se concibe. En seguida se indican los métodos empleados. Posteriormente se incluyen los resultados *in extenso*, parte de los cuales han aparecido en una publicación reciente (3). Sobre la discusión, ésta se basa en la comparación de los resultados con los de la literatura internacional y se incluyen sus posibilidades de aplicación, sobre todo en la etapa inicial del daño ocasionado por el alcoholismo en el hígado.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

Si el daño celular producido por el alcoholismo esta mediado por radicales libres del oxígeno, formados en exceso, un atrapador de radicales libres, que ha demostrado su eficiencia en otros sistemas, será capaz de atenuar o controlar el daño cuando se administre en forma simultánea con el hepatotóxico.

OBJETIVOS

Se pretende confirmar que la naturaleza del daño hepático producido por el etanol tiene como base una producción exagerada de radicales libres del oxígeno, que rebasa los mecanismos naturales de protección que existen en un organismo e inducen la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos estructurales de la membrana celular, para:

También demostrar *in vivo* la habilidad de un antiinflamatorio no esteroideo como atrapador de los radicales libres hepáticos generados por el alcohol, o bien, como bloqueador de la producción de los mismos, con objeto de conocer sus posibles cualidades hepatoprotectoras en un diseño experimental de intoxicación aguda por etanol.

METABOLISMO DEL ETANOL

El etanol es una molécula pequeña, miscible con el agua y los lípidos que posee una desigual distribución de sus cargas, lo que la hace ser polar. Todo lo anterior permite al etanol moverse con gran facilidad a través de las membranas celulares, de tal forma que su concentración se equilibra rápidamente entre la sangre y los tejidos y sus efectos conductuales se notan a los pocos minutos de haber sido ingerido.

Los efectos de las bebidas alcohólicas en el humano dependen en parte de la cantidad del etanol consumido por unidad de peso corporal. En números redondos 350 ml de cerveza ó 150 ml de vino de mesa ó 45 ml de bebidas alcohólicas 80 "proof" (cognac, vodka, tequila, etc.) contienen 12.5 g de alcohol. Otras sustancias contaminantes que se encuentran en las bebidas alcohólicas pueden contribuir al daño corporal, a corto, mediano y largo plazo, entre ellas se incluyen: metanol, fierro, plomo y cobalto. En el cuadro I se observa una correlación entre el volumen de bebidas ingeridas y las concentraciones de etanol que se alcanzan en sangre, así como sus efectos sobre el comportamiento. La concentración de alcohol en la sangre se expresa en la actualidad en mmoles/L, antes se reportaba en mg/dl (1 mmol/L es igual a 4.6 mg/dl). El etanol es un depresor del sistema nervioso central, tiende a disminuir la actividad neuronal, a pesar de que a bajas concentraciones sanguíneas se observa un efecto estimulante sobre el comportamiento, debido a una depresión de los mecanismos inhibitorios del cerebro. El etanol tiene tolerancia cruzada con otros tranquilizantes y su patrón de comportamiento es parecido

**CUADRO I - CONCENTRACION DE ETANOL EN SANGRE Y
ALGUNOS INDICADORES DEL COMPORTAMIENTO**

Concentración de etanol en sangre mg/100 ml	mmoles/L	Número de bebidas para alcanzar la concentración indicada*	Indicadores aproximados del comportamiento
0-46	0 - 10	2	Ligeramente eufórico
46-92	10 - 20	4	Eufórico, verborreico, ligeramente incoordinado, no debe manejar.
92-138	20 - 30	6	Excitado, con frecuencia agresivo, irreflexivo, irresponsable.
138-230	30 - 50	8 - 10	Deprimido, obviamente incoordinado.
230-460	50 -100	-	Muy deprimido, hay que ayudarlo a caminar
más de 460	más de 100		Límite de tolerancia Peligro de muerte

* Dada la enorme variabilidad a la respuesta al etanol, esta columna de datos aproximados están adaptados a las siguientes condiciones: la unidad de bebida es la copa normal de 45 ml o una botella de cerveza o una copa de vino de mesa; se refiere a la ingestión del número de bebidas ingeridas por un individuo de 65 kilos, en ayuno, que ingiere el alcohol en un período aproximado de 90 a 120 minutos. La situación cambia si el individuo tiene otro peso corporal, si ingiere alimentos o si consume el alcohol a una velocidad diferente.

al de otros depresores del SNC (benzodiazepinas, barbitúricos y otros sedantes e hipnóticos).

ABSORCION Y ELIMINACION

El alcohol se absorbe en cantidades muy pequeñas en la mucosa oral y la esofágica; en el estómago e intestino grueso en cantidades considerables, el sitio principal de absorción es la porción proximal del intestino delgado. La presencia en el intestino de proteínas, grasas y carbohidratos disminuye la absorción del etanol, mientras que ésta aumenta cuando tiene lugar el vaciamiento gástrico, la máxima absorción se observa con soluciones de alcohol al 20%. La absorción se favorece cuando la bebida contiene una menor cantidad de contaminantes ó cuando ha sido sometida a un proceso de carbonatación (por ejemplo el champagne). Entre el 2 y 10% del etanol consumido se elimina directamente a través de los pulmones, orina y sudor, pero la mayor parte del etanol es metabolizado a acetaldehído principalmente en el hígado (4) (fig. 1). Se ha reportado una deshidrogenasa alcohólica en el estómago (5), sin embargo, la actividad de esta enzima durante un consumo elevado de alcohol no resulta importante sino solamente durante el consumo moderado de etanol. Existen al menos 3 rutas metabólicas que permiten oxidar aproximadamente 12.5 g de alcohol por hora, cada una de las rutas muestra una concentración óptima distinta para oxidar al etanol (fig. 2). Se ha descrito otro camino no oxidativo para metabolizar el etanol; en esta vía el etanol se esterifica con ácidos grasos para formar etil ésteres de ácidos grasos (6),

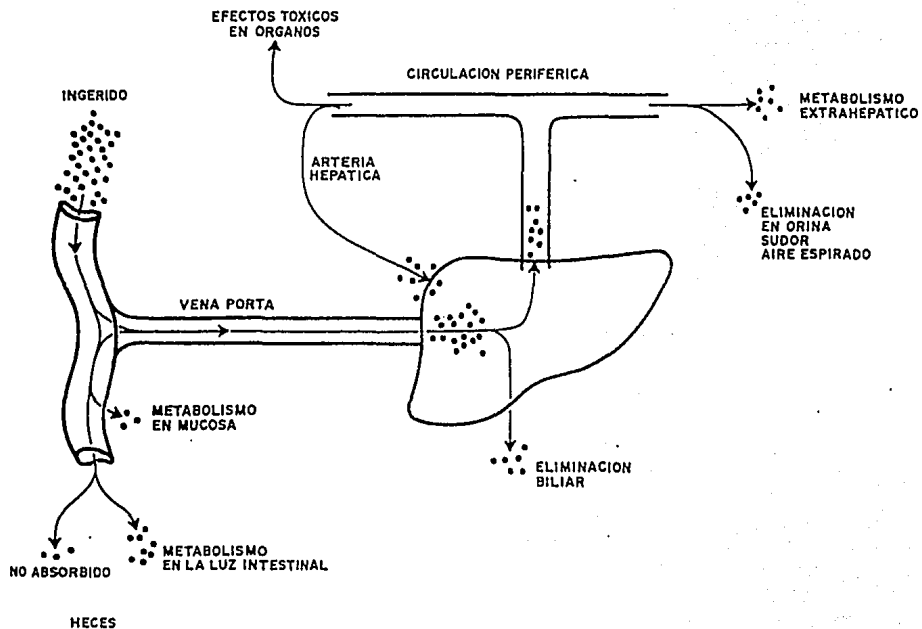


Figura 1 - Sitios de eliminación y metabolismo del etanol.

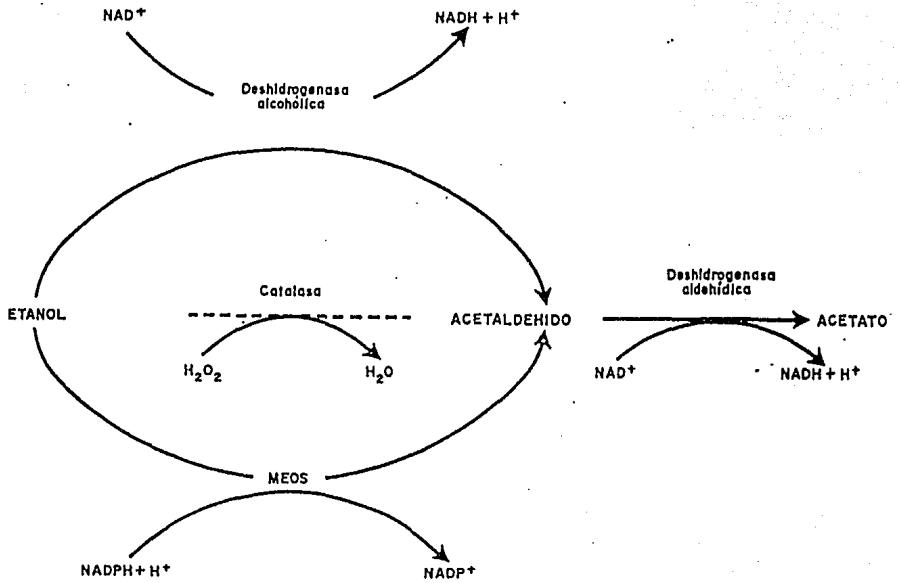


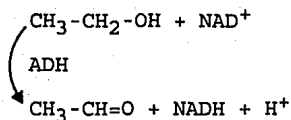
Figura 2 - Caminos hepáticos de la oxidación in vitro del etanol y el acetaldehído.

además esta vía no tiene importancia cuantitativa en el hígado; pero en el páncreas, el corazón y el tejido adiposo, que carecen de las enzimas para oxidar etanol en forma significativa, parece que los etil ésteres de ácidos grasos tienen un papel determinante en el daño inducido por el alcohol (7).

OXIDACION DEL ETANOL POR LA DESHIDROGENASA ALCOHOLICA

La deshidrogenasa alcohólica (ADH: Alcohol: NAD⁺ oxido reductasa, E.C. 1.1.1.1.) fue el primer sistema descrito responsable de la oxidación del etanol. Esta es la principal enzima del metabolismo inicial del etanol en los seres humanos y cataliza la oxidación del etanol hasta acetaldehído en una reacción acoplada a la transferencia de un hidruro al cofactor, que en este caso es la coenzima nicotinamida adenindinucleótido (NAD⁺), la cual se convierte en su forma reducida: NADH. En la reacción se libera un protón.

REACCION:



La ADH contiene zinc y un grupo tiol (-SH), perteneciente a la cisteína, que participa en la reacción. Es inespecífica en cuanto a que oxida también otros alcoholes alifáticos primarios, secundarios y terciarios, así como, a cierto número de alcoholes cíclicos, catalizando también la dismutación de aldehídos (3-β-

hidroxiesteroides). Tiene una amplia distribución en los organismos vivos: (animales, plantas y microorganismos), localizándose en el citosol de las células.

VARIABILIDAD GENETICA DE LA ADH

La ADH presenta una gran heterogeneidad determinada genéticamente, lo que explica la existencia de un amplio polimorfismo enzimático, que junto con otros factores favorecen gran variedad de fenotipos enzimáticos; estos datos le dan una base molecular a la ya referida observación común sobre la diferente susceptibilidad individual al etanol. Existen numerosos reportes en la literatura sobre el polimorfismo de la ADH, en donde se han descrito, además de diferencias individuales, diferencias raciales, sexuales y tisulares. Se han identificado tres clases de isoenzimas, distribuidas en los tejidos de los humanos, la actividad más importante es la encontrada en el tejido hepático; aunque también se localiza en el riñón, el estómago, el intestino y los pulmones (8). En el cuadro II se presentan las clases de isoenzimas hepáticas del humano.

La importancia de la ADH gástrica ha sido enfatizada recientemente en las mujeres (9). La isoenzima gástrica es casi exclusivamente clase III y llega a participar en forma importante en la oxidación del etanol en individuos sanos que ingieren cantidades moderadas de etanol. Su actividad desciende en los alcohólicos, aún es más notable el descenso, en las mujeres alcohólicas. La actividad de la ADH gástrica es modificada por

**CUADRO II - POLIMORFISMO DE LA DESHIDROGENASA ALCOHOLICA (ADH)
HEPATICA DEL HUMANO***

Tipo de enzima	Locus Genético	Alelos	Cadenas peptídicas	Km para el etanol	
I	ADH-1		α	< 5 mM	
	ADH-2		1		β_1
			2		β_2 (Berni)
					β Honolulu
					β Indianapolis
	ADH-3		1		δ_1
2			δ_2		
II	ADH-4	? π		34 mM	
III	ADH-5	? X		muy alta	

*Tomado de la referencia 8

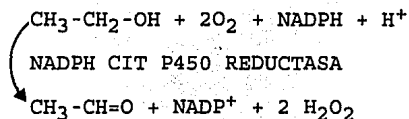
algunos medicamentos, especialmente los bloqueadores de los receptores H_2 , y de ellos, la cimetidina y la ranitidina son los más efectivos (10). También la aspirina inhibe la actividad de la ADH gástrica (11).

La ADH del hígado del humano es la que tiene mayor polimorfismo (Cuadro II); la importancia biológica de este hecho aún no está bien entendida, pero se ha visto que contribuye a las diferencias observadas en la eliminación del etanol *in vivo*.

SISTEMA MICROSOMAL OXIDANTE DEL ETANOL (MEOS)

Una segunda ruta de oxidación del etanol ocurre en el retículo endoplásmico liso con una K_m de 10 mM y puede ser muy importante como sistema detoxificante cuando se alcanzan concentraciones altas de etanol en la sangre. EL MEOS puede inducirse con ingestas repetidas de bebidas alcohólicas, esto es, el consumo crónico del etanol ocasiona en un hígado sano, el aumento en la cantidad de los componentes del MEOS y así se activa la oxidación y por ende se acelera la eliminación del alcohol sanguíneo. En el MEOS el producto final de la reacción es también el acetaldehído, como en el caso de la ADH, pero en este caso se requiere de oxígeno y como coenzima el NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido). Al final de la reacción se genera la forma oxidada de la coenzima: NADP y agua oxigenada.

REACCION:



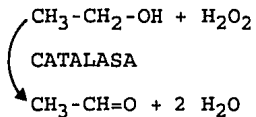
Además de aclararse algunos hechos sobre el metabolismo del etanol que no eran explicables vía ADH exclusivamente, el descubrimiento del MEOS trajo aparejada la caracterización de una forma de citocromo, el P 450 (P450 IIE1), específica para la oxidación del etanol y se adquirió un mayor conocimiento sobre las interacciones de la degradación del etanol con la de varias drogas. La observación inicial hecha por Iseri, en 1964 (12), sobre la proliferación de membranas microsomaes inducida por el consumo prolongado del etanol en las ratas, desencadenó los estudios para demostrar que los microsomas hepáticos podrían ser el sitio para la localización de un sistema distinto e inducible para la oxidación del etanol. Más tarde, este sistema fue demostrado *in vitro* y llamado sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS) por Lieber y De Carli, en 1968 (13). El MEOS participa también en el metabolismo de numerosas sustancias xenobióticas, de aquí que la inducción en la actividad del MEOS por el etanol, guarda estrecha relación con la hepatotoxicidad de varias drogas, carcinógenos y agentes xenobióticos cuyo metabolismo puede estar alterado en los alcohólicos. Se han hecho estudios precisos para barbitúricos, meprobamato, diazepam, aminopirina, tolbutamina, propanol y rifamicina, pero aún quedan

por estudiarse otras interacciones del etanol con numerosos fármacos ampliamente usados en terapéutica.

CATALASA

En épocas anteriores se pensó que la enzima catalasa contribuía de manera importante al metabolismo celular del etanol. Actualmente, mediante el uso de inhibidores potentes de esta enzima (3-amino-1,2,4-triazol), se sabe que su contribución a la degradación del etanol *in vivo*, no tiene importancia cuantitativa ya que al estar inhibida ésta, no se produce cambio alguno en la velocidad de oxidación del etanol, indicando con ello una degradación eficiente por parte de los otros dos sistemas. La actividad principal de la catalasa en el hígado está en los peroxisomas. La oxidación del etanol por esta ruta sucede en una reacción tipo peroxidasa; se produce acetaldehído igual que en las otras dos rutas.

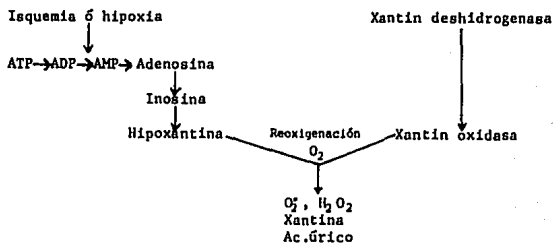
REACCION:



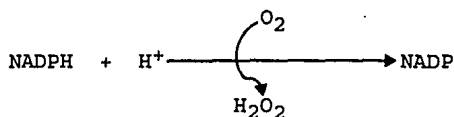
El factor limitante de la reacción parece residir en la disponibilidad del agua oxigenada, que se genera en las reacciones catalizadas por la xantín-oxidasa y por las NADPH oxidasas.

REACCIONES:

A - XANTIN OXIDASAS

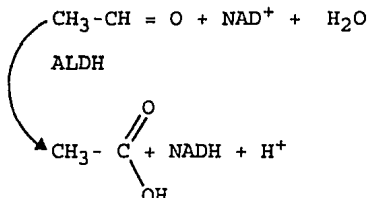


B - NADPH OXIDASAS



OXIDACION DEL ACETALDEHIDO POR LA DESHIDROGENASA ALDEHIDICA

Son numerosas las alteraciones fisiopatológicas relacionadas con la ingesta crónica y exagerada del etanol, que cada vez más se atribuyen al acetaldehído y menos al etanol. El acetaldehído se oxida a acetato en una reacción que tiene también como cofactor al dinucleótido de adenina y niacina: NAD^+ , en ella sucede la transferencia de un hidruro del sustrato al cofactor, y su reducción a NADH . La enzima deshidrogenasa aldehídica (ALDH) cataliza la siguiente reacción:



Otras enzimas del tipo de las flavoproteínas: la aldehído-oxidasa y la xantín-oxidasa, también son capaces de catalizar la oxidación del acetaldehído pero son bastante inespecíficas y

muestran poca afinidad por él.

Sobre las características de la deshidrogenasa aldehídica (ALDH; aldehído: NAD óxido-reductasa, EC 1.2.3) se sabe que puede catalizar la oxidación de otros aldehídos alifáticos de cadena lineal y ramificados, o bien, aromáticos. Racker en 1949 (14) la purificó del hígado de bovino y se definieron dos grandes grupos de ALDH, llamados de alta y baja afinidad, con base en su Km. En los últimos años se han caracterizado en órganos y tejidos de los humanos varias isoenzimas de la ALDH. Estos estudios revelan que hay al menos 4 grupos de isoenzimas de la ALDH con base en su movilidad electroforética (Cuadro III).

CUADRO III - PERFIL DE DISTRIBUCION DE LAS ISOENZIMAS DEL ALDH EN EXTRACTOS DE DIFERENTES ORGANOS, OBTENIDAS POR ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE EN GEL DE ALMIDON.*

	I	II	III	IV
Hígado	++	++	+	++
Pulmón	-	-	++	-
Músculo	+	++	-	-
Corazón	++	-	-	+
Estómago	+	++	++	-
Cerebro	-	+	-	-
Bazo	-	-	+	-
Riñón	++	+	++	++

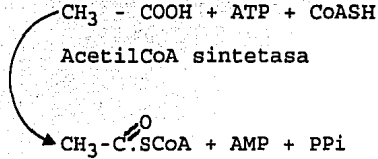
* Modificado de la referencia¹ 8.

DISTRIBUCION CELULAR Y TISULAR

En general se acepta que las isoenzimas con baja Km (ALDH I) están localizadas en la mitocondria y las de alta Km (ALDH II, ALDH III, ALDH IV) en el citosol, por lo que a bajas concentraciones de acetaldehído, tal como ocurre en la intoxicación alcohólica, su oxidación es primordialmente mitocondrial. Las isoenzimas de la ALDH muestran una gran heterogeneidad en su distribución tisular y orgánica. Existen isoenzimas de la forma I y II en el hígado, el riñón, el cuero cabelludo, y los fibroblastos cultivados, mientras que la isoenzima tipo III está presente en el estómago, los pulmones, los testículos y muy poco expresada en el bazo, el hígado, el intestino y la piel.

La placenta contiene las isoenzimas I y II, la actividad predominante es la de ALDH II, que es insuficiente para prevenir el paso del acetaldehído de la sangre materna producido por el metabolismo del etanol al producto. Esto puede ser importante para los posibles efectos del acetaldehído en el síndrome alcoholo-fetal. Las ALDH cerebrales metabolizan aldehídos biogénicos del cerebro humano. Los eritrocitos poseen una isoenzima semejante a la citosólica del hepatocito.

En el hígado, en condiciones fisiológicas, el 90% del acetaldehído ahí sintetizado es rápidamente oxidado a acetato; únicamente en dicho órgano llegan a encontrarse concentraciones fisiológicas elevadas de acetaldehído. A su vez, el acetato sale del hígado y en otros tejidos es convertido en acetyl coenzima A:



En la mayoría de los tejidos extrahepáticos la acetilcoenzima A se oxida en el ciclo de Krebs, mientras que en el hígado y el tejido adiposo con frecuencia es precursora de los ácidos grasos ahí sintetizados.

VARIABILIDAD GENETICA DE LA ADHL

Las observaciones realizadas en la actividad de la ADHL sugieren que existe una variabilidad genética tan grande como la de la ADH. Además, existe un gran polimorfismo enzimático. La isoenzima mitocondrial ALDH I es la más polimórfica. Hay pocos casos reportados de polimorfismo en la forma citosólica de ADHL II y probablemente también existe en la ADHL III. Los estudios en poblaciones orientales, en particular en los japoneses, indican que aproximadamente un 50% tienen una ADHL I deficiente y como consecuencia estos individuos después de ingerir bebidas alcohólicas presentan una alta concentración de acetaldehído en la sangre. Esto puede reconocerse también en la saliva, y en el aliento. Los individuos con ese problema, presentan un cuadro semejante al que sucede en personas normales que reciben inhibidores de la deshidrogenasa aldehídicas (aptabus), aparecen una serie de signos y síntomas que se resumen en el Cuadro IV. La menor incidencia de la enfermedad alcohólica hepática en los

japoneses probablemente esté relacionada con el defecto enzimático, una hipersensibilidad genética mantiene a los individuos en un riesgo menor de convertirse en bebedores (15).

CUADRO IV - SINTOMAS Y SIGNOS DE ALDEHIDISMO

Síntomas	Signos
Mareos	Enrojecimiento de la cara
Sensación de quemadura en el estómago	Depresión cardíaca
Opresión pectoral	Hipotensión
Debilidad Muscular	Taquicardia o bradicardia
Palpitaciones	Vasodilatación Periférica
Sensación de calor en la cara	Elevación de la temperatura corporal
Cosquilleo en los brazos o en los pies	Aumento del flujo arterial

EFEKTOS METABOLICOS OCASIONADOS POR LA OXIDACION DEL ETANOL

La ingestión de una dosis aguda de etanol compromete a todas las vías metabólicas del hígado, el principal órgano responsable de la oxidación del etanol. Es importante considerar que en esas condiciones la oxidación del etanol influye decisivamente sobre otras moléculas oxidables por el propio hígado. El Cuadro V muestra el tipo de moléculas contenidas en un dieta de 2,200 calorías, donde se incluye media botella de vino de mesa. Si bien en la dieta hay más moles de glucosa que de etanol, la glucosa, al igual que los ácidos grasos y las proteínas, son utilizados prácticamente por la totalidad de los tejidos y el etanol es oxidado preferentemente en el hígado, lo cual contribuye a explicar las grandes adaptaciones metabólicas que produce el etanol en ese órgano. A continuación se analizan algunas de ellas.

REOXIDACION DEL NADH.

La velocidad de absorción del etanol y la de la distribución en los tejidos es mayor que la velocidad de oxidación del propio etanol. Por esa razón la concentración del alcohol permanece elevada en la sangre y se manifiestan las características de la intoxicación alcohólica que se consideran como comportamiento anormal del individuo. Los datos experimentales indican que el factor limitante en la velocidad de oxidación del etanol es la reoxidación del NADH citosólico (16).

**CUADRO V - PRINCIPALES NUTRIMENTOS CONTENIDOS
EN UNA DIETA DE 2,200 CALORIAS.**

Nutrimento	gramos	masa molecular promedio	moles	calorías
H ₂ O	2,000	18	110	0
Carbohidratos (como glucosa)	250	180	1.4	1,000
Grasas (como ácidos grasos)	100	275	0.35	900
Proteínas (como aminoácidos)	75	125	0.6	340
Vino * (como etanol)	36	46	0.78	270

* Se consideraron 375 ml, equivalentes a la mitad de una botella de 750 ml, con 12% de etanol y una densidad del etanol de 0.79.

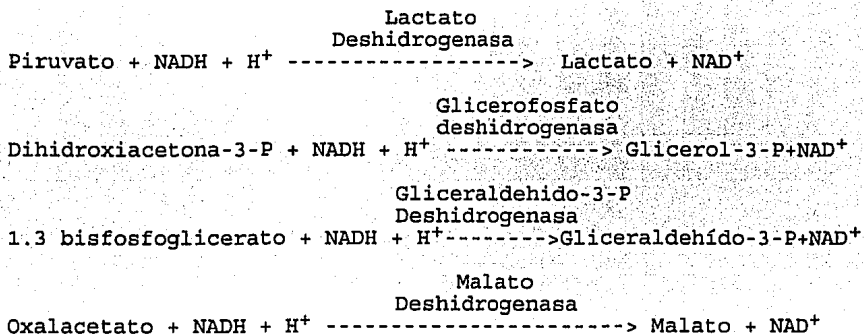
La deshidrogenasa alcohólica se localiza en el citosol del hepatocito, sitio donde se produce una molécula de NADH por cada molécula de etanol oxidado en esta vía. En condiciones basales la relación normal NAD/NADH en el citosol del hepatocito se mantiene cerca de 1,000; la ingestión de una carga aguda de etanol desciende la relación hasta 10 veces (17).

Un aspecto importantísimo de la fisiología de la célula hepática se refiere a que su membrana mitocondrial es impermeable al paso del NADH; por lo tanto, el NADH generado en el citosol no atraviesa la membrana mitocondrial para ser usado como combustible en la cadena respiratoria. En la mitocondria del hepatocito sólo el NADH originado en su seno se emplea en la cadena respiratoria mitocondrial para la síntesis de ATP (18).

Por lo tanto, la oxidación hepática del etanol disminuye la concentración del NAD^+ citosólico, lo que no sólo restringe la conversión del etanol en acetaldehído sino que altera todo el metabolismo al favorecer la formación de los grupos alcohol de otras moléculas a partir de sus respectivos grupos aldehído, por la acción de todas las deshidrogenasas localizadas en el citosol de las células hepáticas. Así, a partir del piruvato y del NADH, con el concurso de la deshidrogenasa láctica, se forma más lactato, que al pasar a la sangre determina la típica hiperlactacidemia comúnmente observada en el individuo intoxicado con etanol.

Son varias las enzimas deshidrogenasas, situadas en el citosol del hepatocito, que pueden catalizar la reoxidación del NADH a NAD^+ . Entre las más importantes, podemos mencionar las que

participan en las siguientes reacciones:



Las 4 reacciones anotadas son reversibles y si bien en condiciones estándar el equilibrio tiende a la formación del alcohol (lactato, malato, glicerol 3P y gliceraldehído 3P) en las condiciones prevalecientes en la célula el flujo metabólico ocasiona la oxidación de los 4 alcoholes anotados y la formación de sus 4 productos de oxidación (piruvato, oxaloacetato, etc) y del NADH. En consecuencia, la regeneración del NAD^+ en el citosol, a partir de las 4 reacciones anotadas, es una solución transitoria. La regeneración del NAD^+ citosólico a partir del NADH se lleva a cabo en la célula hepática por medio de los sistemas llamados de "lanzaderas". Dos lanzaderas se han considerado metabólicamente importantes al ocurrir la degradación del etanol en el hígado, la del glicerofosfato y la del malato-aspartato.

En el sistema del α -glicerofosfato, los electrones y el protón que cede el NADH (H: o hidruro, y en bioquímica también se le conoce como "equivalentes reductores"), se transfieren a la dihidroxiacetona fosfato, un metabolito normal de la glucólisis, con lo que se regenera el NAD^+ citosólico, en una reacción mediada por la deshidrogenasa del α -glicerofosfato, dependiente de NAD^+ y de localización citosólica. Para que el sistema sea efectivo se requiere que el glicerol-3-fosfato vuelva a convertirse en dihidroxiacetona fosfato, lo cual se logra en una reacción catalizada por la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato, localizada en la cara externa de la membrana mitocondrial, la cual tiene como coenzima al FAD (fig. 3). El glicerol-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato permanecen en el citosol, no penetran a la mitocondria y la dihidroxiacetona queda disponible para aceptar otro NADH proveniente del etanol y regenerar más NAD^+ . Respecto a la coenzima, el FAD unido a la enzima de la membrana, se convierte en FADH_2 durante la reacción, los electrones disponibles en el FADH_2 son transferidos a la coenzima Q y de ahí al resto de la cadena respiratoria mitocondrial dando lugar a la formación de 2 moléculas de ATP, en comparación con las 3 moléculas de ATP que pueden generarse a partir del NADH. Por lo tanto, en este sistema, la regeneración de una molécula de NAD^+ tiene la desventaja de disipar la energía equivalente a la síntesis de una molécula de ATP.

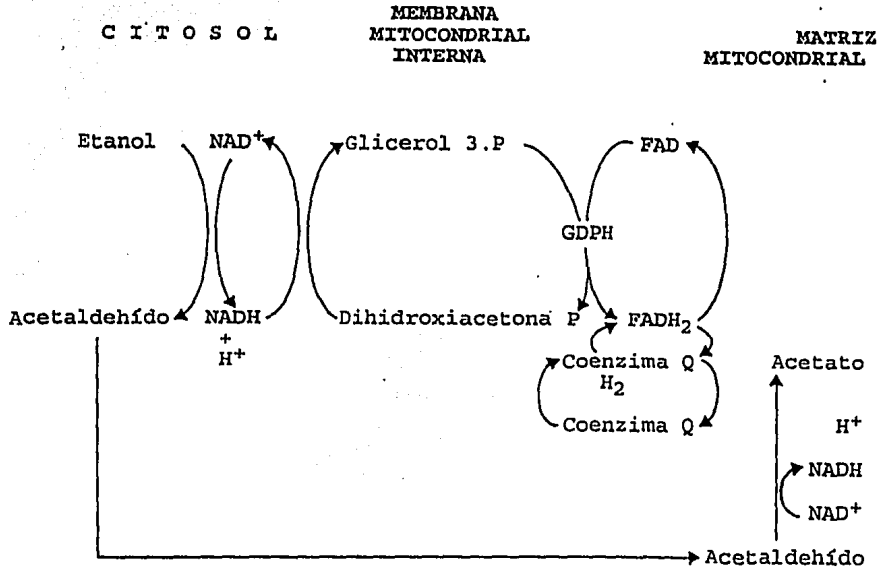


Figura 3 - Transporte de los electrones del NADH del citosol a la mitocondria y regeneración del NAD⁺ en el citosol
GDPH: glicerofosfato deshidrogenasa (forma membranal, dependiente de FAD).

La lanzadera malato-aspartato tiene mayor complejidad; en la figura 4 se presenta en su versión más simplificada. El oxalacetato del citosol se combina con el NADH también del citosol y forman malato y NAD^+ . El malato por un acarreador específico de la membrana mitocondrial, penetra a la matriz de la mitocondria donde se combina con el NAD^+ y regenera oxalacetato y NADH. El NADH del interior de la mitocondria cede sus equivalente reductores a la cadena respiratoria para la síntesis de ATP y se transforma en NAD^+ ; el oxalacetato no sale como tal de la mitocondria y en una reacción de transaminación se combina con el glutamato para formar aspartato y α -cetoglutarato; el aspartato sale de la mitocondria con la participación de un translocador mitocondrial y en el citosol vuelve a formar oxalacetato por otra reacción de transaminación, semejante a la anterior, donde el aspartato cede su grupo amino y queda como oxalacetato, simultáneamente el α -cetoglutarato recibe el amino y se convierte en glutamato. La lanzadera puede operar en cualquiera de las 2 direcciones, pero al haber oxidación activa del etanol por la vía de la deshidrogenasa alcohólica, la mayor producción del NADH citosólico y la capacidad casi ilimitada de usar NADH en la cadena respiratoria mitocondrial, dirigen el flujo de la lanzadera a introducir equivalentes reductores hacia la mitocondria.

EFFECTOS HIPOGLUCEMIANTES DEL ETANOL.

En el ayuno, la vía gluconeogénica hepática viene a ser vital para mantener los niveles de glucosa en la sangre. Se sabe

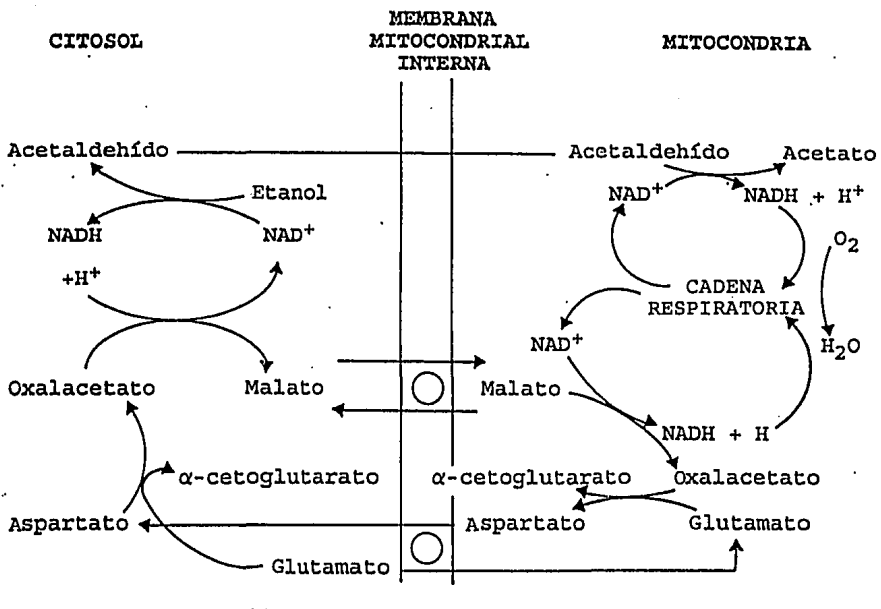


Figura 4 - Lanzadera del aspartato malato en el hígado.

que el alcohol inhibe la gluconeogénesis (19) y este efecto podría contribuir a la hipoglucemia tan común que se observa en los alcohólicos, particularmente después de un período de consumo excesivo. En tal situación el enfermo alcohólico generalmente no come, con lo cual se agudiza la disminución de la glicemia. Una hipoglicemia severa y la acidosis láctica concomitante pueden ser los dos factores más importantes para desencadenar el coma y el colapso en los alcohólicos cuando se instalan por un período largo de consumo de alcohol. Otro factor adicional en el alcohólico crónico es que puede tener inhibida la habilidad para secretar algunas hormonas que intervienen en el control de la lipólisis (cortisol, hormona del crecimiento) y esto reduce la disponibilidad de ácidos grasos como combustible celular. Si lo anterior ocurre en situaciones de ayuno prolongado se exagera la hipoglicemia.

La inhibición en la gluconeogénesis hepática ocasionada por el etanol se ha explicado como una consecuencia más de los altos valores de la relación NADH/NAD^+ detectada en el citosol del hepatocito al haber una activa oxidación del alcohol. En este sentido se han señalado los siguientes aspectos:

1. En condiciones normales parte del oxalacetato del citosol se convierte en fosfoenolpiruvato, un precursor indispensable en la ruta gluconeogénica. Al haber oxidación del etanol, el oxalacetato citosólico se produce en menor cantidad y el poco que hay, está comprometido y es usado en la lanzadera de aspartato-malato (fig 5).

CITOSOL

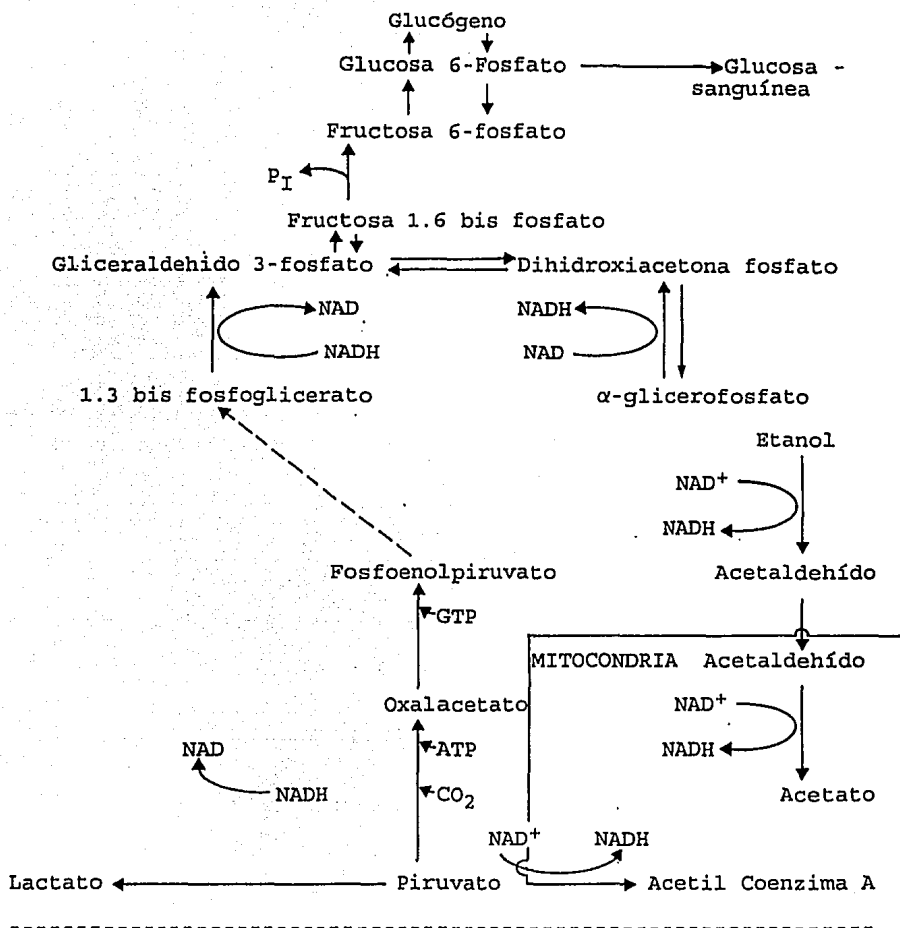


Figura 5 - Utilización del NAD y del NADH en la gluconeogénesis hepática. No se incluyen en la figura todos los metabolitos en la vía gluconeogénica.

2. La disponibilidad de piruvato como precursor de oxalacetato (y después de fosfoenolpiruvato) disminuye debido a la rápida conversión del piruvato en lactato debida precisamente a la elevada concentración de NADH formado en el citosol durante la oxidación del etanol.

3. En situación normal, el glicerol producido en el tejido adiposo durante la lipólisis es convertido en α -glicerofosfato en el hígado. La primera etapa para que el glicerofosfato se transforme en glucosa es su conversión a dihidroxiacetona fosfato en una reacción que requiere NAD^+ y forma NADH. Durante la oxidación activa del etanol, disminuye notablemente la síntesis de la dihidroxiacetona fosfato debido a que el exceso de NADH y la carencia de NAD^+ en el citosol inclina el equilibrio de la reacción a la síntesis de más α -glicerofosfato.

EFFECTOS HIPERGLICEMIANTES DEL ETANOL

En humanos y en animales alimentados, el etanol no produce hipoglicemia. *In vivo* el etanol inhibe la utilización de la glucosa estimulada con insulina en humanos y en perros. Para explicar estos efectos hiperglicemiantes en el animal alimentado, opuestos a los hipoglicemiantes que se presentan durante el ayuno existen tres hipótesis. La primera se apoya en una inhibición de la utilización de la glucosa. La segunda propone un aumento en la glucogenolisis por estimulación de la fosforilasa o bien una inhibición de la glucógeno sintetasa, ambas moduladas por la disminución de la glucosa 6 fosfato. La tercera, sugiere que la gluconeogénesis no se inhibe durante la administración de etanol

en el animal alimentado. Para comprender esta última explicación, sería necesario considerar que el hígado es capaz de estimular o inhibir la velocidad de glucogenólisis en respuesta a la disminución o al aumento de la gluconeogénesis respectivamente. Aunque este tipo de regulación puede complicar la producción hepática de glucosa estimulada por hormonas o fármacos, si tiene sentido fisiológico porque ayudaría a mantener constante la concentración de glucosa sanguínea, a pesar de las variaciones en la disponibilidad de sustratos gluconeogénicos.

EFFECTOS DEL ETANOL EN EL METABOLISMO DE LOS LIPIDOS

El consumo crónico de etanol puede conducir al depósito excesivo de triacilglicéridos hepáticos. Por un lado el aumento de acetato disponible como acetil CoA es precursor de ácidos grasos, por otro lado, está inhibida su degradación; además, el sistema de lipoproteínas está alterado de manera que la exportación de triacilglicéridos del hígado hacia la circulación está comprometida. En consecuencia la esteatosis hepática observada después de la ingestión exagerada de etanol puede considerarse multifactorial. Sin embargo, no está claro si el depósito anormal de lípidos causa daño al hígado, o si es una consecuencia del daño. En ambos casos la esteatosis puede evolucionar a hepatitis y eventualmente a cirrosis. Conforme el hígado graso se desarrolla hay un descenso en la cantidad de retículo endoplásmico, especialmente el rugoso, (que es el que interviene en la síntesis de proteínas).

DESTINO DEL ACETALDEHIDO

En la especie humana las variaciones en la concentración de etanol en el intervalo de 24 a 56 mM se acompañan de niveles de acetaldehído entre 0.02 a 0.03 mM; los datos en sí son de gran interés y requieren de un análisis. ¿Por qué no se acumula el acetaldehído de manera semejante a como se acumula el etanol? La explicación es que la oxidación del acetaldehído es preferentemente mitocondrial y por lo tanto se genera NADH en la mitocondria, que cede sus equivalentes reductores a la cadena respiratoria y se regenera de inmediato el NAD^+ para continuar la oxidación del acetaldehído. En consecuencia, aparentemente no parece haber una limitación importante en la oxidación del acetaldehído tal como se describió para el etanol. Al final de la oxidación del acetaldehído se obtiene acetato en una reacción que se revisó en la página 24. Como acetato requiere transformarse en acetil CoA, en una reacción catalizada por la acetil CoA Sintasa, una vez como acetil CoA puede ser metabolizada en el ciclo de Krebs hasta CO_2 y H_2O , o bien, puede sintetizar ácidos grasos como sucede en el hígado y en el tejido adiposo. Otros caminos de menor importancia cuantitativa serían la síntesis de cuerpos cetónicos, aminoácidos o esteroides.

**CONCEPTO ACTUAL DEL DAÑO CELULAR HEPATICO CAUSADO POR LA
INGESTION DE ALCOHOL**

La patología hepática ocasionada por la ingestión de alcohol ofrece en los seres humanos un amplio espectro que va desde un cuadro moderado de hígado graso, muy frecuente en los alcohólicos, hasta la cirrosis que a un plazo relativamente corto termina con la vida del sujeto. La hepatitis alcohólica representa una manifestación intermedia, reversible, de este proceso. Fue descrita en 1961 por Beckett (20) y se define como una lesión inflamatoria aguda, degenerativa tóxica, debido al consumo excesivo de etanol. Los hallazgos histológicos característicos son: inflamación, necrosis, degeneración hialina, (cuerpos de Mallory), con frecuencia se asocia al hígado graso, e inclusive con pequeños focos de fibrosis.

Para explicar la patogénesis inducida por el alcohol es necesario comentar que si bien es cierto que se conocen muchos detalles del metabolismo del etanol en el hígado, los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de la enfermedad aún no están bien dilucidados. Aunque otros órganos también resultan dañados, la exquisita sensibilidad del hígado a los efectos tóxicos del etanol se debe a que es ahí donde sucede casi toda la oxidación del alcohol hasta acetaldehído, especialmente en las mitocondrias hepáticas es donde se alcanzan las más altas concentraciones de acetaldehído después del consumo elevado de bebidas alcohólicas (21,22). De ahí en adelante, otros tejidos continúan metabolizando el acetato resultante de la oxidación del acetaldehído, hasta H_2O y CO_2 . Son varias las hipótesis postuladas para explicar el desarrollo de la enfermedad hepática, éstas pueden agruparse en tres, que tienen como base los

mecanismos fundamentales que caracterizan a cada una de ellas: la autoinmunidad, la hipoxia y la lipoperoxidación. A continuación se plantean los aspectos principales de cada una de ellas.

AUTOINMUNIDAD.

Se ha propuesto una alteración inmunológica como mecanismo en el desarrollo, persistencia y progresión de la hepatopatía alcohólica, incluso cuando cesa la ingestión de alcohol. Se cuenta con suficiente evidencia para considerar que el sistema inmune esta alterado en los alcohólicos (23).

Para explicar el compromiso del sistema inmune en la enfermedad hepática alcohólica se propone que el acetaldehído por su elevada toxicidad (24), es el agente más probable que participa en el daño hepático, y porqué en los alcohólicos las concentraciones de acetaldehído en sangre y en hígado se encuentran elevadas, esto puede que se deba a un aumento en la velocidad del metabolismo del etanol (25) o bien, a una reducción de la actividad de la deshidrogenasa aldehídica (26). De cualquier forma, el desbalance entre la producción y el consumo del acetaldehído podrían ser determinantes en el daño hepático. De hecho, el acetaldehído al reaccionar con algunas proteínas y aminoácidos (24) puede alterarlos funcionalmente y/o antigénicamente (27). Más aún, se ha demostrado que el acetaldehído es responsable de la formación de aductos con proteínas, lípidos y nucleósidos que han podido identificarse circulando en los alcohólicos, con y sin enfermedad hepática (28). Otros autores han logrado la producción *in vitro* de estos

aductos (29). Los aductos pueden inducir la formación de los anticuerpos que se encuentran en los alcohólicos (30). En un modelo animal, Israel y cols (31). demostraron que los aductos del acetaldehído pueden servir como neoantígenos y generar una respuesta inmune en el ratón. A su vez, los complejos inmunes que contienen aductos de acetaldehído unidos al complemento, pueden contribuir a la exageración de la enfermedad hepática. Esto podría representar uno de los mecanismos inmunológicos mediados por células o por que pueden tener un papel definitivo en la patogénesis del daño celular hepático.

HIPOXIA.

La localización centrilobulillar del daño celular hepático inicial puede relacionarse con la hipoxia. Esta hipótesis nació en 1970 de las observaciones de Videla e Israel (32): las rebanadas de hígado de rata alimentadas crónicamente con etanol, consumen más oxígeno que los controles. A partir de esos trabajos Israel y col en 1973 (33) postularon que el mayor consumo de oxígeno aumentaría el gradiente de tensión de oxígeno a lo largo de los sinusoides, al grado de establecerse hipoxia en los hepatocitos perivenulares más distales. Tal mecanismo quedó ilustrado experimentalmente cuando se logró inducir necrosis celular centrilobulillar, por hipoxia, en ratas tratadas crónicamente con etanol (34). Por último se ha comprobado en alcohólicos y en animales tratados crónicamente que, durante la supresión del etanol, disminuye la saturación de oxígeno en las venas hepáticas y la tensión de oxígeno tisular (35). Sin

embargo, este descenso está dentro del intervalo de valores obtenidos en sujetos normales. Además, las diferencias en la oxigenación hepática durante la supresión del alcohol, desaparecen o disminuyen (35) cuando el alcohol está presente en la sangre. En 1989 Lieber (36) encontró que el etanol impide la utilización del oxígeno, inclusive cuando el aporte no se encuentra limitado, sino que existe un amplio abasto de O_2 . Por otro lado, el cambio de potencial redox por la hipoxia resultante del tratamiento con etanol puede, inclusive, exagerarse, con tensiones más bajas de oxígeno en la zona perivenular (37). A su vez el aumento en la forma reducida de NAD^+ conduce a una mayor demanda de oxígeno a nivel de las mitocondrias para poder manejar el exceso de $NADH+H$. Con ello se establece un círculo vicioso que conduce a un mayor daño celular por hipoxia.

LIPOPEROXIDACION POR RADICALES LIBRES

A pesar de que la lipoperoxidación se descubrió en un fenómeno muy común: el enranciamiento de las grasas, proceso muy costoso para la industria, relacionada con el almacenamiento de las grasas y aceites, es hasta muchos años después del hallazgo cuando se produce experimentalmente por una clase de especie química, llamada "radicales libres" (38). Este hecho es muy importante porque marca el comienzo de la química de los radicales libres, componente básico de la industria moderna, que incluye la síntesis de plásticos y otros polímeros. Durante muchos años se pensó que la extrema reactividad de los radicales y la irreversibilidad de las reacciones en las que ellos

participan los excluía para considerar su posible existencia en los organismos vivos. Ahora se sabe muy bien que sucede lo contrario, es decir, los radicales libres juegan un papel muy importante en un grupo de enfermedades (39). Numerosas investigaciones se dirigen ahora a cambiar el curso de las enfermedades modulando los procesos que dan lugar a la formación o a la persistencia de los radicales libres (40).

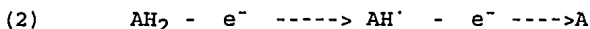
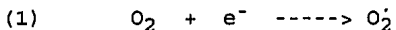
En relación con el daño celular por alcohol puede considerarse a Di Luzio en 1966 (41) como el primero que asocia la peroxidación de los lípidos con el consumo de etanol y que además propone que algunos antioxidantes pueden prevenir el desarrollo del hígado graso después de una dosis aguda de etanol; cada vez se cuenta con más evidencia que apoya la tesis de Di Luzio, estableciendo como mecanismo de daño celular en general y hepático en particular, a la peroxidación de los lípidos. El aumento de dienos conjugados y de la quimioluminiscencia, reportado por otros grupos (42), en modelos de intoxicación alcohólica, apoyan este mecanismo patogénico.

DEFINICION DE RADICAL LIBRE.

Un radical libre es una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. Aquí se incluye desde un átomo de hidrógeno hasta iones de metales de transición. Otros compuestos inorgánicos como por ejemplo el NO^{\cdot} (óxido nitroso) y el NO_2 (dióxido de nitrógeno), contienen un electrón desapareado en su orbital periférico, y de acuerdo con la definición, son radicales libres. La presencia

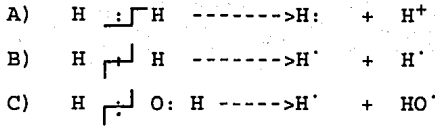
del electrón no apareado se representa en forma convencional con un punto en el ángulo superior derecho de la sigla del compuesto: R'.

Un compuesto se transforma en radical libre ya sea ganando un electrón (e^-) como en la reacción 1, que muestra la reducción del oxígeno molecular que da lugar al ión superóxido (O_2^-) o bien, por pérdida de un electrón como en la reacción 2, que muestra la oxidación del ácido ascórbico (AH_2) a su forma aldehídica (A) pasando por un intermediario que es un radical libre (AH').



Los radicales libres se forman también por fisión o sea ruptura de uniones covalente de tipo homolítico. Generalmente cuando una unión covalente se rompe lo hace en forma heterolítica un fragmento retiene ambos electrones y queda como un ión negativamente cargado (hidruro), y el otro fragmento pierde su electrón y queda con una carga positiva (protón). En la ruptura homolítica de una unión covalente, la unión se rompe simétricamente y ambos fragmentos retienen un solo electrón y en consecuencia pasan a ser radicales libres. La ruptura homolítica puede ser muy importante en el inicio de la lipoperoxidación.

En el siguiente diagrama se muestran las rupturas: heterolítica (A) de una unión covalente. La ruptura homolítica de la misma (B). Ambas pueden quedar ilustradas por una molécula de hidrógeno (H_2) en la que dos átomos se unen en forma covalente, la ruptura homolítica de una molécula de agua (C).



RADICALES LIBRES DEL OXIGENO

Los radicales libres derivados del oxígeno molecular son los responsables de muchos de los efectos biológicos de los radicales libres (CUADRO VI).

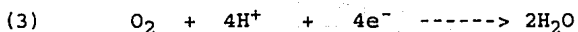
CUADRO VI - ESPECIES DEL OXIGENO POTENCIALMENTE CITOTOXICOS.

O_2^{\cdot}	radical, anion superoxido
HO_2	radical hidroperoxil
H_2O_2	peroxido de hidrógeno
OH^{\cdot}	radical hidroxil
ROO^{\cdot}	radical peróxido (R = lípido)
$^1\text{O}_2$	oxígeno singulete

El oxígeno molecular es en sí un birradical, tiene un electrón desapareado en cada uno de sus dos orbitales externos pero ambos electrones, rotan en la misma dirección. Por eso, la reactividad que se esperaría en el oxígeno molelcular como birradical es reducida, por la rotación paralela de los electrones periféricos. (\uparrow) (\uparrow). Este arreglo disminuye la habilidad del oxígeno molecular para remover dos electrones al mismo tiempo de otra molécula no-radical que tiene la configuración de su par de electrones rotando en dirección opuesta ($\uparrow\downarrow$). Deberá ocurrir una

inversión de la dirección de rotación antes de que suceda dicha reacción oxidativa. Las leyes de la mecánica cuántica que rigen los acomodos electrónicos restringen ese proceso de inversión de la rotación. Sin embargo, esta restricción se ve superada si se adquieren de uno en uno los electrones, porque en esta situación no tiene que ocurrir la inversión de la rotación. Los metales de transición encontrados en el sitio activo de las enzimas tipo oxigenasas y oxidasas tienen la habilidad de facilitar la transferencia de un solo electrón al oxígeno molecular. La reducción univalente del oxígeno molecular puede también iniciarse cuando se le expone a electrones de suficiente energía como las radiaciones ionizantes o de otras fuentes.

Los radicales libres del oxígeno se forman durante el metabolismo celular. En el sistema enzimático mitocondrial de la citocromo oxidasa durante la fosforilación oxidativa se acopla la producción de adenosintrifosfato (ATP) a la reducción tetravalente del oxígeno molecular para formar agua (reacción 3).



En este proceso el radical libre del oxígeno parcialmente reducido permanece unido al sitio activo de la enzima y no representa peligro para la célula.

En otros sitios la reducción univalente del oxígeno molecular en forma secuenciada puede producir radicales libres del oxígeno que, por ser muy reactivos, llegan a alterar el funcionamiento celular normal. El anión superóxido O_2^- se produce por la adición de un electrón al oxígeno molecular. El anión superóxido, que es en sí un radical libre, sufre una reacción de

dismutación en la que un radical superóxido actúa sobre otro para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es por definición un radical libre pero que por su reactividad puede considerarse como tal. Al agregar un electrón al peróxido de hidrógeno se forma agua y el radical OH altamente reactivo. La adquisición de otro electrón con su protón convierte al OH' en agua.

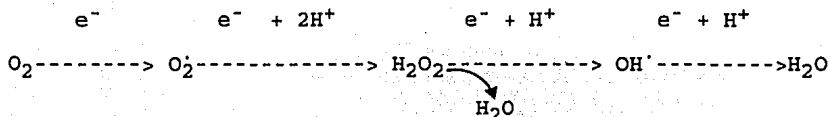


Diagrama que muestra la reducción univalente del oxígeno molecular en forma secuenciada.

La reactividad del O_2 puede incrementarse en otra forma además de la descrita. Esto sucede durante el curso de ciertas reacciones en que interviene el O_2 y que invierten la rotación de uno de los electrones de los dos orbitales externos. De este proceso resulta el oxígeno singulete muy reactivo porque durante su formación se libera de las restricciones de la mecánica cuántica para la rotación. Existen dos tipos de oxígeno singulete, uno de vida muy corta el sigma, (Σ) y otro de mayor importancia biológica por su vida más larga, el delta (Δ). En el oxígeno singulete, los dos electrones periféricos ocupan el mismo orbital y tienen rotaciones opuestas. Un mecanismo de formación del oxígeno singulete es por acción de la luz sobre el O_2 en presencia de un fotosintetizador. Por definición el oxígeno singulete no es un radical libre, sin embargo, en un sistema biológico se comporta como tal pues oxida rápidamente muchas

moléculas incluso los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares.

SISTEMAS DE PRODUCCION DE RADICALES LIBRES DEL OXIGENO.

El metabolismo aeróbico comparado con el anaeróbico conlleva grandes ventajas, hace a las células más eficientes, se aprovechan mejor los combustibles celulares, pero existe un problema y es que el oxígeno a altas concentraciones continúa siendo potencialmente dañino para todas las formas de vida.











Estado	Rotación de los Electrones periféricos		Reactividad
Oxígeno molecular			Baja
Oxígeno singulete			Alta
Oxígeno singulete			muy alta
ión superoxido			baja
ión peroxido			baja

Figura 6 - Arreglo electrónico de los electrones del orbital periférico. Las flechas indican la dirección de la rotación del electrón. Tomado de Halliwell-Gutteridge (42).

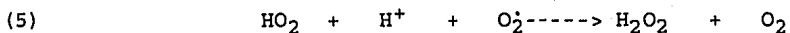
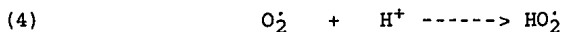
Este peligro se extiende a los organismos que contienen sistemas enzimáticos capaces de formar radicales libres del oxígeno y también compuestos químicos susceptibles de ser dañados. En contraste con las bacterias anaeróbicas obligatorias, los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas muy elaborados

de protección: atrapadores de radicales libres que previenen el daño por radicales libres del oxígeno. Cuando el daño celular ocurre es porque la producción sucedió en exceso como en el estrés oxidativo o bien, porque los sistemas de protección se deterioran como sucede en algunas enfermedades, como por ejemplo el alcoholismo. Las radiaciones ionizantes, los rayos X y los gamma, actúan sobre el agua generando radicales libres. La luz de cierta longitud de onda puede causar fotólisis de las uniones químicas y producir radicales libres. Este proceso puede ser importante en la formación de cataratas (43). Algunos componentes de la atmósfera: ozono, NO, NO₂, pueden reaccionar con moléculas biológicas y formar radicales libres. También en el humo de las fogatas y del cigarro existen concentraciones altas de radicales libres.

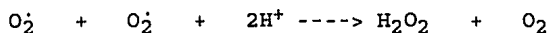
En el organismo varios sistemas enzimáticos catalizan la reducción univalente del oxígeno molecular al radical superóxido: xantina-oxidasa, aldehído oxidasa, flavín deshidrogenasa peroxidasa, etc. Además, esa reducción univalente del O₂ también sucede *in vivo* en sistemas no enzimáticos: los cambios en el medio, por ejemplo la transferencia de electrones en las reacciones de oxidación-reducción: hidroquinona + O₂ ----> semiquinona· + O₂ + H⁺ y durante las reacciones de autoxidación como las que incluyen a las catecolaminas, flavinas y ferredoxinas reducidas. La reducción univalente del O₂ también se produce por medio del sistema NADPH oxidasa presente en la membrana de las células que participan en la reacción inflamatoria: neutrófilos, monocitos, eosinófilos y macrófagos.

Estas células cuentan con un mecanismo de producción del ión superóxido: la descarga respiratoria muy importante en la defensa contra bacterias invasoras.

La principal fuente de producción de peróxido de hidrógeno es la dismutación del radical superóxido, una reacción intracelular, catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (44). La reacción ocurre en dos pasos: el anión superóxido se combina con un protón dando el radical hidroperoxil HO_2 (reacción 4). Este a su vez se combina con otro radical hidroperoxil como se ve en la reacción 5, en la que se presenta el radical disociado: $\text{H}^+ + \text{O}_2^{\cdot -} \rightleftharpoons \text{HO}_2^{\cdot}$ al finalizar la reacción se forma peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. También ocurre espontáneamente con una constante de velocidad de $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que la reacción catalizada sucede con mayor rapidez: $1 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La reducción divalente del O_2 para formar H_2O_2 también sucede en los peroxisomas, orgánulos celulares especializados que poseen enzimas del tipo D amino oxidasas y glicolato oxidasas

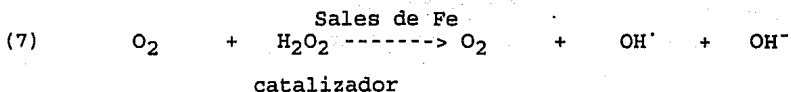
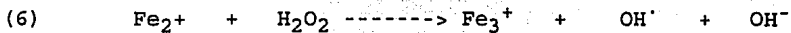


SOD



Respecto al radical hidroxilo, las células no cuentan con sistemas enzimáticos para usarlo como sustrato, sino que más bien las células tienen mecanismos que previenen su formación. Existen casos en los que llegan a formarse, como en la reacción de Fenton, que sucede siempre que se ponen en contacto el peróxido

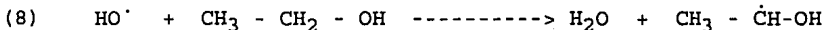
de hidrógeno con iones ferrosos o cuprosos. (reacción 6). También se forma en otra reacción catalizada por hierro, conocida como tipo Haber-Weiss, en la que el efecto neto se debe a la interacción entre el H_2O_2 y el anión superóxido, en presencia de trazas de metales de transición, la cual forma ion hidroxilo, radical hidroxilo y oxígeno molecular. (reacción 7)



REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Los radicales libres varían en su reactividad, algunos son relativamente estables, pero los radicales libres de interés biológico tienden a ser extremadamente reactivos e inestables, su período de vida es de apenas fracciones de segundo (45).

El radical hidroxilo es el más reactivo de los radicales libres del oxígeno, por ejemplo: oxida al etanol con una constante bimolecular de velocidad a $37^{\circ}C$ de $10^9 M^{-1}S^{-1}$. (reacción 8)



Los radicales libres, por su reactividad, existen en concentraciones muy bajas de 10^{-4} a $10^{-9}M$ y no viajan muy lejos de su sitio de formación. El radio promedio de acción del radical hidroxilo en la célula es de 30 \AA y su vida media de unos cuantos microsegundos, de manera que un radical formado en la mitocondria es muy poco probable que por sí mismo tenga un efecto directo sobre otras partes de la célula como en el DNA del núcleo, por

ejemplo. Los radicales libres del oxígeno pueden actuar como agentes oxidantes y reductores. Cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres. Esto facilita que los radicales libres induzcan reacciones en cadena que pueden multiplicar muchas veces más a la reacción original, por ejemplo; la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, el radical libre inicial produce sólo efectos locales pero los radicales secundarios formados a partir del original y los productos de degradación formados por las reacciones de los radicales libres pueden tener efectos a distancia del sitio donde se formó el primer radical libre. Cuando dos o más radicales libres reaccionan entre sí se forma una molécula estable. Esto determina la eventual terminación de las reacciones en cadena inducida por los radicales libres.

El ión superóxido no es una especie particularmente reactiva pero es potencialmente tóxica. Influye en la homeostasis como por ejemplo, en la oxidación de las catecolaminas (46). Para los organismos vivos es más importante aún su transformación en el peligroso radical hidroxilo. La primera etapa de la transformación es la dismutación del anión superóxido en H_2O_2 (reacciones 4 y 5). El H_2O_2 no es especialmente tóxico pero al atravesar las membranas celulares la situación cambia porque el medio extracelular posee pocos mecanismos que eviten la oxidación, y en presencia de trazas de metales de transición da lugar a la formación de radicales hidróxilo (reacción 6). También interactúa con radicales superóxido produce radicales

hidroxilo, (reacción 7). El radical hidroxilo reacciona con mucha facilidad con las moléculas biológicas vecinas. Puede dañar proteínas, causa rompimientos en las hélices del DNA, inicia la lipoperoxidación, de manera que puede considerársele como un agente dañino siempre que esté presente el ión superóxido. En el cuadro VII se enlistan los efectos de los radicales libres sobre algunas biomoléculas.

**CUADRO VII - COMPUESTOS CELULARES ALTERADOS POR ACCION
DE LOS RADICALES LIBRES.**

LIPIDOS	Peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana plasmática y de los orgánulos.
PROTEINAS	Inactivación de enzimas que contienen grupos sulfhidrilos por oxidación de los mismos.
CARBOHIDRATOS	Depolimerización de los polisacáridos.
ACIDOS NUCLEICOS	Hidroxilación de bases, entrecruzamientos, escisión de las bandas del DNA que causan mutaciones, e inhibición de la síntesis de proteínas, nucleótidos y ácidos grasos.

¿QUE ES LA LIPOPEROXIDACION?

Es una reacción de autoxidación que puede ser iniciada por los radicales hidroxilos, los radicales hidroperoxilo, quizá por el oxígeno singulete, pero no por radicales menos reactivos: superóxido y peróxido de hidrógeno. El radical libre iniciador remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena de carbono. Este hecho deja un electrón desapareado en este átomo de carbono, creando un radical de ácido graso (A de la fig 7). Este último realiza un rearrreglo molecular interno para formar un dieno conjugado, (B de la fig 7), que a su vez reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical peroxil lípido (C de la fig 7) capaz de sustraer un hidrógeno de otro ácido graso para formar el hidroperoxil lípido (D de la fig 7) y continuar la reacción en cadena hasta que eventualmente reaccionan 2 radicales libres y se evita que prosiga la reacción en cadena y que se sigan oxidando más ácidos grasos insaturados (E de la fig 7).

La lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas daña seriamente a las membranas plasmáticas y la de los orgánulos celulares, produciendo pérdida de la fluidez, alteración de las funciones secretorias y de los gradientes iónicos transmembranales (28), e incluso la muerte celular (fig 8).

Los productos finales de la reacción de peroxidación sobre los ácidos grasos insaturados son aldehidos, gases hidrocarburos (etano, pentano) y varios residuos químicos como el malondialdehido (47). Estos productos pueden difundir del sitio de producción; originar edema celular y cambios en la

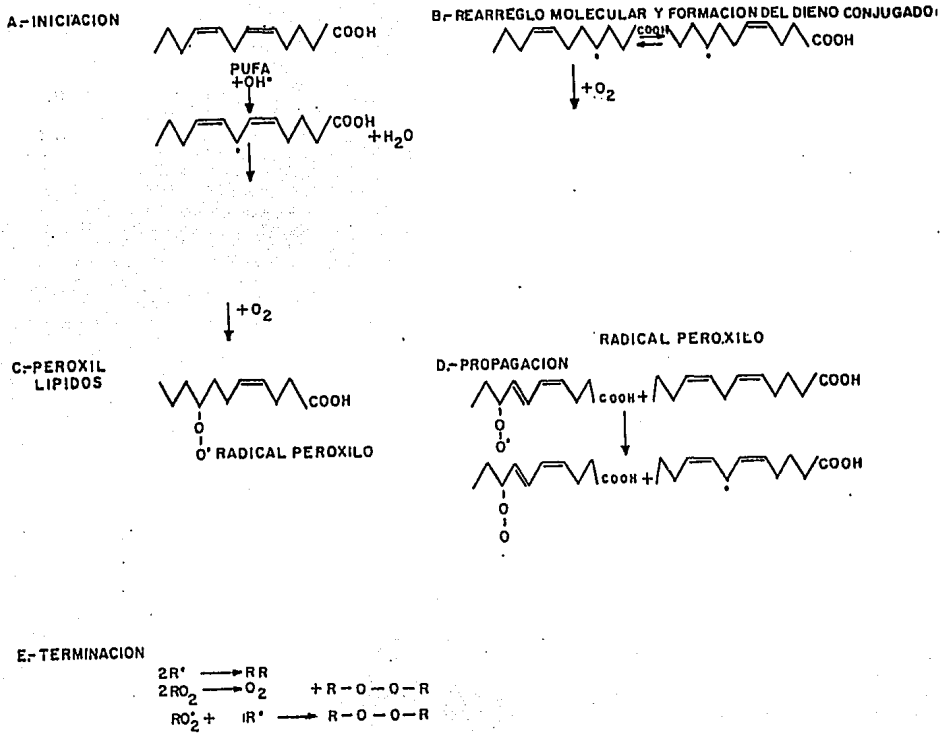


Figura 7 - Secuencia esquemática del mecanismo de lipoperoxidación de un ácido graso.

DAÑO DE MEMBRANA CELULAR POR RADICALES LIBRES

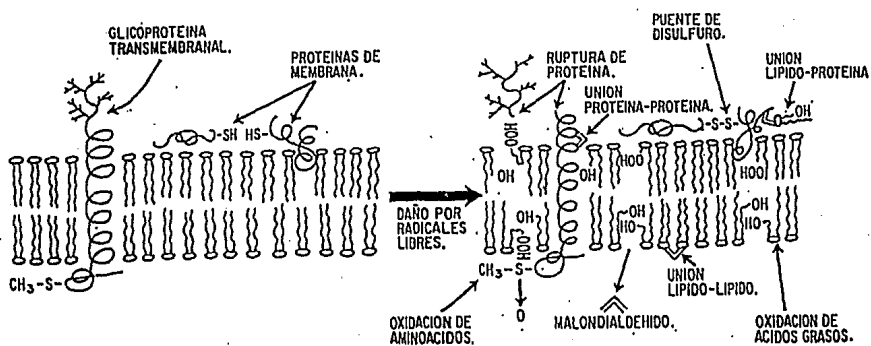


Figura 8 - Representación del daño membranar por la lipoperoxidación.

permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Además algunos pueden cambiar la actividad de la fosfolipasa e inducir la salida del ácido araquidónico y la formación de prostaglandinas estables y varios endoperóxidos (48). La secuencia teórica de los sucesos que conducen al daño celular por este mecanismo se presentan gráficamente en la figura 9.

Para concluir, puede comentarse lo siguiente: la participación de la autoinmunidad, hipoxia y lipoperoxidación en el desarrollo del daño celular hepático por el alcohol están bien apoyadas, tanto por observaciones en biopsias y autopsias de pacientes alcohólicos, como en modelos con animales de experimentación. Qué tanto contribuye cada una de ellas en el establecimiento de la patogenesis hepática es difícil de evaluar, sin embargo en una secuencia temporal podría decirse que tanto la hipoxia como la lipoperoxidación son fenómenos que se instalan en forma inmediata, a diferencia de la autoinmunidad que lo hace a plazos mediano y largo.

Entre ambos fenómenos: hipoxia y lipoperoxidación también es muy difícil tratar de investigar qué tanto son consecuencia o efecto una de la otra. Lo que sí puede establecerse es que ambos procesos tienen en común un exceso de radicales libres del oxígeno. Las alteraciones producidas por el alcohol como inductor de radicales libres, en los diferentes orgánulos celulares serán revisadas a continuación:

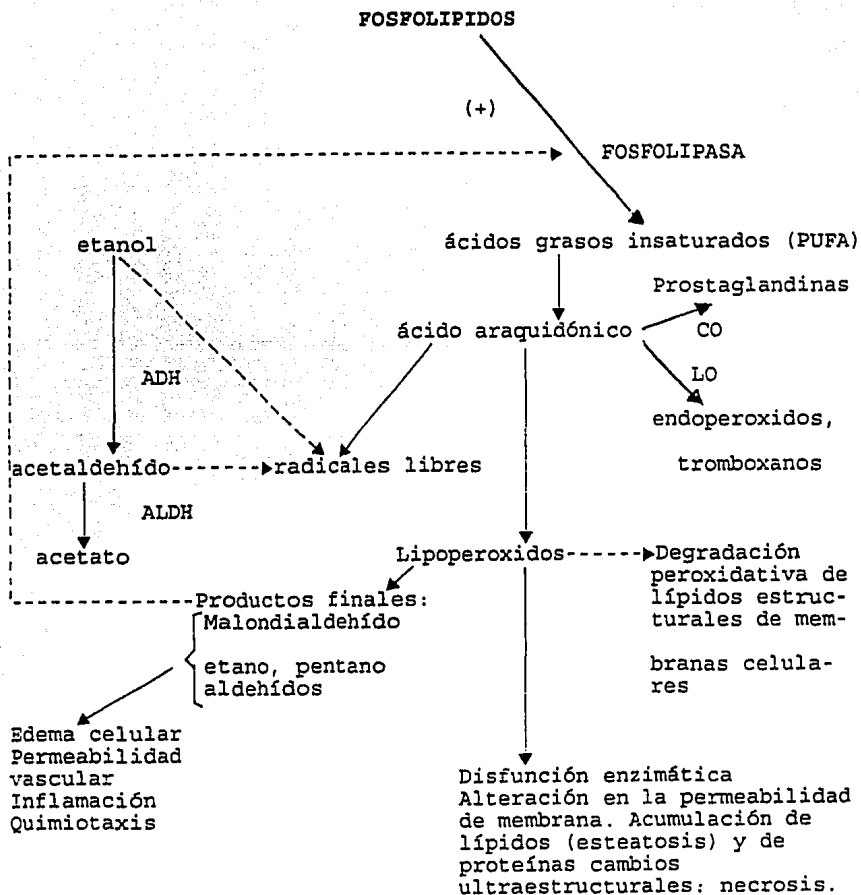


Figura 9 - Secuencia de Mendenhall modificada para explicar la fisiopatología en el daño hepático por etanol.

CO = cicloxigenasa; LO = lipoxigenasa. Modificada de la referencia 48.

GENERACION DE RADICALES LIBRES INDUCIDA POR ETANOL

Conforme la vida celular en el planeta Tierra dejó de ser puramente anaeróbica, la evolución condujo a la aparición de vida aeróbica, con un metabolismo que permite la oxidación completa de los sustratos hasta agua y CO_2 . Este hecho que ofreció muchas ventajas, también llevó aparejada la generación de radicales libres del oxígeno, que como ya se mencionó son especies muy reactivas, tóxicos cuando se generan en exceso como sucede en el caso de la intoxicación alcohólica. Aunque las células cuentan con mecanismos protectores antioxidantes, al ser rebasadas sus defensas se establece el estrés oxidativo durante el cual la homeostasis celular resulta amenazada.

En relación a la ingestión aguda de etanol, se conocen con bastante certeza los orgánulos celulares en donde sucede su oxidación hasta CO_2 y H_2O y los sistemas enzimáticos encargados del metabolismo. Para el caso del consumo crónico de alcohol, también se sabe que el sistema microsomal se induce y es capaz, en un sujeto acostumbrado, de oxidar grandes cantidades de alcohol, con la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno como son: H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot -}$ y OH^{\cdot} . Además, estos radicales libres del oxígeno producidos durante el metabolismo del etanol, son capaces de generar a su vez radicales libres del etanol *per se* como radicales etoxilo e hidroxietilo.

A continuación se revisarán las fracciones celulares comprometidas durante la ingestión excesiva de etanol y los radicales libres que derivan de la misma.

Microsomias

En los microsomas hepáticos aislados de las ratas tratadas crónicamente con etanol se encuentra aumentada la producción de especies reactivas del oxígeno (anión superóxido (49), agua oxigenada (50,51) y radical hidroxilo (52,53)).

Los radicales libres pueden ser generados por la reductasa del NADPH citocromo P450. Esta flavoenzima genera anión superóxido, el cual potencialmente es productor de radicales hidroxilo en la reacción de Haber-Weiss. Los estudios al respecto (54), indican que la actividad de esta reductasa está incrementada en los microsomas aislados del hígado de ratas tratadas con etanol en forma crónica. Sin embargo, si se compara con la actividad del citocromo P450, el cambio es pequeño (55).

Después del trabajo de Lieber y De Carli (50) sobre la inducibilidad del sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS), una forma única de citocromo P450 ha sido identificada en microsomas aislados de hígados de conejos (56), de ratas tratadas con etanol en forma crónica (57,58) y de humanos (59,60). Este citocromo (CYP1IE1) es inducible (61) con varios compuestos no relacionados estructuralmente con el etanol como pueden ser: acetona (58), imidazol (62), isoniácida (63), benceno (64), dimetilsulfóxido (65), pirazol (62), otros alcoholes (66,67), acetaminofén (68), nitrosaminas (63) dietiléter (69) y tetracloruro de carbono (70). Es probable que esta isoenzima inducible por etanol tenga un papel importante en la generación de especies reactivas del oxígeno, ya que es capaz de reducir el oxígeno molecular O_2 a H_2O_2 . En los microsomas de ratas tratadas

con etanol existe una correlación directa entre la cantidad de CYP11E1 y la producción de especies derivadas del oxígeno (O_2 y H_2O_2). Se ha demostrado la participación del CYP11E1 dependiente de NADPH en la formación de H_2O_2 en microsomas mediante el empleo de anticuerpos específicos (49).

Radicales libres derivados del etanol. Los microsomas incubados con etanol y en presencia de agentes atrapadores de radicales libres generan un radical libre, identificado por medio de la resonancia electrónica del spin (ESR) como el aducto del radical 1-hidroxietilo con el atrapador seleccionado (71). También se reportó que la formación del radical 1-hidroxietilo aumenta en relación directa a la cantidad de etanol agregado a la suspensión de microsomas y que la producción del mismo era mayor cuando los microsomas procedían de ratas que habían sido alimentadas con etanol. Los radicales hidroxilo, generados en la reacción de Fenton a partir de agua oxigenada endógena y pequeñas cantidades de fierro, pueden ser los agentes oxidantes del etanol que forman al radical 1-hidroxietilo (72). El mecanismo propuesto para la reacción es la sustracción de un hidrógeno del carbono uno de la molécula de etanol que produce radicales 1-hidroxietilo. En realidad este mecanismo es la base de la ya reportada actividad del etanol, bajo ciertas condiciones experimentales, como atrapador de radicales hidroxilo. Tal mecanismo es consistente con la inhibición del NADPH citocromo P450 microsomal (dependiente de la oxidación de etanol), al adicionar agentes quelantes de fierro como la desferroxamina o agentes que compiten

con los atrapadores de OH^{\cdot} como el ácido 2-ceto 4-tiometil barbitúrico (72). En condiciones normales este mecanismo de oxidación del etanol, dependiente de radicales hidroxilo representa una fracción muy pequeña comparada con la cantidad de etanol oxidado por el sistema microsomal, mientras que adquiere importancia en condiciones que promueven la producción microsomal de OH^{\cdot} , como cuando se agrega EDTA férrico y disminuye al emplear condiciones que minimizan la producción de OH^{\cdot} (73).

Además de este mecanismo de oxidación del etanol dependiente de OH^{\cdot} , el etanol puede ser oxidado en los microsomas hepáticos mediante una reacción catalizada por el citocromo P450 que no es afectada por los atrapadores de OH^{\cdot} (74). Este hecho adquiere especial importancia en microsomas aislados de ratas alimentadas con etanol. Ekström y cols (55), demostraron que en ausencia de Fe contaminante, la isoenzima citocromo P450 inducible por etanol exhibe una alta especificidad para la oxidación del etanol, pero no para la producción de OH^{\cdot} . Los anticuerpos preparados contra la forma de citocromo P450 inducible por etanol inhiben en un 75% la oxidación del etanol en esas preparaciones microsomales no contaminadas con hierro (75). Sí esta oxidación no se inhibe con atrapadores de radicales libres se puede explicar con la intervención de otros radicales diferentes al OH^{\cdot} . El radical 1-hidroxietilo puede ser generado a partir del etanol por medio de intermediarios oxidables como los complejos de iones perferrilo. Posiblemente participe el hierro del grupo hemo contenido en el citocromo P450. Otra alternativa sugerida por Ingelman-Sundberg y cols (88), estaría representada por la producción de radicales OH^{\cdot}

en el sitio activo de la enzima misma que y por eso, no resultan accesibles a los atrapadores de OH'.

Todo lo anterior sugiere que por lo menos 2 caminos intervienen en la generación del radical 1-hidroxietilo a partir del etanol. Uno que incluye a los radicales OH' producidos en una reacción de Fenton a partir del agua oxigenada endógena y el otro mediado por el citocromo P450, (demostrado por la fuerte depresión de esta vía cuando se emplean inhibidores del citocromo P450 aparentemente independiente de los radicales OH' (76).

Además del CYP1IE1, otras formas del citocromo P450 pueden participar en la generación de radicales libres producidos en los microsomas de ratas tratadas con etanol. Estas otras formas del citocromo P450 podrían ser responsables, al menos parcialmente, de la fracción remanente de radicales libres generados después de inhibir el CYP1IE1 con anticuerpos contra esta isoenzima (77).

Mientras que la existencia de los radicales 1 hidroxietilo ha sido demostrada *in vitro* por varios investigadores, sólo recientemente se ha logrado la formación de tales radicales *in vivo*, después de la administración de etanol junto con el atrapador de radicales. Con esta técnica, ideada por Reinke y cols (78), se detectan radicales en extractos de hígado de ratas y también se ha logrado identificar el radical 1-hidroxietilo en la bilis de ratones deficientes en deshidrogenasa alcohólica, tratados con etanol y atrapadores de radicales (79).

La sustracción de un átomo de H del etanol puede conducir a la formación de radicales libres diferentes del 1-hidroxietilo como ha propuesto Slater (80), principalmente al 2-hidroxietilo y

al radical etoxilo, todos ellos se pueden generar durante la oxidación del etanol. La vitamina C es mediadora de la formación de radicales etoxilo en presencia del etanol (81).

Además de los radicales libres derivados del etanol, junto con el aumento de producción de especies reactivas del O_2 que participan en el daño de las estructuras microsomales, también contribuyen los radicales libres, generados durante la oxidación del acetaldehído en los microsomas, tentativamente reconocidos como radical acetilo (82). Estos radicales son capaces de inducir quimioluminiscencia (83) y de reducir ferricitocromo C. (84).

Radicales libres derivados de los lípidos. Mediante el empleo de la espectroscopía EPR, Reinke y cols (85), demostraron la generación de aductos formados por un atrapador de radicales libres y otros radicales que muy probablemente están centrados en el carbono de lípidos de membranas microsomales de ratas tratadas crónicamente con etanol. Este hecho ha confirmado el aumento en la lipoperoxidación previamente detectada en microsomas de animales tratados crónicamente con etanol por medio de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) (87) y por quimioluminiscencia (88).

Como la peroxidación de los lípidos puede ser casi completamente inhibida por anticuerpos anti CYP11E1, la participación de este citocromo resulta tener un papel muy importante en la génesis de radicales libres de animales intoxicados crónicamente con etanol. Podría ser que el CYP11E1

reduzca tan eficientemente al oxígeno, que se generan especies del oxígeno capaces de iniciar la peroxidación de los lípidos inclusive en ausencia de sustratos. Como la administración crónica del etanol induce al CYP11E1 en forma muy localizada, centrilobular en el hígado de humanos y de rata (89), parece muy posible que la peroxidación de los lípidos ligada a esta enzima sea parcialmente responsable de la localización centrilobular del daño hepático inducido por etanol. Sin embargo, a pesar del papel principal del CYP11E1 no es posible aún excluir la contribución de actividad peroxidativa de otras formas de P450 (49). Los lípidos de membrana no son los únicos blancos de los radicales libres (90). El aumento de especies reactivas derivadas del oxígeno en los microsomas pueden contribuir también a la toxicidad por etanol mediante la inactivación de enzimas del metabolismo (91).

Mitocondrias

En la cadena respiratoria mitocondrial en condiciones fisiológicas se produce el anión superóxido O_2^- (92). Como las mitocondrias contienen superóxido dismutasa ésta cataliza la formación de agua oxigenada, la cual a su vez es destruida por acción de la glutatión peroxidasa mitocondrial. Sin embargo, en presencia de fierro, una parte del agua oxigenada que no es destruida, puede generar radicales libres capaces de destruir las estructuras mitocondriales y por ende su función. La administración de una carga aguda de etanol aumenta la generación de O_2^- en partículas mitocondriales *in vitro*. La disminución de la

relación NAD^+/NADH inducida por la administración aguda de etanol puede también favorecer la generación de $\text{O}_2^{\cdot -}$ al aumentar el flujo de electrones a lo largo de la cadena de transporte de electrones (93), de lo cual puede resultar un aumento en la fuga de electrones que producen especies reactivas derivadas del oxígeno. El aumento de $\text{O}_2^{\cdot -}$ puede por sí mismo contribuir al incremento de la lipoperoxidación que se hace muy aparente en las mitocondrias aisladas de hígado de rata intoxicada con una carga aguda de etanol (94).

La ingesta crónica de etanol induce anomalías morfológicas en las mitocondrias (95). Los radicales libres pueden al menos parcialmente participar en la patogénesis del daño mitocondrial. Algunos autores han observado en ratas durante la inhalación crónica de vapores de etanol, así como en las fases iniciales de la supresión del etanol, un aumento de la susceptibilidad de las mitocondrias a la lipoperoxidación (96). De manera que es probable que las alteraciones en el metabolismo de los lípidos sean iniciadas por la presencia y/o el metabolismo del etanol, mientras que los cambios en la estructura de la membrana serían responsables del mantenimiento de los daños después de la supresión del etanol. Sin embargo, el consumo crónico de etanol en las ratas conduce a una menor producción del ión superóxido (97) y de agua oxigenada (98). También baja la eficiencia de la fosforilación oxidativa medida como síntesis de ATP. Probablemente una menor producción de las proteínas que participan en la fosforilación oxidativa puedan ser responsables de esta depresión (99).

Peroxisomas

La generación de peróxido de hidrógeno en el hígado de ratas ayunadas es estimulada en forma importante al agregar complejos de ácidos grasos con albumina (100), los cuales son sustratos para la producción de agua oxigenada vía el sistema peroxisomal de la β oxidación. Este hecho adquiere particular importancia durante el ayuno, donde las concentraciones de ácidos grasos en la circulación y en el hígado están muy elevadas; en estas condiciones la oxidación del etanol en el sistema de la catalasa, acoplado al consumo de agua oxigenada, es la vía de elección (101).

Es probable que una parte del agua oxigenada producida dentro de los peroxisomas no se emplee para oxidar etanol sino que en presencia del fierro contribuya a la generación de especies reactivas del oxígeno y al aumento de la lipoperoxidación inducida por la administración aguda de etanol en ratas ayunadas. Por otro lado la administración crónica de etanol no afecta la actividad de las oxidasas peroxisomales: acil CoA oxidasa, L Á-hidroxiácido oxidasa, D amino-oxidasa, y urato oxidasa (102).

Citosol

La posibilidad de que el acetaldehído contribuya al aumento de radicales libres inducido por etanol se basa en la demostración experimental de que el acetaldehído aumenta la producción de alcanos en hígado perfundido de rata (103), promueve la lipoperoxidación en hepatocitos aislados y causa un

incremento en la respiración sensible a los antioxidantes en el hígado perfundido (104). La administración de acetaldehído a las ratas también causa un aumento de lipoperoxidación en hígado y descenso en los niveles de glutatión (105).

Además la lipoperoxidación es inhibida por el 4-metil pirazol; un inhibidor de la deshidrogenasa alcohólica. Esto refleja la importancia del acetaldehído en la peroxidación de los lípidos hepáticos inducida por el etanol. El atrapamiento de radicales OH[·] por el 4-metil pirazol puede también contribuir al efecto inhibidor de la lipoperoxidación inducida por etanol (106).

La habilidad del acetaldehído para generar radicales libres se le ha imputado a su oxidación por la xantina oxidasa, una enzima generadora del anión superóxido. Para que suceda la oxidación del acetaldehído de manera eficiente en esta vía se necesitan dos condiciones: 1) La xantina deshidrogenasa (XD), que representa la forma principal de la enzima, puede ser convertida a su forma de oxidasa (XO) y 2) que el acetaldehído esté presente para ser sustrato de la enzima.

La primera condición se realiza durante la administración del etanol (107), hecho confirmado por otros autores (108). Al administrar una carga aguda de etanol se favorece la conversión de la enzima de la forma XD a la XO. Este efecto es probable que se deba a la hipoxia que ocasiona el etanol en los hepatocitos centrilobulillares. Tal hipoxia puede conducir a la activación de las proteasas dependientes de calcio dentro de los hepatocitos perilobulillares, convirtiendo la enzima de su forma XD a XO.

Otro hallazgo que apoya esta posibilidad es que la actividad específica de la XO en hígado de rata es más alta en hepatocitos perivenulares que en los periportales (109).

Otros mecanismos pueden favorecer la conversión de XD en XO durante la ingestión aguda de etanol, por ejemplo la sola presencia de acetaldehído lleva a cabo la conversión reversible de XD a XO por medio de su capacidad muy conocida para reaccionar con los grupos sulfhidrilo (110). También hay que mencionar que el NADH inhibe la actividad de la XD (11) y este se acumula durante la administración aguda de etanol (12).

La intoxicación crónica de etanol induce una mayor actividad de la XO y de la forma intermedia XD/XO, capaz de reaccionar con O_2 y con NAD^+ como aceptor de electrones. Mientras que, *in vivo*, varios mecanismos pueden contribuir a la conversión de XD a XO dependiente de la ingestión de etanol, la contribución de esta enzima al aumento de producción de radicales libres aún no está bien aceptada, porque para generar los radicales libres la enzima requiere además de estar en su forma XO, también la presencia de sustratos apropiados porque, aunque el acetaldehído puede actuar como sustrato de la forma XO de la enzima, la concentración que alcanza en el hígado, después de la administración de etanol (0.1 a 0.2mM) (113), está muy lejos de la concentración requerida para alcanzar la mitad de la velocidad máxima (K_m) de la enzima con el acetaldehído como sustrato que es de más de 30mM (114). Según otros autores esa concentración relativamente baja de acetaldehído que se encuentra en el hígado durante el metabolismo del etanol puede reaccionar en el sitio activo de la enzima XO y

generar OH' que a su vez aumenta la vida media de los radicales acetaldehído (83). La probable contribución del acetaldehído al estrés oxidativo por etanol requiere de una mejor evaluación.

Por otra parte la sobreproducción de otros radicales libres formados durante la participación de la XO después de una carga aguda de etanol pueden también ser resultado de la degradación de sustratos diferentes del acetaldehído y con afinidades mayores por la XO, como son la hipoxantina y la xantina. La literatura al respecto indica que existe un aumento en la degradación de purinas, después de la intoxicación aguda de etanol, aparecen mayores cantidades de AMP (monofosfato de adenosina), hipoxantina, xantina y en orina aumenta el ácido úrico y la alantoína (105). Parece que el acetato producido por la oxidación del acetaldehído es el mediador del aumento en la degradación de nucleótidos de adenina (115) y que además contribuye a la hiperuricemia típica que se observa en los alcohólicos (116). La contribución de la XO al aumento de la lipoperoxidación hepática inducida por etanol se demuestra porque cuando las ratas son pretratadas con un inhibidor de la XO como es el alopurinol, la lipoperoxidación se inhibe significativamente. Estos datos han sido confirmados por Kato (116) en contraste con otros hallazgos reportados por Kera (111).

Además de la XO, otras molibdo-flavoenzimas (por ejemplo la aldehído oxidasa), pueden participar en el estrés oxidativo por etanol. La Km de la acetaldéhído oxidasa para el acetaldéhído es más baja: 1mM (118), así es que su papel en la producción de radicales libres aunque no está bien evaluado, puede ser

importante. En apoyo de esta aseveración está el hecho de que el aumento de producción de alcanos inducido por etanol se controla mejor en los hepatocitos aislados de ratas tratadas crónicamente con tungstato que en los que proceden de ratas pretratadas con alopurinol. El tratamiento con tungstato produce una inhibición de la actividad de ambas enzimas: XO y aldehído oxidasa, mientras que el alopurinol solamente inhibe a la XO (119).

DISPONIBILIDAD DEL FIERRO EN LA GENERACION DE RADICALES LIBRES EN LAS RATAS TRATADAS CON ETANOL.

Cada vez se cuenta con más información en relación con el fierro no secuestrado (fierro libre), como un agente que tiene un papel muy importante como catalizador e iniciador de una variedad de reacciones de radicales libres que contribuyen al daño tisular dependiente de oxígeno (120). La reacción de Haber-Weiss catalizada por Fe es el mecanismo más ampliamente aceptado como generador de radicales OH' a partir de aniones superóxido. Otros oxidantes pueden ser producidos durante las reacciones entre el fierro "libre" y O₂ o bien el H₂O₂.

Más aún, el fierro tiene una acción aditiva en la lipoperoxidación porque acelera la descomposición de los peróxidos de lípidos y produce más radicales peroxilo y alcóxilo que pueden sustraer H y estimular la lipoperoxidación.

Los complejos de fierro libre capaces de promover reacciones de radicales libres *in vivo* parecen estar presentes como una pequeña poza de derivados de fierro, de bajo peso molecular, que puede ser aislada y que generalmente consiste en una molécula no

proteica con fierro unido al ATP, ADP, GTP o citrato. En membranas de microsomas se encuentran otros derivados de fierro que no están relacionados con el hemo ni con ferritina y que participan en la catálisis generadora de radicales libres (121). Un importante número de investigaciones se realiza sobre la influencia de la administración de etanol en la distribución del fierro en el hígado, en particular el fierro no relacionado con el hemo. Los reportes son contradictorios; sin embargo, parece bastante probable que el contenido de fierro no hémico aumenta en el hígado después de una carga de etanol; este aumento es más marcado en las fracciones mitocondrial, microsomal y citosólica; la máxima retención aparece en la fracción microsomal, hecho que contribuye al aumento de la lipoperoxidación inducida por etanol (122).

Otros estudios sugieren que el etanol en realidad lo que hace es facilitar la salida del fierro de sus depósitos (118). El ión superóxido es capaz de favorecer el desprendimiento del fierro de la ferritina (123) y en este mecanismo probablemente participe la XO. También un exceso de NADH puede favorecer la liberación del fierro de la ferritina. Inclusive el NADH puede participar como reductor del fierro unido a la transferrina (124). La captación celular del fierro de la transferrina incluye además del mecanismo de endocitosis mediada por el receptor, un sistema que conlleva la reducción del fierro. A nivel microsomal el fierro en su forma ferrosa puede producirse a partir del fierro que no es hémico, ni es de ferritina, por una vía directa de reducción mediante la reductasa P450 dependiente de NADPH.

No obstante que el mecanismo exacto responsable de los cambios en la distribución de fierro después de una carga aguda de etanol aún no se conozca, su importancia cada vez se subraya más con los experimentos en los que la administración de alopurinol previa a la carga de etanol previene la lipoperoxidación y los cambios en el fierro no hemico (125), hecho que sugiere un punto común entre ambas alteraciones. Otros apoyos resultan de trabajos en los cuales los niveles de lipoperoxidación reportada se exacerban en ratas tratadas aguda o crónicamente con sobredosis de fierro (126).

La administración crónica de etanol generalmente produce un aumento del contenido de fierro hepático total no hemico, en ratas. Sin embargo, hay otros reportes que contradicen lo anterior, la explicación podría estar en las dietas que reciben los animales (127).

Los múltiples hallazgos anormales desencadenados por el alcohol en distintas fracciones celulares indican que el mecanismo de generación de los radicales libres, contribuye al daño celular por etanol. Además, mediante el aumento de estos radicales la administración del etanol determina que se rebasen los mecanismos antioxidantes de la célula y se establezca el estrés oxidativo. Recientemente se les ha dado gran importancia a los sistemas antioxidantes celulares como entidades capaces de establecer procesos de adaptación durante el consumo crónico de etanol. Esta posibilidad será revisada en la siguiente sección.

**MECANISMOS DE PROTECCION CONTRA
LOS
RADICALES LIBRES**

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

El título propuesto para este capítulo ofrece un planteamiento muy general por lo cual es necesario aclarar que en una primera parte el enfoque será a nivel celular, se revisaran los mecanismos con los que cuentan las células para manejar los radicales libres del oxígeno que normalmente se están formando en el metabolismo. Se ilustrará con algunas patologías ocasionadas al rebasarse los mecanismos protectores o al lesionarse los procesos enzimáticos que intervienen. En segundo lugar se tratará sobre una serie de productos químicos, que incluyen desde nutrientes, vitaminas, hormonas y fármacos, en especial los anti-inflamatorios no esteroides, que se han propuesto para atrapar y de esta manera neutralizar el exceso de radicales libres desencadenante de varios procesos patológicos.

MECANISMOS CELULARES

La vida de los organismos depende de su interacción en mayor o menor grado con el oxígeno de la atmósfera. De ahí que hayan tenido que establecerse sistemas de protección contra el daño ocasionado por un exceso de radicales libres provenientes del oxígeno en condiciones fisiológicas. El más importante es sin duda la organización compartamentada de la célula, que separa las reacciones generadoras de radicales libres, en microambientes. Existen otras defensas celulares que incluyen atrapadores de radicales libres, de escaso peso molecular, así como complejos sistemas enzimáticos (fig 10). Todos ellos sirven para abatir las concentraciones basales de varias especies de radicales

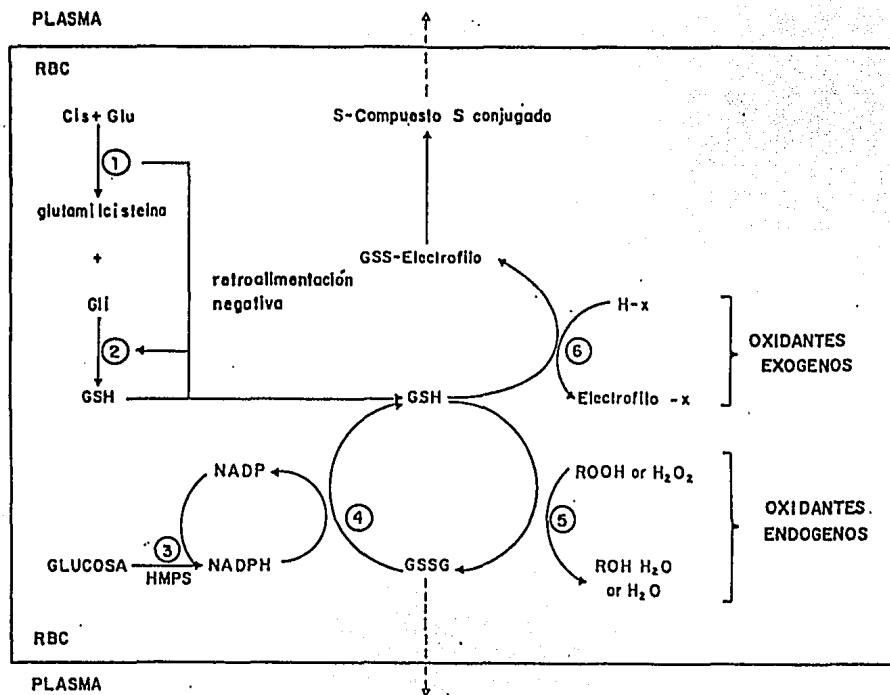


Figura 10 - Mantenimiento del sistema glutatión en el eritrocito. Cis = Cisteína; glu = glutamato; gli = glicina; GSH = glutatión reducido; GSSG = glutatión oxidado; 1 = glutamil-cisteín sintetasa; 2 = glutatión sintetasa; 3 = G6PDH; 4 = glutatión reductasa; 5 = glutatión peroxidasa; 6 = glutatión S transferasa; HMPS = vía colateral de los fosfatos de hexosa de Costagliola Rinaldi. RBC = eritrocitos.

libres, que de otra forma causan daños a los componentes celulares. Existen varias evidencias de lo crítico que llegan a ser estos mecanismos para la sobrevivencia de las células en un medio aeróbico (38).

Algunos compuestos como las vitaminas pueden secuestrar los radicales libres lipofílicos que están dispersos en las membranas y cambiarlos a otras especies menos tóxicas, por ejemplo la vitamina E (isómeros del tocoferol), es capaz de reducir $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} oxígeno singulete, peroxil-lípidos y otras especies (128). También se ha propuesto que el ascorbato (vitamina C) tenga propiedades semejantes y que pueda servir para mantener los tocoferoles en su forma activa reducida. El ascorbato es un reductor hidrosoluble, atrapador de radicales libres (129).

El β caroteno o vitamina A es un secuestrador eficiente de oxígeno singulete e inhibe la lipoperoxidación. En un sentido más amplio puede decirse que cualquier molécula que reaccione con un radical libre puede ser considerado como atrapador o secuestrador, de manera que varias moléculas, componentes celulares, como lo son los azúcares, aminoácidos insaturados, aminoácidos azufrados, ácidos grasos insaturados, pueden también secuestrar radicales libres. Los productos de esas reacciones pueden o no ser menos tóxicos para las células que los radicales libres originales (130).

Dentro del grupo de compuestos atrapadores de radicales libres que pueden considerarse citoplásmicos está el tripéptido glutatión (GSH), junto con su reductor el $NADPH_2$ y la catálisis enzimática pueden reducir al peróxido de hidrógeno, peroxil lípidos disulfuros, ascorbatos y radicales libres. Se insistirá más adelante sobre el glutatión como sistema atrapador de radicales libres.

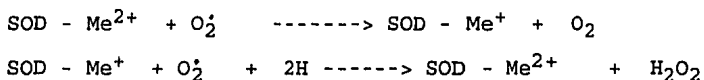
En las células de mamíferos existen reacciones no enzimáticas, catalizadas por metales, capaces de servir como secuestradores de radicales libres pero aún no se conoce en forma precisa su eficacia. Metales como el Zn^{2+} , el Mn^{2+} o las poliaminas pueden desplazar a los iones de fierro de los sitios de unión con fosfolípidos e inhibir bajo ciertas circunstancias la peroxidación de los lípidos.

Otras sustancias como el ácido úrico, presente en el plasma a una concentración de 300 μM , protege a la hemoglobina de la oxidación por peróxidos y a los eritrocitos del daño peroxidativo en sus lípidos membranales. Por su facilidad para reaccionar con el oxígeno singulete y con el OH' , el urato puede ser un atrapador de radicales libres muy eficaz. Se ha reportado que el ácido úrico evita que se oxide el ascorbato en el plasma (131) probablemente formando complejos estables con fierro y cobre (132). La urea inhibe también la oxidación del ascorbato en el plasma (133).

Otras moléculas consideradas como antioxidantes son compuestos lipo-solubles, que detienen las reacciones en cadena; además del β caroteno, y el α -tocoferol, se encuentra la bilirrubina, el estradiol y otros derivados del ácido ascórbico. Los compuestos secuestradores de radicales libres que son hidrosolubles y que han recibido atención además del ácido ascórbico, el ácido úrico y el glutatión son: la biliverdina, la cisteína y la cisteamina (β -mercapto etilamina), que pueden neutralizar radicales libres donando electrones de sus grupos sulfhidrilo. La bilirrubina en su forma conjugada es capaz de

secuestrar radicales libres y ligar cobre (134). Es muy probable que la bilirrubina conjugada tenga un papel muy importante en la detoxificación de los lípidos hidroperóxidos en la bilis. La ceruloplasmina (proteína transportadora de cobre) puede actuar como un antioxidante extracelular (135). Ultimamente se ha demostrado que la carnosina y los compuestos relacionados con ella (136), tienen también capacidad de donar átomos de hidrógeno a los radicales peroxilo y con ello terminar las reacciones en cadena, generadoras de RL.

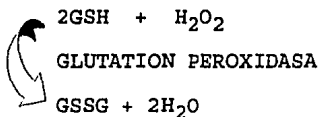
Enzimas secuestradoras de radicales libres - De gran importancia para la comprensión de los mecanismos antioxidantes fue la identificación por McCord Y Fridovich en 1969 (170) de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima cataliza la dismutación del anión superóxido, radical libre del oxígeno, a una velocidad 10,000 veces mayor que la dismutación espontánea al pH fisiológico. El manejo de esta importante estimulación se logra superando la repulsión electrostática del ión superóxido cargado negativamente. El sitio activo de las SOD contiene un metal ($SODMe^{2+}$) que es reducido por un anión superóxido y reoxidado por un segundo anión:



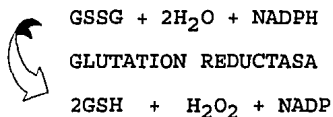
La presencia de esta reacción asegura la ausencia de iones superóxido, los cuales al reaccionar con el peróxido de hidrógeno forman radical hidróxilo mucho más peligroso para la

integridad biológica que las entidades químicas que lo generaron (ver página 56). La SOD existe en varias formas. Una de ellas, que se encuentra en la matriz mitocondrial, contiene Mg, otras citoplásmicas contienen Cu y Zn. Una SOD de plantas y bacterias contiene Fe. Las células tienen capacidad para aumentar la síntesis de la superóxido dismutasa en respuesta a un estrés oxidativo (137, 138). En los líquidos extracelulares existe una SOD de alto peso molecular que se adosa a las superficies de las células endoteliales y puede ser importante en algunos de los procesos patológicos mediados por radicales libres (139).

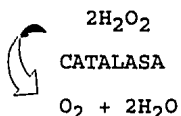
Existen dos enzimas que catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno; a bajas concentraciones el peróxido de hidrógeno es casi totalmente reducido por la acción de la glutatión peroxidasa que tiene como cofactor al glutatión reducido (GSH). Al finalizar la reacción se forma agua y el glutatión queda oxidado (GSSG).



Otra enzima, la glutatión reductasa, cataliza la regeneración del glutatión reducido a partir del glutatión oxidado y emplea NADPH como cofactor.

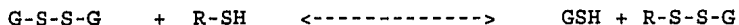


El ciclo de las pentosas es una fuente importante de NADPH. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción de los peróxidos de lípidos y evita la propagación de la lipoperoxidación. A concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno es muy importante la participación de otra enzima, la catalasa.



Las enzimas glutatión peroxidasas difieren de las hemoperoxidasas porque contienen selenio y por su especificidad por el sustrato. De los productos de la reacción de GSH no sólo resulta el glutatión oxidado (GSSG) también pueden haber un aducto del GSH-lípido o proteína.

Una manifestación secundaria del estrés celular causado por radicales libres es una disminución en la poza de NADPH, necesaria para la reducción del GSSG a GSH. Las transdeshidrogenasas celulares sirven para mantener el equilibrio entre NADH y NADPH. Un estrés oxidativo considerable puede hacer descender la concentración de piridín nucleótidos reducidos en la célula y afectar los procesos celulares (140). Otra manifestación tóxica del estrés oxidativo celular es el aumento de concentración de GSSG intracelular, lo cual puede afectar la conformación o la actividad de las proteínas enzimáticas que poseen grupos tiol, mediante el intercambio de tioles oxidados por reducidos.



El transporte activo de GSSG hacia afuera de los eritrocitos que son tratados con oxidantes y la aparición de GSSG en el perfusado de pulmones e hígados aislados de organismos tratados con oxígeno hiperbárico, indican que las células han desarrollado mecanismos para evitar los peligros potenciales de las reacciones de intercambio de disulfuros (141).

Antioxidantes en sangre y plasma - Wayner y cols (142) indican que la capacidad antioxidante de los componentes del plasma humano se manifiesta mediante el secuestro de radicales peróxido. Reportan que el urato alcanza entre un 35 a 65 %, las proteínas plasmáticas entre 10 y 50 %, el ascorbato de 0 a 24 % y la vitamina E entre 4 y 10 %. También observaron que los grupos sulfhidrilo de las proteínas decrecen y que la vitamina E y el urato escasean desde el principio.

Frei y cols (143) también estudiaron la importancia relativa de los antioxidantes plasmáticos en un modelo en el cual se agrega un radical libre iniciador soluble en agua para desencadenar una cascada de radicales libres y probar la eficiencia de varios componentes del plasma. Se obtuvo el siguiente orden de importancia: ascorbato > grupos sulfhidrilo > albúmina unida a bilirrubina > urato > vitamina E. En la membrana del eritrocito la vitamina E inhibe la hemólisis inducida por radicales libres (144).

Finalmente (145) se demostró la capacidad antioxidante de

los componentes en sangre, en un modelo en donde se induce la producción de radicales libres en una solución de sangre diluida 1:4 y oxidada mediante aereación a 37°C. El ácido ascórbico y la bilirrubina desaparecen a los 10 minutos. También el ácido úrico y el tocoferol desaparecen rápidamente. En el plasma, hidroperóxidos de triglicéridos y de ésteres de colesterol aumentan rápida e inmediatamente después de iniciada la incubación. El α -tocoferol y los grupos sulfhidrilo de la membrana permanecen sin cambio al principio, pero empiezan a descender a los 80 minutos de incubación. La salida de hemoglobina del eritrocito se inicia a los 100 minutos después de que han desaparecido cantidades considerables de α -tocoferol y grupos sulfhidrilos. Mientras que los iones de potasio salen desde las primeras etapas de incubación, lo que indica que el daño al eritrocito sucede mucho antes de que ocurra la hemólisis. Puede concluirse que el antioxidante más importante en plasma es el ascorbato y en las membranas eritrocíticas es el α -tocoferol.

Hormonas - Los corticosteroides inhiben la actividad de la fosfolipasa A_2 , la cual tiene un papel muy importante en la liberación de ácido araquidónico celular. Tanto los corticoides naturales como el cortisol y los sintéticos como la prednisolona y dexametasona inhiben la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Los corticoides actúan en forma indirecta produciendo una proteína inhibidora de la fosfolipasa A_2 que es la lipocortina. Otra acción de los corticoides se

ejerce sobre el factor activador de las plaquetas y sobre el poderoso mediador de la inflamación la interleucina-1 (146)

Agentes anti-inflamatorios - La terapia con atrapadores de agentes oxidantes ha recibido poca atención, más bien, los esfuerzos se han dirigido a la elaboración de productos que interfieren con la degradación de eicosanoides como son los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) y muchos de ellos han resultado, además, secuestradores de radicales libres del oxígeno. Se han desarrollado agentes terapéuticos con acciones similares a las de los corticoides, inhibidores de la ciclooxigenasa (147). Otros tienen acción dual e inhiben también la actividad de la lipooxigenasa y con ello impiden la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (147). Sin lugar a dudas el medicamento más empleado por la humanidad ha sido la aspirina. Su historia se remonta a 1763, cuando el reverendo Edmund Stone en Oxford, Inglaterra, leyó ante la Real Sociedad de Londres un reporte sobre la acción antipirética de la corteza del sauce. El principio activo se extrajo y se identificó como salicina y en 1899 la Casa Bayer de Alemania introdujo al mercado la forma acetilada del salicilato que es la aspirina. Tanto la aspirina como el salicilato son anti-inflamatorios potentes sin embargo la aspirina es un inhibidor más potente de la ciclooxigenasa que el salicilato. La aspirina administrada por vía oral sufre inmediatamente una hidrólisis en el tubo digestivo y en el hígado por una estearasa que lo hidroliza a acetato y salicilato. Los antiinflamatorios presentes en el sitio de la

inflamación pueden eliminar los radicales OH^{\cdot} , si se logra una concentración suficiente de la droga, se requiere de concentraciones milimolares (mM) y la mayoría de los AINES no alcanzan esa concentración. Los pacientes reumáticos que ingieren aspirina es posible que alcancen concentraciones de 1 mM en plasma y líquido sinovial suficiente para interceptar al OH^{\cdot} . Uno de los productos del ataque de los OH^{\cdot} sobre el salicilato es el 2,3-dihidroxibenzoato. Son mayores las concentraciones de esta sustancia en el plasma de pacientes tratados con aspirina en casos de artritis reumatoide. Es posible que parte del 2,3-dihidroxibenzoato sea producto del ataque por los OH^{\cdot} sobre la estructura del anillo aromático de la aspirina (148).

También se ha investigado la habilidad de las drogas AINES para secuestrar hipoclorito (HClO), ión que se produce en el sitio de la inflamación. Muchas de las drogas probadas son capaces de reaccionar con el hipoclorito HClO , pero el problema es que se logre secuestrarlo a las concentraciones de las drogas que se alcanzan en el sitio de la inflamación *in vivo*. Los atrapadores potenciales de HClO son compuestos con grupos tioles (penicilamina), oro, tiomalato de sodio, fenilbutazona, primaquina. También el 5-aminosalicilato, el compuesto activo de la sulfasalazina, que se emplea en el tratamiento de la colitis ulcerativa, es un poderoso atrapador de HClO , sin embargo, la sulfasalazina no lo es. El 4 amino-salicilato es una nueva droga aparentemente más poderosa para el tratamiento de la colitis ulcerativa y es también un poderoso atrapador de HClO (148).

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LAS ENFERMEDADES

El estudio de la asociación entre radicales libres y enfermedad ha resultado difícil por varias razones: son muy reactivos, existen en concentraciones muy bajas y "viven" muy poco, sin embargo cada vez existen más evidencias a favor de que los radicales libres están de alguna manera relacionados con varios padecimientos.

Es importante definir si un incremento en la formación de oxidantes puede causar una enfermedad. En algunos casos definitivamente si, como en algunos tipos de cáncer en los cuales puede producirse daño directo sobre el DNA por radicales libres (146) o bien en la retinopatía del recién nacido, ocasionada por la lipoperoxidación, que puede mejorarse con tratamiento a base de vitamina E (149). En otros casos, por ejemplo en la inflamación, los incrementos en la formación de agentes oxidantes son más bien una consecuencia de la actividad de la enfermedad. Por ejemplo: infiltración masiva de neutrófilos a un sitio, seguido de la activación de estas células para generar ión superóxido y peróxido de hidrógeno pueden producir un estrés oxidativo localizado muy intenso, tal como ocurre en la artritis reumatoide.

En algunos casos, por ejemplo en el traumatismo intenso con daño cerebral, lo que ocurre es la inactivación de antioxidantes celulares y la liberación de metales de transición intracelulares: iones de fierro que catalizan reacciones por radicales libres y con frecuencia aumenta la peroxidación de los

lípidos. Pero en otros casos, como en los pacientes con distrofia muscular, puede simplemente ser una consecuencia del daño tisular y no contribuir a él; los tratamientos con antioxidantes en esta enfermedad se ha observado que no mejoran al paciente. A continuación se presenta una lista de las enfermedades en las cuales está bien sustentada la evidencia de que intervienen procesos oxidativos. También se considera al envejecimiento como un proceso mediado por radicales libres (cuadro VIII).

**CUADRO VIII - ENFERMEDADES EN LAS QUE INTERVIENEN LOS
RADICALES LIBRES DEL OXIGENO**

- | | |
|--|--|
| <p>1. ALCOHOLISMO Y RADIACIONES</p> <p>Hepatitis alcohólica
Miopatía alcohólica.</p> <p>Sobrecarga de hierro.
Daño por radiación</p> <p>Radioterapia</p> | <p>2. ACUMULACION DE FIERRO</p> <p>Hemocromatosis idiopática dietética
Talasemia tratada con transfusiones múltiples
Deficiencias nutricionales de proteínas.
(Kwashiorkor)</p> |
| <p>3. CORAZON</p> <p>Cardiomiopatía</p> <p>Enfermedad de Keshan
(deficiencia de selenio)</p> <p>Aterosclerosis</p> <p>Cardiotoxicidad por adriamicina</p> | <p>4. APARATO DIGESTIVO</p> <p>Daño hepático por endotoxinas
Daño por hidrocarburos halogenados (CCl₄)
halotano
Acción diabetogénica del aloxano
Pancreatitis
Lesión gastrointestinal por antiinflamatorios
Envenenamiento por ingesta de fierro
Colitis ulcerativa</p> |
| <p>5. DAÑO INFLAMATORIO-INMUNOLOGICO</p> <p>Vasculitis</p> <p>Glomerulonefritis ideopática
Enfermedades auto-inmunes
Artritis reumatoide</p> | <p>6. ENVEJECIMIENTO</p> <p>Vejez prematura
(progeria)</p> |
| <p>7. ERITROCITOS
(toxicidad por)</p> <p>Fenil hidracina
Primaquina
Envenenamiento con plomo
Protoporfiria por fotooxidación
Malaria
Anemia falciforme</p> | <p>8. FAVISMO</p> <p>Anemia de Fanconi
Anemia hemolítica por prematurez</p> |

9. ISQUEMIA

Infarto del miocardio
 Arritmias
 Trasplantes de corazón

10. OJO

Cataratogénesis
 Hemorragia ocular
 Daño degenerativo de retina
 Retinopatía por prematuridad
 Retinopatía foveal

11. PIEL

Radiación solar
 Quemadura
 Porfiria
 Fotosensibilizadores
 Dermatitis de contacto

12. SISTEMA RESPIRATORIO

Humo del cigarro
 Enfisema
 Hiperoxia
 Displasia broncopulmonar
 Polución por O₃ y NO₂
 ARDS - Síndrome de insuficiencia respiratoria
 Neumoconiosis.
 Carcinogénesis por asbesto
 Toxicidad por bleomicina
 Toxicidad por SO₂
 Toxicidad por paraquat

13. SISTEMA NEUROMUSCULAR-CEREBRAL

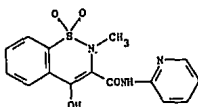
Oxígeno hiperbárico
 Deficiencia de vitamina E
 Neurotoxinas
 Enfermedad de Parkinson
 Accidente vascular cerebral

Enfermedad de Alzheimer.
 Exceso de aluminio
 Potenciación en la lesión traumática
 Distrofia muscular
 Esclerosis múltiple

De lo expuesto puede concluirse que los radicales libres del oxígeno normalmente se están formando durante el metabolismo celular; que existen varios sistemas celulares encargados del manejo de los radicales libres generados en condiciones normales, esos sistemas van desde moléculas pequeñas hasta enzimas

encargadas de reducir a los metabolitos oxidados por radicales libres o bien dismutar a los iones reducidos como es el caso del O_2 . Otras moléculas presentes en el plasma también ejercen una acción importante amortiguando los metabolitos oxidados. Las vitaminas y las hormonas tienen un importante papel antioxidante en las células. Las moléculas xenobióticas del tipo de los ANTI-INFLAMATORIOS tienen mecanismos de acción como secuestradores de radicales libres.

En particular se hará referencia al piroxicam, 4-hidroxi-2-metil-N-2-piridinil-2 H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dióxido, cuya estructura se presenta a continuación:



A diferencia de varios AINES muy comunes como la aspirina, ibuprofen, indometacina, naproxen, etc, no tiene ácido carboxílico en su molécula, sin embargo, se comporta como ácido en virtud de la capacidad de enolización del sustituyente 4-hidroxi. Además de sus propiedades farmacocinéticas el piroxicam es uno de los antiinflamatorios más potentes empleados en el tratamiento de enfermedades que cursan con reacción inflamatoria, dolor y fiebre, su potencia es semejante a la de la indometacina. La actividad antiinflamatoria del piroxicam no está mediada por acción de las glándulas suprarrenales. Es un inhibidor efectivo de la biosíntesis de prostaglandinas. No tiene efectos farmacológicos sobre el sistema cardiovascular o sistema nervioso central y en general es bien tolerado. Difiere de otros AINES

por sus notables atributos farmacocinéticos, tiene una prolongada vida media plasmática en el hombre (45 h) y una dosis pequeña de 40 mg/día, mantiene las concentraciones terapéuticas suficientes. Además, la administración concomitante de aspirina o antiácidos no afectan las propiedades del piroxicam. (168) Sin embargo, aún es difícil generalizar su empleo en las enfermedades que tienen como sustrato el exceso de producción de radicales libres o bien una deficiencia en los mecanismos atrapadores de los mismos. Conforme más se investiga es cada vez mayor el número de padecimientos en los cuales la causa probable de la patogénesis se atribuye a una generación excesiva de radicales libres del oxígeno o a un deficiente manejo de los mismos. Con todo esto se enmarca una nueva visión de las enfermedades y se abren más posibilidades para su manejo.

M E T O D O S

En relación al antiinflamatorio no esteroideo estudiado en este trabajo, el piroxicam, ya había sido empleado en la clínica para el tratamiento de la hepatitis alcohólica, aparentemente con buenos resultados (150). El cuadro clínico de la hepatitis alcohólica fue presentado en la página 43 del capítulo 4, es una enfermedad causada por la ingestión exagerada y prolongada de bebidas alcohólicas. Después de las observaciones hechas por un grupo de médicos del Hospital General de México, en las que notaban una importante mejoría en los pacientes que presentan junto con la hepatitis alcohólica un padecimiento reumático por el cual eran tratados con piroxicam, fuimos invitados a colaborar en un estudio cuyo fin era tratar de explicar, desde el punto de vista bioquímico el porqué de la mejoría observada. Al revisar la literatura que existe en relación con el piroxicam hay que subrayar que de los antiinflamatorios no esteroideos capaces de inhibir a la ciclooxigenasa, éste tiene la propiedad de disminuir la producción de aniones superóxido en neutrófilos activados *in vitro*. Este efecto ha sido demostrado también en células que proceden de pacientes que han ingerido el producto (151). Por otra parte existen numerosos datos para considerar a la hepatitis alcohólica o simplemente a la intoxicación alcohólica como entidades cuyo sustrato patológico puede radicar en la generación no compensada de radicales libres del oxígeno y del alcohol mismo (148), de manera que un medicamento capaz de inhibir la producción de ión superóxido y con ello lograr una menor liberación de H_2O_2 , de $HClO'$ y de iones hidroxilo resultaba atractivo para ser probado como agente hepatoprotector en ratas

alcohólicas. En seguida se diseñó el modelo de rata intoxicada con etanol en forma aguda que será analizado a continuación.

Desde la década de los sesenta fueron publicados una serie de trabajos en los que se dio a conocer que en varias condiciones experimentales incluyendo algunos tipos de estrés y diversos tratamientos como son la administración de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), etanol, tetracloruro de carbono y etionina se induce un aumento del contenido de triacilglicéridos hepáticos (152).

Más tarde Di Luzio (153, 154) fue el primero en proponer que el etanol podría afectar la capacidad antioxidante de la célula hepática. Esta hipótesis fue reforzada por el mismo autor, al encontrar que el acúmulo de triacilglicéridos se acompaña de un aumento de lipoperoxidación medido en homogenizados de hígado obtenido de ratas tratadas con etanol administrado por vía oral (155).

La rata Wistar macho fue seleccionada para servir a la conformación del modelo de estudio, las dosis de etanol empleadas fueron de acuerdo a las recomendadas en el trabajo de Videla y cols (171), 5 g de etanol por kg de peso administrado por vía oral, previamente diluido en agua para alcanzar un volumen final de 2 ml. Con esta dosis se observa que el animal después de 20 a 30 minutos generalmente cae en hipnosis.

CARACTERISTICAS DE LA INTOXICACION AGUDA EXPERIMENTAL CON ETANOL.

Los niveles de TAG hepáticos aumentan a partir de la primera hora después del tratamiento con etanol y continúan

incrementándose a las 2 y 4 h, alcanzando su máximo entre las 8 y 12 h. A las 16 h generalmente se inicia el regreso a la normalidad. Este efecto puede variar ligeramente según la dosis, la vía de administración del etanol y la técnica que se emplee para determinar los TAG hepáticos.

La lipoperoxidación medida como aparición de malondialdehído (MDA), aumenta durante la intoxicación etílica, el incremento varía con la dosis, vía de administración y con las condiciones que se emplean para la incubación de la reacción. Cuando se emplea TRIS como amortiguador durante la incubación de la reacción, el MDA aumenta desde las primeras 4 h y desciende a partir de las 8 h, sin embargo, en el grupo de animales control que solo recibió glucosa se observa también un incremento de MDA. Este efecto que será discutido más adelante determinó el empleo del amortiguador de fosfatos durante la incubación de la reacción. En estas condiciones es posible mantener bajos los niveles de MDA en el grupo control durante todo el tiempo que dure el estudio y registrar el aumento de la lipoperoxidación en los animales tratados con etanol entre las 8 y 12 h, después de lo cual se inicia el descenso a la normalidad. Puede comentarse que se inicia más lentamente que el aumento de TAGS, en el hígado.

Respecto al glutatión total hepático se tienen datos sobre su disminución en animales tratados con etanol y sacrificados 6 h después. Nuestro modelo evalúa los cambios a las 8 y 12 h post intoxicación etílica, también se valoran los niveles de glutatión oxidado que al ser restado del valor de glutatión total permite

cuantificar el glutati3n reducido.

Por 3ltimo, los niveles de alcohol en sangre aumentan de manera muy importante con la dosis administrada a partir de las 4 h es posible registrar concentraciones cercanas a 50 mM, que descienden a las 8 h y pr3cticamente desaparecen a las 12 h.

Conociendo todos estos efectos del etanol en el animal modelo de estudio, fue dise1ado el siguiente protocolo con el fin de detectar si el piroxicam era capaz de modificar los efectos producidos por el etanol.

PROTOCOLO

Un n3mero de ratas Wistar, 16 a 20 para cada condici3n experimental, macho, con peso de 200 a 225 g se dividieron en 4 grupos: A) control, recibid3 una cantidad isocal3rica de glucosa (en forma de soluci3n acuosa al 40% p/v) en relaci3n a la dosis de etanol, y una cantidad equivalente de la soluci3n veh3culo del piroxicam; B) etanol, recibid3 5 g de etanol por kg de peso corporal (en forma de soluci3n acuosa al 30%) y la cantidad equivalente de la soluci3n veh3culo; C) glucosa-piroxicam, recibe una cantidad isocal3rica equivalente de glucosa y piroxicam 10 mg por kg de peso corporal (como una soluci3n de glicerol-agua al 25% v/v con 7.5 mg de piroxicam 1 ml) y D) etanol-piroxicam, recibe 5 g de etanol y 10 mg de piroxicam por kg de peso corporal. Las soluciones y medicamentos fueron administrados por v3a oral mediante el empleo de una sonda orog3strica. Se realizaron tres series de experimentos, en una de ellos las ratas fueron ayunadas durante 16 h despu3s de lo cual se agruparon para

recibir sus respectivos tratamientos, en todos los casos por vía oral y así se mantuvieron 2 o bien 4, 6 y 8 horas, después de las cuales fueron sacrificadas por decapitación. Se obtuvieron muestras de los hígados de estos animales y se homogeneizaron en agua bidestilada. En una alícuota se determinaron los TAG por el método de Butler y col (156), proteínas por el método de Keyser y Vaughn (158) y MDA mediante la técnica de Ottolenghi (157) incubando la reacción en amortiguador TRIS 0.15 M, pH 7.4.

Otra serie de experimentos se diseñó después de analizar los primeros resultados que serán presentados en la siguiente sección. El protocolo se respetó en cuanto a los diferentes grupos de animales estudiados, las dosis de etanol y piroxicam se mantuvieron igual, lo que sí cambió el método para medir TAG en hígado que se realizó por la técnica de Gottfried y Rosenberg (155), la determinación de proteínas que se hizo en esta nueva serie de acuerdo con el método de Bradford (159) y para medir MDA se empleó en vez de TRIS como amortiguador, una solución de fosfatos 0.15 M pH 7.4. Esta nueva determinación se diseñó con objeto de lograr una mejor reproducibilidad, según datos confirmados en nuestro laboratorio en un experimento realizado por Saldaña (3). La incubación de la reacción se hace durante 30 minutos a 37°C y se termina mediante la adición de 1.5 ml de ácido acético al 20% pH 2.5 ajustado con potasa, después se agrega ácido tiobarbitúrico al 0.8%, las muestras se mantienen a temperatura de ebullición durante 45 minutos, por último se adiciona 1 ml de KCl al 2%. El método con algunas modificaciones se basa en la técnica originalmente descrita por Ottolenghi

(157), una versión muy detallada se encuentra en una publicación reciente de nuestro grupo (162). La determinación de etanol fue realizada en esta serie experimental mediante el método de Bernt y Guttman (160), para ello se colectó la sangre en tubos que contenían EDTA como anticoagulante y de ahí se tomó una alícuota de 50 μ l conforme indica el método.

Para la tercera serie de experimentos se emplearon animales alimentados *ad libitum* antes y después del tratamiento, la razón de este cambio fue porque los niveles de glutatión en los animales ayunados desciende conforme se prolonga el tiempo del ayuno, este descenso se exagera aún más mediante el tratamiento con etanol, de manera que resulta difícil medir los valores bajos que se registran. En este lote de animales se midieron los niveles de glutatión total (GT) y de glutatión oxidado (GSSG) con base en el método de Akerboom y Sies (161), siendo respectivamente el método I y IV de los que reporta el autor. La cuantificación de glutatión se realizó en una muestra de hígado que se congeló inmediatamente en N_2 líquido y después de pulverizarla se homogenizó en ácido perclórico 1 M en 2 mM de EDTA. Se centrifugó durante 5 minutos a 5,000 g y en una alícuota del sobrenadante se realizó la medición de GT y de GSSG. El glutatión reducido (GSH) se obtiene restando el valor de GSSG (como equivalentes de GSH) del valor de GT.

Los reactivos empleados proceden de Sigma Chemical excepto el fosfato monobásico y dibásico de sodio obtenidos en Merck de México y son de grado analítico:

En el tratamiento estadístico se empleó la "t" de Student

para la significancia entre los diferentes grupos comparados.

RESULTADOS

Los resultados van a ser presentados de acuerdo con el orden cronológico en el que fueron realizados. En la primera serie de experimentos el diseño tenía como objetivo inmediato hacer una exploración general y la evaluación de las técnicas, de manera que solamente se midieron TAG y MDA en hígado. Los TAG hepáticos determinados mediante el método de Butler no muestran cambios en los animales que recibieron glucosa o el AINE, en ninguno de los tiempos estudiados. El efecto muy conocido del alcohol (153, 154) se reproduce desde las 2 horas y se contrarresta cuando son tratados con piroxicam en forma simultánea. El efecto es francamente significativo a las 8 horas con una $p < 0.001$ (fig 11).

En esta misma serie de experimentos se midieron las concentraciones de MDA como índice de lipoperoxidación, para ello las alicuotas de homogenado fueron incubadas en amortiguador tris. Llamamos la atención los valores de MDA en los animales del grupo control porque son tan elevados como los del grupo experimental. Estos valores descienden cuando además de glucosa reciben piroxicam.

Los resultados después de 4 horas de tratamiento, muestran una mayor cantidad de MDA en las ratas que recibieron etanol comparadas con los que recibieron etanol y piroxicam, estos datos alcanzan significado estadístico. Los ensayos realizados a las 6 y 8 horas no muestran diferencias significativas (fig 12).

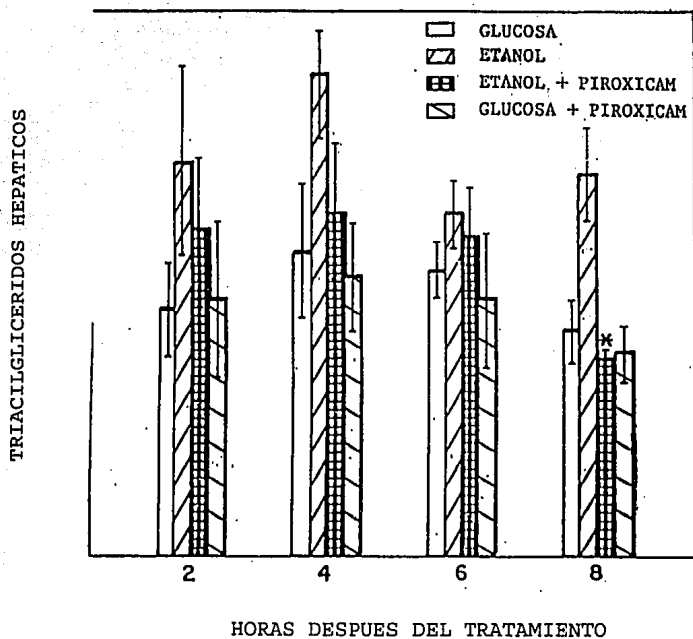


Figura 11.

Efecto del piroxicam sobre los niveles de TAG hepáticos a diferentes tiempos de tratamiento con etanol a la dosis de 5 g/kg de peso corporal por vía orogástrica. El piroxicam fue administrado a la dosis de 10 mg/kg de peso corporal por la misma vía y en forma consecutiva. Número de ensayos individuales de 4 a 5. Los valores de p se obtuvieron al comparar el grupo etanol vs etanol y piroxicam.

* $p < 0.001$.

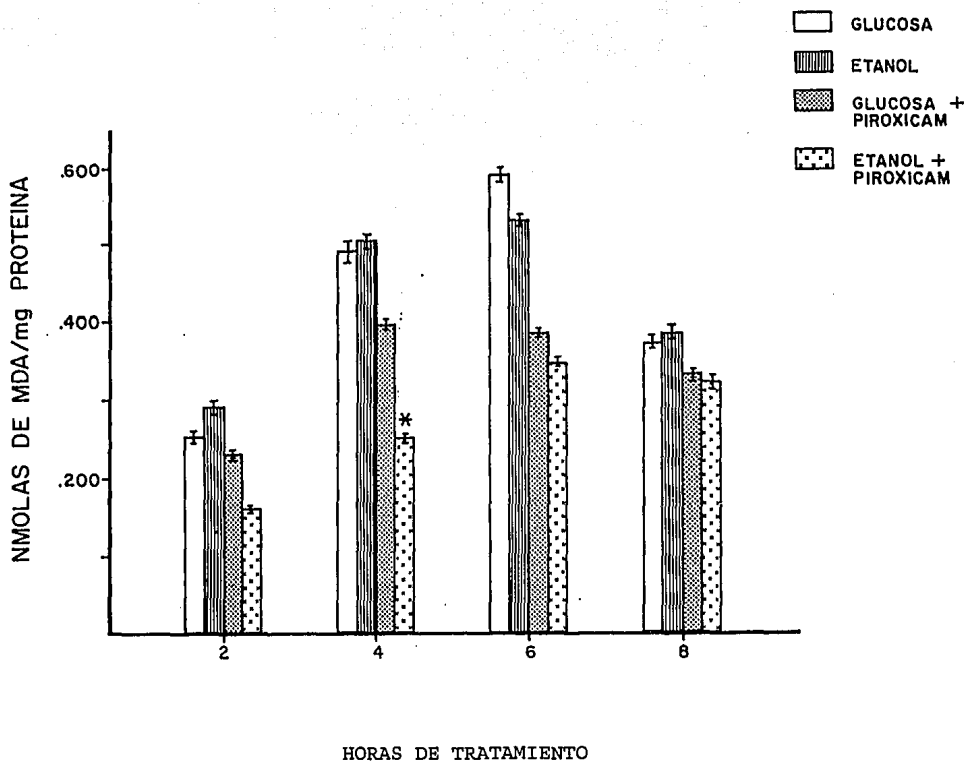
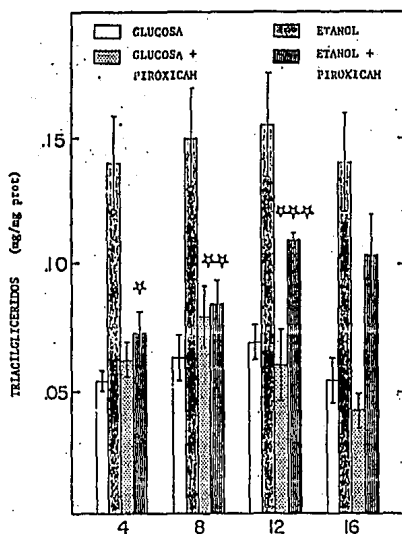


Figura 12 - Efecto del piroxicam sobre la lipoperoxidación inducida con etanol. Los niveles de MDA en hígado de rata a diferentes horas de tratamiento fueron estimados en homogenizado de hígado suspendido en amortiguador TRIS. $n = 6$. * $p < 0.05$ comparando etanol vs etanol piroxicam. Condiciones y dosis igual que en figura 11.

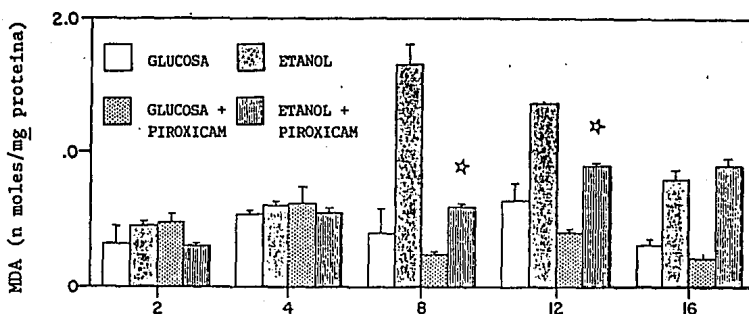
En una segunda serie de experimentos se manejaron técnicas diferentes para medir TAG y MDA hepáticas. Las concentraciones de TAG en alicuotas de homogenado de hígado medidas por el método de Gottfried muestran el típico incremento de TAG en hígado producido por el etanol (152, 153). El efecto se atenúa desde las 4 horas después del tratamiento y se mantiene hasta las 8 y 12 horas con significado estadístico y deja de tenerlo a las 16 horas. En general los resultados muestran una menor dispersión cuando se comparan con los obtenidos mediante el método de Butler (fig 13).



HORAS DESPUES DEL TRATAMIENTO

Figura 13 - Efecto del piroxicam sobre los niveles de TAG determinados mediante el método de Gottfried. Dosis y condiciones del ensayo igual que en figura 11. El número de ensayos individuales varia de 4 a 15. Los valores de p al comparar el grupo etanol vs etanol + piroxicam; * p < 0.001, ** p < 0.01 y *** p < 0.05.

En esta misma segunda serie de experimentos se determinó MDA, para ello se incubaron las alicuotas del homogenado de hígado en amortiguador de fosfatos 0.15 M pH 7.4; hay diferencias significativas al comparar el grupo que recibió etanol vs etanol más piroxicam a las 8 y 12 horas, (fig 14) después del tratamiento. Puede observarse que en contraste con los resultados obtenidos cuando se emplea amortiguador tris los valores del grupo control son menores que los del grupo experimental tratado con etanol .



HORAS DESPUES DEL TRATAMIENTO

Figura 14 - Efecto del piroxicam sobre la lipoperoxidación en el hígado de ratas a diferentes horas de tratamiento. Se empleó amortiguador de fosfatos 0.15 M, pH 7.4 para homogeneizar el hígado e incubar la reacción. Dosis igual que en figura 11, n de 3 a 7, * $p \leq 0.001$ al comparar etanol vs etanol y piroxicam

Dentro de la misma serie de experimentos se midió alcohol en sangre. Las determinaciones se hicieron a las 4 y 8 horas (fig 15). Puede observarse que el grupo que además de etanol recibió piroxicam a las 8 horas, mantiene los niveles de alcoholemia menores en un 38% comparados con los del grupo que recibió etanol solamente. Los valores obtenidos a las 8 horas muestran diferencias estadísticamente significativas.

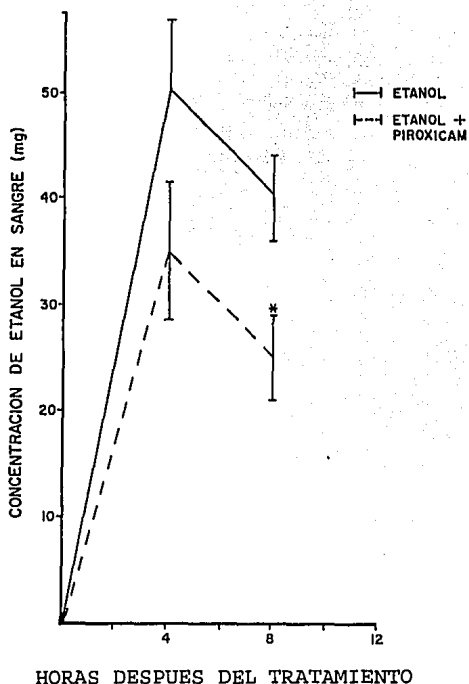


Figura 15 - Efecto del piroxicam sobre los niveles de etanol en sangre. Condiciones y dosis igual que en figura 11. Valores de $p < 0.05$ comparando el grupo de etanol vs etanol piroxicam a las 8 horas. El n a las 4 horas de 7 a 11 y a las 8 horas $n = 7$.

La última serie de experimentos fue diseñada para medir

glutation total y oxidado en el hígado de rata. Los animales continuaron alimentándose durante todo el curso del experimento. Los animales que fueron sacrificados a las 8 horas post tratamiento iniciaron el mismo a las 9 AM, mientras que cuando el tratamiento duró 12 horas, se inició a las 5 AM esto es para sacrificar los dos grupos de animales a las 17 horas en todos los casos y evitar variaciones circádicas.

Los niveles de glutatión hepático se presentan en las tablas I y II. El tratamiento con etanol disminuye el contenido de glutatión total y de glutatión reducido, a las 8 horas después de la intoxicación (Tabla I) y el contenido de glutatión total 12 horas después del mismo tratamiento (TABLA II). La administración de piroxicam consecutiva a la del etanol produjo un aumento en los niveles de glutatión total y reducido, que contrarresta el descenso producido por el etanol. (TABLAS I y II). El GSSG medido a las 8 y a las 12 horas en los cuatro grupos experimentales no muestra cambios significativos.

TABLA I

EFFECTO DEL PIROXICAM SOBRE LOS VALORES DE GLUTATION
EN HIGADO DE RATA A LAS 8 HORAS DE TRATAMIENTO.

μ molas/kg de peso húmedo, promedio \pm error standar.

Número de ratas en paréntesis.

Tratamiento	GSH	GSSG	GT*
Glucosa	4.70 \pm 0.35 ^a (6)	0.190 \pm 0.035 (6)	4.89 \pm 0.35 (6)
Glucosa + piroxicam	4.72 \pm 0.32 (7)	0.270 \pm 0.065 (7)	4.99 \pm 0.27 (7)
Etanol	4.13 \pm 0.25 (7)	0.192 \pm 0.003 (7)	4.32 \pm 0.28 (7)
Etanol + piroxicam	5.02 \pm 0.19 ^a (6)	0.235 \pm 0.058 (6)	5.25 \pm 0.21 ^b (6)

* Los equivalentes totales de GSH (GT) fueron calculados de acuerdo con la relación $GT = GSH + 2GSSG$.

^a $p < 0.01$ al comparar etanol vs etanol + piroxicam.

TABLA II

EFFECTO DEL PIROXICAM SOBRE LOS VALORES DE GLUTATION
EN HIGADO DE RATA A LAS 12 HORAS DE TRATAMIENTO.

$\mu\text{molas/kg}$ de peso húmedo y promedio \pm error standar.

Número de ratas en paréntesis.

Tratamiento	GSH	GSSG	GT*
Glucosa	3.54 \pm 0.18 (6)	0.512 \pm 0.007 (6)	4.11 \pm 0.13 (6)
Glucosa + Piroxicam	3.87 \pm 0.47 (4)	0.588 \pm 0.114 (4)	4.46 \pm 0.29 (4)
Etanol	2.47 \pm 0.32 (4)	0.634 \pm 0.075 (4)	3.11 \pm 0.31 ^a (4)
Etanol + Piroxicam	3.88 \pm 0.34 (4)	0.439 \pm 0.148 (4)	4.32 \pm 0.24 ^b (4)

a $p < 0.05$ al comparar glucosa vs etanol

b $p < 0.02$ al comparar etanol vs etanol + piroxicam

* Los equivalentes totales de GSH (GT) fueron calculados de acuerdo con la relación $GT = GSH + 2GSSG$.

9

**DISCUSION
Y
CONCLUSIONES**

Respecto al método empleado en el desarrollo de este trabajo se pueden ofrecer las siguientes conclusiones: se emplearon dos técnicas diferentes para medir triacilglicéridos hepáticos: el método de Butler (156) y el de Gottfried (155). Los datos obtenidos demuestran que la técnica de Gottfried resulta más exacta como puede observarse al comparar las figuras 11 y 13. En relación a la lipoperoxidación también fue medida en dos condiciones diferentes, en una de ellas se emplea amortiguador TRIS 0.15 M pH 7.4 y en la otra el TRIS es reemplazado por fosfatos 0.15 M pH 7.4, sin lugar a dudas puede concluirse que el empleo del amortiguador de fosfatos durante la incubación de la reacción ofrece una mayor exactitud en la determinación del MDA como indicador de la lipoperoxidación. Las figuras 12 y 14 ilustran claramente ambas situaciones.

Aunque en la literatura existe suficiente evidencia experimental indicativa de que el daño celular por etanol está mediado por radicales libres del oxígeno y del etanol mismo (78), hasta hace pocos años otros autores no observaban ningún incremento de MDA durante la administración aguda o crónica de etanol (165,166). Una revisión muy completa sobre el tema realizada por varios autores (80,167) permite concluir que las controversias pueden ser explicadas en vista de las numerosas variables y las diferentes condiciones experimentales de las reacciones utilizadas en cada caso. Los resultados también varían según las vías de administración del etanol, las dosis y las técnicas empleadas para las mediciones. En relación al aumento del contenido de TAG hepáticos existen menos discrepancias en la

literatura.

En el modelo de estudio seleccionado para la realización de esta tesis fue posible corroborar tanto el aumento de los TAG hepáticos como el aumento de la lipoperoxidación medida por el aumento de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).

La determinación de etanol en sangre en función del tiempo fue establecida en el modelo de estudio y en la curva correspondiente se muestra que las concentraciones más altas se alcanzan a las 8 horas.

La administración aguda de etanol determina además de un aumento en la generación de radicales libres del oxígeno y del etanol mismo, una disminución de las defensas antioxidantes que en ciertas condiciones determina la instalación del estrés oxidativo. Durante esta situación se observa en el hígado además del aumento de lipoperoxidación, un marcado descenso de las defensas antioxidantes como el glutatión reducido. Efectivamente en el estudio realizado se detecta una disminución del glutatión hepático total y reducido a las 8 y 12 horas después de la administración de una carga aguda de etanol. Este descenso de glutatión es equiparable al reportado por otros autores (168).

Una vez logrados los efectos bien conocidos del etanol y seleccionadas las mejores técnicas, en nuestro modelo de estudio se procedió al diseño experimental para comparar los animales intoxicados con etanol con un grupo de animales que recibe además del etanol un antiinflamatorio no esteroideo: el piroxicam. La acción de este AINE como atenuador de los efectos del etanol es

notable en lo que se refiere al aumento de TAG en el hígado desde las primeras 4 horas (figs 11 y 13) y es altamente significativo a las 8 y 12 horas.

A las 16 horas ya no se observa el efecto atenuador (fig 13) sino al contrario aumentan los TAG hepáticos en forma significativa. Esta situación puede indicar más bien un efecto retardador del acúmulo de lípidos hepáticos, más que de un efecto antihígado graso. Si así fuera, la posibilidad de un efecto retardador ejercido por el piroxicam probablemente sería en beneficio del hepatocito porque manejaría en un mayor tiempo una carga de TAG dando mayor oportunidad al restablecimiento de la homeostasis.

La administración del AINE controla el aumento de lipoperoxidación producido por el etanol (fig 12) y es significativo a las 4 horas cuando se usa amortiguador TRIS, mientras que con el empleo de fosfatos se observa significado estadístico a las 8 y 12 horas (fig 14). También puede verse que a las 16 h el grupo que recibió exclusivamente etanol, tiende a normalizarse, mientras que el grupo tratado con etanol y piroxicam los niveles de MDA ya no continúan en descenso (fig 14).

Esta es una situación paralela a la que ocurre con el contenido de TAG hepáticos y cabe comentar que bien puede tratarse de que la lipoperoxidación en este grupo de animales sea más lenta, probablemente en forma más controlada de manera que la célula puede sufrir menos las consecuencias de la degradación oxidativa de sus lípidos porque el aumento de radicales libres

producidos durante el metabolismo del etanol también será más controlado .

En relación a los niveles de glutatión el piroxicam revierte los efectos tóxicos del etanol, normalizando las concentraciones hepáticas del glutatión reducido a las 8 horas (tabla I). El efecto sin embargo, se sostiene hasta las 12 horas (tabla II).

Por último, para explicar una atenuación en la etanolemia (fig 15) producida por el piroxicam se ha propuesto un aumento en la velocidad de oxidación del etanol. Sin embargo, esta explicación se invalida en parte porque otros parámetros como son el contenido de TAG hepáticos y la lipoperoxidación tienden a normalizarse más lentamente, lo cual es poco congruente con el aumento en la oxidación del etanol ya que en esta situación se esperaría que los cambios en TAG y lipoperoxidación hepáticos regresaran a la normalidad más rápidamente.

Otras alternativas para explicar la acción del piroxicam sobre los efectos del etanol podrían radicar en una inhibición de la salida de TAG del tejido adiposo al hígado, lo cual sería congruente con una menor disponibilidad de sustrato para la lipoperoxidación o bien, que este AINE sea capaz de fijar el etanol a los fosfolípidos de membrana, de lo cual también resultaría una menor concentración en sangre y una atenuación de los efectos del etanol en el hígado. Existen trabajos en la literatura en los cuales se demuestra la formación de ésteres de ácidos grasos y etanol en órganos como el páncreas y el corazón (163, 164). Cabe comentar que el piroxicam es sumamente hidrofóbico y la posibilidad de que se integre a bicapas

lipídicas no es remota. Quedaría por estudiar la alternativa de que las membranas plasmáticas puedan alojar una gran cantidad de moléculas de etanol responsable de mantener casi a la mitad la etanolemia durante varias horas.

Otra posibilidad es que el AINE aquí estudiado ejerza su acción protectora funcionando como secuestrador de radicales libres. Esta acción está reportada para varios AINES (151) incluyendo el piroxicam en neutrófilos activados capaces de producir especies reactivas del oxígeno que son atrapadas por los AINES. La evidencia experimental puede ser obtenida con el empleo de la resonancia paramagnética electrónica (EPR). Nuestro grupo tiene investigaciones en curso, con el empleo del EPR muy preliminares, indicativas de que el piroxicam pudiera ser una molécula atrapadora de radicales libres. Este dato explicaría en gran parte el control de los efectos del etanol observado, aunque no así la disminución de la alcoholemia. Para explicarla se han diseñado otros estudios en donde se mide directamente la actividad de la deshidrogenasa alcohólica *in vitro* en presencia de AINE.

La acción de AINE también puede que suceda en las mitocondrias, cuando facilita en la membrana mitocondrial la entrada del NADH_2 a través de las lanzaderas y de esta manera se logre acelerar la oxidación del etanol obteniéndose una mayor disponibilidad de NAD^+ , aunque directamente no se emplee el NADH_2 , si puede medirse si los sistemas de lanzaderas capaces de introducir equivalentes reductores a la mitocondria se aceleran por acción del piroxicam. También es importante evaluar en

mitocondrias de hígado tratadas con etanol, etanol + piroxicam y piroxicam solo, el consumo de oxígeno en estado 3 y 4, conocer el cociente respiratorio y la fosforilación oxidativa con el empleo de sustratos de sitio I y sitio II, con objeto de saber si se trata de una acción desacoplante del piroxicam, sobre la fosforilación oxidativa, que pueda en un momento dado compensar los efectos tóxicos del etanol sobre las mitocondrias, acelerando la respiración de las mismas, con pérdida en la producción de ATP, pero con el restablecimiento de la normalidad.

Cualquiera que sea la verdadera explicación de las descritas anteriormente, puede decirse que el mecanismo pivote de las alteraciones celulares inducidas por la intoxicación alcohólica aguda es la generación exagerada de especies reactivas del oxígeno o radicales libres del etanol mismo.

Es probable que el antiinflamatorio podría contrarrestar los efectos del etanol, aumentando las defensas celulares antioxidantes concretamente la poza de glutathion hepático. Por otra parte además del aumento de las defensas antioxidantes celulares el AINE podría ejercer otro acción adicional evitando la generación de radicales libres, o bien, atrapar a los ya generados y de esta manera proteger a las células hepáticas del estrés oxidativo inducido con la carga de etanol.

Por último para obviar la movilización de lípidos hacia el hígado o la dificultad para exportar triacilglicéridos hepáticos durante la intoxicación con etanol se recomienda simplificar el modelo del animal integro y emplear el hepatocito, aislado para evaluar la acción hepatoprotectora del piroxicam.

B I B L I O G R A F I A

1. Rodríguez Lizarraga L, Díaz Belmont A, Zentella de Piña M. Frecuencia de Hepatopatía y su relación con el patrón de consumo. *Rev Med Hosp Gral (Mex)* 1993; en prensa.
2. Gomberg ESL y Schilit R.: Social isolation and passivity of women alcoholics. *Alcohol and Alcoholism* Editorial 20:313-314;1985.
3. Zentella de Piña M, Hernández-Tobias A, Saldaña-Balmori Y, Díaz Belmont A y Piña E. Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett.* 298:1923-1925;1992.
4. Von Wartburg JP y Bühler R. Biology of disease. *Alcoholism and Aldehydism: New biomedical concepts.* *Lab Invest* 50:5-15;1984.
5. Julkunen RJ, Di Padova C y Lieber CS. First pass metabolism of ethanol a gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol. *Life Sci* 37:567-573;1985.
6. Goodman DW y Deyben D. Fatty acid ethylester formation during ethanol metabolism in vivo. *Proc Soc Exp Med* 113:65-67; 1963.
7. Lapostata EA y Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 231:497- 499; 1986.
8. Goedde HW y Argawal DP. *Alcoholism. Biomedical and Genetic Aspects.* Pergamon Press Inc. pp 10-13;1989.

9. Frezza M, Padova C, Pozzato G, Terpen M, Baraona E y Lieber CS. High blood alcohol levels in women: role of a decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first pass metabolism. *N Engl J Med* 322:95-99;1990.
10. Hernández-Muñoz R, Caballería J, Baraona E, Uppal R, Groenstein R y Lieber CS. Human gastric alcohol dehydrogenase, its inhibition by H₂ receptor antagonist and its effects on the bioavailability of the ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 14:946-950; 1990.
11. Roine R, Gentry RT, Hernández Muñoz R, Baraona E y Lieber CS. Aspirin increases blood alcohol concentration in human after ingestion of ethanol. *JAMA.* 264:2406-2408;1990.
12. Iseri OA, Gottlieb, LS y Lieber CS. The ultrastructure of ethanol-induced fatty liver. *Fed Proc.* 23:579-584;1964.
13. Lieber CS y De Carli LM. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J Biol Chem.* 245:2505-2512; 1970.
14. Racker E. Aldehyde dehydrogenase: A diphosphopyridine nucleotide-linked enzyme. *J Biol Chem* 177:883-892; 1949.
15. Harada S, Argawal DP y Goedde HW. Aldehyde dehydrogenase polymorphism and alcohol metabolism in alcoholics. *Alcohol* 2: 391-392;1985.
16. Krebs HA. The effects of ethanol on the metabolic activities of the liver. *Enzyme Regul.* 6:467-480;1968.
17. Thurman RG. Hepatic alcohol oxidation and its metabolic liability. *Fed Proc* 36:1640-1614;1977.

18. Cederbaum AI y Rubin E. Molecular injury to mitochondria produced by ethanol and acetaldehyde. Fed Proc. 34:11-17; 1975.
19. Krebs HA, Freedland RA, Hems R y Stibbs M. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. Biochem J. 112:117-124;1969.
20. Beckett AG et al: Acute alcoholic hepatitis. Br Med J. 2:1113-1115;1961.
21. Marjanen L. Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver, J Biochem 127:633-637; 1972.
22. Grunnet N. Oxidation of acetaldehyde by rat liver mitochondria in relation to ethanol oxidation and the transport of reducing equivalents across the mitochondrial membrane. Eur J Biochem 35:236-240;1973.
23. Mendenhall C.L. Clinics in Gastroenterology. Vol. 10 No. 2: p 429;1981.
24. Sorrell MF y Tuma DJ. Hypothesis: Alcoholic liver injury and the covalent binding of acetaldehyde. Alcohol Clin Exper Res 9:306-309;1985.
25. Lieber CS. Alcohol and the liver: 1984 Update. Hepatology 4: 1243-1260;1984
26. Palmer KR y Jenkins WJ. Aldehyde dehydrogenase in alcoholic subjets. Hepatology 5: 260-263; 1985.
27. Crossley IR, Neuberger J, Davis M, Williams R y Eddlestone AL. Ethanol metabolism in the generation of new antigenic determinants on liver cells, Gut 27:186-189;1986.
28. Donohue TM, Tuma DJ y Sorrell MF. Acetaldehyde adducts with proteins: binding of C¹⁴ acetaldehyde to serum albumin. Arch Biochem Biophys 1:239-246;1983.

29. Fraenkel-Conrat H y Singer B. Nucleoside adducts are formed by cooperative reaction of acetaldehyde and alcohols: possible mechanism for the role of ethanol in carcinogenesis Proc Nat Acad of Sci (USA). 85:3758-3761;1988.
30. Hoerner M, Behrens UJ, Worner TM, Blacksberg I, Braly LF, Schoffner F y Lieber CS. The role of alcoholism and liver disease in the appearance of serum antibodies against acetaldehyde adducts. Hepatology. 8: 569-574;1988.
31. Israel Y, Hurwitz E, Nümelä O y Arnon R. Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts. Proc Nat Acad Sci 83:7923-7927;1986.
32. Videla L y Israel Y. Factors that modify the metabolism of ethanol in rat liver and adaptive changes produced by its chronic administration. Biochem J 118:275-281;1970.
33. Israel Y, Videla L, Mc Donald, A y Berinstein J. Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol administration. Biochem J 134:523-529;1973.
34. French SW, Benson NC y Sun PC. Centrilobular liver necrosis induced by hypoxia in chronic ethanol fed rats. Hepatology 4:912-917; 1984.
35. Sato N, Kamada T, Kawans S, Hayashi N, Kishida Y, Maren H, Yoshihara H y Abe H. Effect of acute and chronic ethanol consumption on hepatic tissue oxygen tension in rats. Pharmacol Biochem Behav 18:443-447;1983.
36. Lieber CS, Baraona E, Hernandez Muñoz R, Kubota S, Matsumura T y Inatomi N. Impaired oxigen utilization. A new mechanism for

the hepatotoxicity of ethanol in sub human primates. *J Clin Invest* 83:1682-1690;1989.

37. Jauhonen P, Baraona E, Miyakawa H y Lieber CS. Mechanism for selective perivenular hepatotoxicity of ethanol, *Alcohol Clin Exp Res* 6:350:357;1982.

38. Dormandy TL. Biological rancidification. *Lancet* 2:684-688;1969.

39. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyen P y Fenn WO. Oxygen poisoning and irradiation: A mechanism in common. *Science*. 119:623-626;1954.

40. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand.* (suppl) 492:153-168;1980.

41. Di Luzio NR. A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. *Lab Invest*. 15:50-62;1966.

42. Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 219:1-14;1984.

43. Varma SD, Chand D, Sharma VR, Kuck JF Jr y Richards RD. Oxidative stress on lens and cataract formation: Role of light and oxygen. *Curr Eye Res* 3:35-37,1984.

44. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-257;1983.

45. Pryor WA. Oxy radicals and related species: Their formation, life span and reactions. *Annu Rev Physiol*. 48:657-667;1986.

46. Wolin MS y Belloni FL. Superoxide anion selectively attenuates catecholamine-induced contractile tension in isolated rabbit aorta. *Am J Physiol*. 249:H 1127-1133;1985.

47. Barber AA y Berhein F, Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *Adv Gerontol Res* 2:355-403;1967.
48. Mendenhall CHL. Alcoholic hepatitis in Schiff L y Schiff E (eds): *Diseases of the Liver* Lippincott JB. Philadelphia Sixth edition, p 669-681; 1987.
49. Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI y Koch OR. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys.* 227:534-541;1983.
50. Lieber CS y De Carli LM. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system. In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J Biol Chem.* 245:2505-2512;1970.
51. Thurman RG. Induction of hepatic microsomal NADPH-dependent production of hydrogen peroxide by chronic prior treatment with ethanol. *Mol Pharmacol.* 9:670-675;1973.
52. Klein SM, Cohen G, Lieber CS y Cederbaum AI. Increased microsomal oxidation of hydroxyl radical scavenging agents and ethanol after chronic consumption of ethanol. *Arch Biochem Biophys* 223:425-432;1983.
53. Dicker E y Cederbaum AI Hidroxyl radical generation by microsomes after chronic consumption of ethanol. *Arch Biochem Biophys.* 223:425-432;1983.
54. Joly JG, Ishii H, Teschke R, Hasamura Y y Lieber CS. Effect of chronic alcohol feeding on the activities and the microsomal distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome P-450 reductase and demethylase for

aminopyrene and ethylmorphine. *Biochem Pharmacol* 22:1532-1535;1973.

55. Ekström G, Cronholm T y Ingelman-Sundberg M. Hydroxyl-radical production and ethanol oxidation by liver microsomes isolated from ethanol-treated rats. *Biochem J* 233:755-761;1986.

56. Koop DR, Morgan ET, Tarr GE y Coon MJ. Purification and characterization of a unique isozyme of a cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J Biol Chem.* 257:8472-8480;1982.

57. Ryan DE, Romanathan L, Iida S, Thomas PE, Haniu M, Shively JE, Lieber CS y Levin W. Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450. induced by isoniazid. *J Biol Chem.* 260:6385-6393;1985.

58. Patten CJ, Ning SM, Lu AYH y Yang CS. Acetone inducible cytochrome P-450; Purification, catalytic activity and interaction with cytochrome b5. *Arch Biochem Biophys.* 251:629-638;1986.

59. Wrington SA, Thomas PE, Molowa DT, Haniu M Shively JE. Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase. *Biochemistry (USA).* 25:6731-6735;1986.

60. Lasker JM, Raucy J, Kubota S, Blowski BP, Black M y Lieber CS. Purification and characterization of human liver cytochrome P-450 alc. *Biochem Biophys Res Commun* 148:232-238;1987.

61. Nebert DW, Nelson M, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW y González FJ, et al. The P-450 superfamily: Update listing of all genes recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA.* 8:

1-13; 1989.

62. Ingelman-Sundberg M y Jörnval H. Induction of the ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450 by inhibitors of alcohol dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 124: 375-382; 1984.

63. Ryan DE, Koop DR, Thomas PE, Coon MJ y Levin W. Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver; an isozyme 3a *Arch Biochem Biophys.* 246: 633-644; 1986.

64. Ingelman-Sundberg M y Hagbjork AL. On the significance of the cytochrome P-450 dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica.* 12: 673-686; 1982.

65. Johanson I, Ekstrom G, Scholte B, Puzycki D, Jörnvall H y Ingelman-Sundberg M. Ethanol fasting and acetone cytochromes P-450 in rat liver; Regulation and belonging to II B and II E gene subfamilies. *Biochemistry* 27: 1925-1934; 1988.

66. Morgan ET, Koop DR y Coon MJ. Catalytic activity of cytochrome P-450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol treated rabbits. *J Biol Chem* 257: 13951-13957; 1982.

67. Lucas D, Berthou F, Dreano Y, Floch H H y Menez JF. Ethanol-inducible cytochrome P-450: Assessment of substrates specific chemical probes in rat liver microsomes. *Alcoholism Clin Exp Res.* 14: 590-594; 1990.

68. Morgan ET, Koop DR y Coon MJ. Comparison of six rabbit liver of cytochrome P-450 isozymes in formation of a reactive metabolism of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun.* 112: 8-13; 1983.

69. Brady JF, Lee MJ, Li M, Ishizaki H y Yang CS. Diethyl ether as a substrate for acetone/ethanol-inducible cytochrome P-450 and as an inducer for cytochrome (s) P-450. *Mol Pharmacol* 33: 148-154; 1988.
70. Johansson I y Ingelman-Sundberg M, Carbon tetrachloride - induced lipid peroxidation depends on a ethanol iducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett* 183: 265-269; 1985.
71. Reinke LA, Rau JM y Mc Cay PB. Possible roles of free radicals in alcoholic tissue damage. *Free Rad Res Commun* 9: 205-211; 1990.
72. Cederbaum AI, Dicker E, Rubin E y Cohen G. The effect of dimethylsulfoxide and other hydroxyl radical scavengers on the oxidation of the ethanol by rat liver microsomes. *Biochem Biophys Rev Commun* 78: 1254-1262; 1977.
73. Cederbaum AI. Oxygen radical generation by microsomes: Role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *Free Rad Biol Med* 7: 559-567; 1989.
74. Krikun G y Cederbaum AI. Evaluation of microsomal pathways of oxidation of alcohols and hidroxyl radical scavenging agents by the iron chelating agent desferroxamine *Biochem J* 210:107-113; 1983.
75. Koop DR, Nordblom GD, y Coon MJ. Immunochemical evidence for a role of cytochrome P-450 in liver microsomal ethanol oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 235: 228-238; 1984.
76. Albano E, Tomasi A, Gorla-Gatti L, Poli G, Vannini V y Diazani MU. Free radical metabolism of alcohols by rat liver

microsomes. Free Rad Res Commun. 3: 243-249; 1987.

77. Albano E, Tomasi A, Person JO, Terelius Y, Gorla-Gatti L, Ingelman-Sundberg M y Dianziani MU. Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450 II E 1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. Biochem Pharmacol 41:1895-1902; 1991.

78. Reinke LA, Kotake Y, McCay PB y Janzen EG, Spin-trapping studies of hepatic free radicals formed following the acute administration of ethanol to rats: In vivo detection of hydroxyethyl radicals with PBN. Free Rad Biol Med 11: 31-39; 1991.

79. Knecht KT, Bradford BU, Mason RP y Thurman RG. In vivo formation of a free radical metabolite of ethanol. Molec Pharmacol 38:26-30; 1990.

80. Slater TF, Free radical mechanisms in tissue injury with special reference in the cytotoxic effects of the ethanol and related alcohols. In Normann R, Ribière C y Rouach H (eds). Alcohol Toxicity and Free Radical Mechanisms. Advances in the Biosciences: Vol 71, Oxford Pergamon Press p 1-9; 1988.

81. Ahmad FF, Cowan DL y Sun AY. Vitamin C mediates the formation of ethoxy radicals wich damage biological membranes. In Kuriyama K Takada A e Ishii H (eds). Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism. Amsterdam Excerpta Medica. p 681-684; 1988.

82. Reinke LA, Lai EK y McCay PB. Administration of ethanol or acetaldehyde to rats results in the generation of free radicals in liver , heart and other organs. In Kuriyama K, Takada A e

Ishii H (eds). Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism. Amsterdam, New York, Oxford Elsevier Science Publishers p 633-670; 1988.

83. Puntarulo S y Cederbaum AI. Chemiluminescence from acetaldehyde oxidation by xantine oxidase involves generation of and interactions with hidroxy radicals. Alcohol Clin Exp Res 13: 84-90; 1989.

84. Santiard D, Sabourault D, Ribièrè C, Nordmann R, Houee-Levin C y Ferradini C. Production du radical acétyle: Etude radioalytique comparée des radicaux libres issus de l'acétaldehyde et de l'éthyléglycol. J Clin Phys 88:967-976; 1991.

85. Reinke LA, Laick, DuBose CM y McCay PB. Reactive free radical generation in vivo in heart and liver of ethanol-fed rats. correlation with radical formation in vitro. Proc Natl Acad Sci (USA) 84: 9223-9227; 1987.

86. Puntarulo SP y Cederbaum AI. Increase NADPH-dependent chemiluminescence by microsomes after chronic ethanol consumption. Arch Biochem Biophys 266: 435-445; 1988.

87. Reitz RC. A possible mechanism for the peroxidation of lipids due to chronic ethanol ingestion. Biochim Biophys Acta 380:145-154; 1975.

88. Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Penttilä KE, Glaumann H, Lindros KO. Centrilobular expression of ethanol inducible cytochrome P-450 (II E 1) in liver. Biochem Biophys Res Commun 157: 55-60; 1988.

89. Tsutsumi M, Lasker JM, Schimizu M, Rosman AS y Lieber CS. The intralobular distribution of ethanol-inducible P-450 II E 1 in rat and human liver. *Hepatology* 10: 437-446; 1989.
90. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15; 1984.
91. Dicker E y Cederbaum AI. Increased oxygen radical dependent inactivation of metabolic enzymes by liver microsomes after ethanol consumption. *FASEB J* 2: 2901-2906; 1988.
92. Forman HJ y Boveris A. Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In Pryor WA, (ed). *Free Radicals in Biology*. New York, Academic Press. p 65-69; 1982.
93. Slater TF, Sawyer BC y Sträuli UD. Changes in liver nucleotide concentrations in experimental liver injury by acute ethanol poisoning. *Biochem J* 93: 267-270; 1964.
94. Rouach H, Park MK, Orfanelli MT, Janvier B, Brissot P, Bourel M y Nordmann R. Effects of ethanol on hepatic and cerebellar lipid peroxidation and endogenous antioxidants in naive and chronic iron overloaded rats. In Nordmann R, Ribière C, Rouach H (eds). *Alcohol Toxicity and Free Radical Mechanisms*. *Advances in Biosciences* Vol. 71 Oxford Pergamon Press. p 49-59; 1988.
95. Kiessling KH y Tobe U. Degeneration of liver mitochondria in rats after prolonged alcohol consumption. *Exp Cell Res*. 33:350-354; 1964.
96. Rouach H, Clement M, Orfanelli MT, Janvier B, Nordmann J y Nordmann R. Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation

and withdrawal. *Biochem Biophys Acta*. 753:439-444;1983.

97. Ribière C, Saffar C, Sabouralt D y Nordmann R, Cerebral and hepatic mitochondrial functions after chronic ethanol treatment. *Alcohol and Alcoholism* 23:A71; 1988.

98. Koch OR, Boveris A, Sirotsky de Favelukes S, Schwarcz de Tarlowsky M y Stoppani HOM. Biochemical lesions of liver mitochondria from rats after chronic alcohol consumption. *Exp Molec Pathol* 27: 213-220; 1977.

99. Cunningham CC, Colemann WB y Spach PI. The effects of the chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial energy metabolism. *Alcohol and Alcoholism* 25: 127-136; 1990.

100. Handler JA y Thurman RG. Catalase-dependent ethanol oxidation in perfused rat liver. Requirement for fatty-acid stimulated H_2O_2 production by peroxisomes. *Eur J Biochem*. 176: 477-484; 1988.

101. Thurman RG y Handler JA. New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. *Drug Metab Rev* 20: 679-688; 1989.

102. Panchenko LF, Pirozhkov SV, Popova SV y Antonenkov VD. Effect of chronic ethanol treatment on peroxisomal acyl-Co A oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart. *Experientia* 43: 580-581; 1987.

103. M ller A y Sices H. Ethane release during metabolism of aldehydes and monoamines in perfused rat liver. *Eur J Biochem*. 134: 599-602; 1983.

104. Videla LA y Villena MI. Effect of ethanol acetaldehyde and acetate on the antioxidant-sensitive respiration in the perfused rat liver. Influence of fasting and diethylmaleate treatment.

Alcohol. 3:163-167; 1986.

105. Videla LA, Fernandez V y de Marinis A. Liver lipoperoxidative pressure and glutathione status following acetaldehyde and aliphatic alcohols pretreatment of rats. Biochem Biophys Res Commun 104: 965-970; 1982.

106. Cederbaum AI y Berl L. Pyrazole and 4 methylpyrazole inhibit oxidation of ethanol and dimethylsulfoxide by hydroxyl radicals generated from ascorbate, xanthine oxidase and rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys. 216: 530-543; 1982.

107. Oei HHH, Strov WE, Burton KP y Schoffer SW. A possible role of xanthine oxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 38: 453-461; 1982.

108. Sultatos LG. Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase oxidase system in the rat. J Pharmacol Exp Ther 246: 946-949; 1988.

109. Chen L, Davis GJ y Lumeng L. Zonal distribution of xanthine oxidase in the rat liver. Clin Res 37: 537A; 1989.

110. Cederbaum AI y Rubin E. Protective effect of cysteine on the inhibition of mitochondrial functions by acetaldehyde. Biochem Pharmacol 25: 963-973; 1976.

111. Kato S, Kawase T, Alderman J, Snatoni N y Lieber CS. Role of xanthine oxidase in ethanol induced lipid peroxidation. Gastroenterology 98: 203-210; 1990.

112. Abboudanza A, Battelli MG, Soffritti M y Cessi C. Xanthine-oxidase status in ethanol-intoxicated rat liver. Alcohol Clin Exp Res 13: 841-844; 1989.

113. Ericksson CJP. Ethanol and acetaldehyde metabolism in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem Pharmacol* 22: 2283-2292; 1973.
114. Fridovich I. The mechanism of the enzymatic oxidation of aldehydes. *J Biol Chem*. 241:3126-3128; 1966.
115. Purg JG y Fox IH. Ethanol-induced activation of adenine nucleotide turnover. Evidence for a role of acetate. *J Clin Invest*. 74: 936-941; 1984.
116. Faller J y Fox IH, Ethanol-induced hyperuricemia. Evidence for increased urate production by activation for adenine nucleotide turnover. *N Engl J Med*. 307: 1598-1602; 1982.
117. Kera Y. Ohbora Y y Kumura S. The metabolism of acetaldehyde and not acetaldehyde itself is responsible for in vivo ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Biochem Pharmacol* 37: 3633-3638; 1988.
118. Rajagopalan KV y Handler P. Hepatic aldehyde oxidase III. The substrates binding site. *J Biol Chem* 239: 2027-2035; 1964.
119. Shaw S y Jayatilike E. The role of aldehyde oxidase in ethanol induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochem J* 268: 579-583; 1990.
120. Aust SD, Morehouse LA y Thomas CE. Role of metals in oxygen radicals reactions. *J Free Rad Biol Med* 1: 3-25; 1985.
121. Minotti G. Tert-butyl hydroperoxide-dependent microsomal release of iron and lipid peroxidation. Evidence for the reductive release of nonheme nonferritin iron. *Arch Biochem Biophys* 273: 137-143; 1989.
122. Sippel HW. Effect of an acute dose of ethanol on lipid

peroxidation and on the activity of microsomal glutathione transferase in rat liver. *Acta Pharmacol Toxicol* 53: 135-140; 1983.

123. Tophan R, Cogger M, Pearce K y Schultz P. The mobilization of ferritin by liver cytosol: A comparison of xanthine and NADH as reducing substrates. *Biochem J* 261: 137-143; 1989.

124. Low H, Sun IL, Novas P, Crebing C, Crone FL y Morre DJ. Transplasmalemma electron transport for cells is part of a diferic transferrin reductase system. *Biochem Biphys Res Commun* 139: 1117-1123; 1986.

125. Houzé P, Rouach H, Gentil M, Orfanelli MT y Nordmann R. Effect of allopurinol on the hepatic and cerebellar iron, selenium, zinc and copper status following acute ethanol administration to rats. *Free Rad Res Commun* 12-13: 663-668; 1991.

126. Nordmann R, Rouach H y Houzé P, Alcool fer et stress oxidatif *Bull Acad Natl Med* 174: 95-104; 1990.

127. Kawase T, Kato S y Lieber CS, Lipid peroxidation and antioxidant defence systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10: 815-821; 1989.

128. Tappel AL. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamin Hormones* 20: 493-510; 1962.

129. Freeman BA y Crapo JD. Free radicals in tissue injury. *Lab Invest* 47:412-424;1982.

130. Halliwell B. Oxidative damage lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem Phys Lipids* 44:327-331;1987.

131. Sevanian A y Davis KJ, Hochstein P. Conservation of vitamin

- C by uric acid in blood. *J Free Rad Biol Med* 1:117-121; 1985.
132. Davis KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF y Hochstein P. Uric acid complexes. *Biochem J* 235:747-752; 1986.
133. Lam KW, Fong D, Lee A y Liu KMD. Inhibition of ascorbate oxidation by urea. *J Inorg Biochem* 22: 241-247; 1984.
134. Stocker R y Ames BN. Potential role of conjugated bilirubin and cooper in the metabolism of lipid hydroperoxides in bile. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 84: 8130-8139; 1987.
135. Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS y Weissmann G. Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals. *Ann NY Acad Sci* 389: 368-70; 1982.
136. Khon R, Yamamoto Y, Cindy KC y Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85:3175-3180; 1988.
137. Privalle CT, y Fridovich I. Induction of SOD in *E coli* by heat shock. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 84:2723-2727; 1987.
138. Fridovich I: Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23: 239-257; 1983.
139. Marklimd SL, Holme E, y Hellner L. SOD in extracellular fluids. *Clin Chem Acta* 126: 41-51; 1982.
140. Smith CV y Mitchell JR. Acetaminophen hepatotoxicity in vivo is not accompanied by oxidant stress. *Biochem Biophys Res Comm* 133:329-336; 1985.
141. Akerboom TPM y Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymol.* William B. Jakoby (eds). Academic Press Inc, New York. Vol. 77:373-382; 1981.

142. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU y Locke S. Quantitative measurement of the total peroxil radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. FEBS Lett 187: 33-38; 1985.
143. Frei B, Stocker R y Ames BN Antioxidant defence and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci (USA) 85: 9748-9755;1988.
144. Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y, Tamai M y Mino M. Free radical chain oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by vitamin. E J Nutr Sci Vitaminol 32: 475-481;1986.
145. Niki E, Yamamoto Y, Takahashi M, Yamamoto K, Komuro E, Miki M, Yasuda H y Mino F. Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. J Nutr Sci Vitaminol. 34:507-512; 1988.
146. Adelson R, Saul RL y Ames BN. Oxidative damage to DNA. relation to species metabolic rate and life span . Proc Natl Acad Sci (USA) 85: 2706-2710;1988.
147. Vane JF y Botting R. Inflammation and the mechanism of action of antinflammatory drugs. FASEB J 1:89-96; 1987.
148. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine 2nd Edition. Clarendon Press. Oxford 1989.
149. Oski FA. Vitamin E. A radical defence. New Engl J Med 303: 454-455; 1980.
150. Díaz Belmont A y Escotto Velázquez J. Uso de los antiinflamatorios no esteroides. Simposio sobre hepatitis alcohólica. Gaceta Médica de México. 123:142-145; 1987.

151. Kaplan HB, Edelson HS, Korchak HM, Given WP, Abramson S y Weissman G. Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on human neutrophil functions in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 33:371-378;1984.
152. Bizi A, Tacconi MT, Veneroni E y Garanttni S. Triglyceride accumulation in liver. *Nature* 209:1025-1026; 1966.
153. DiLuzio NR. Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants. *Physiologist* 6:169-173; 1963.
154. DiLuzio NR y Hartman AD. Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ethanol-induced fatty liver. *Fed Proc* 26:1436-1442; 1967.
155. Gottfried SP y Rosenberg B, Improved manual spectrophotometric procedure. for determination of serum triglycerides *Clin Chem* 19:1077-1078; 1973
156. Butler JM Jr, Maling HM, Horning MG y Brodie BB. The direct determination of liver triglycerides. *J. Lipid Rev.* 2:95-6;1961.
157. Ottolenghi A: Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch Biochem Biophys.* 79:355-363;1959.
158. Keyser JW y Vaughn J. Turbidities in the estimation of serum proteins by the biuret method. *Biochem J.* (Proceedings of the Biochemical Society) 44:XXII;1949.
159. Bradford MM: A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254;1976.
160. Bernt E y Gutmann I: Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD⁺ in Bergmeyer HM(ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 3 ed 2 New York Verlag Chemie, Academic Press pag.

1499;1974.

161. Akerboom T PM y Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth Enzymol* vol. 77: 373-382;1981.

162. Micheli L, Georgi G, Fiaschi Al y Cerratani D. Relationship between piroxicam content and glutathione levels in rat brain. *Pharmacol Res.* 22:31-34; (1990).

163. Goodman De Witt S y Deykin D. Fatty acid ethyl ester formation during ethanol metabolism in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med* 113:65-67;1963.

164. Lange Louis G. Nonoxidative ethanol metabolism: formation of fatty acid ethyl esters by cholesterol esterase. *Proc Natl Acad Sci* 79:3954-3957; 1982.

165. Hashimoto S, Recknagel RO. No chemical evidence of hepatic lipid peroxidation in acute ethanol toxicity. *Exp Molec Pathol.* 8:225-242; 1968.

166. Torrielli MV, Gabriel L y Danzani MV. Ethanol-induced hepatotoxicity; experimental observations on the role of lipid peroxidation. *J. Pathol* 126:11-25; 1978.

167. Dicker E y Cederbaum AI. Generation of reactive oxygen species and reduction of ferric chelates by microsomes in the presence of reconstituted system containing ethanol, NAD⁺ and alcohol dehydrogenase. *Alcoholism: Clin Exp Res* 14:238-244; 1990.

168. Valenzuela A, Lagos C, Schmidt K y Videla LA. Sylmarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem Pharmacol* 34:2209-2212; 1985.

169. Wiseman EH. Review of preclinical studies with piroxicam: pharmacology, pharmacokinetics and toxicology. Roy Soc Med Int Cong Symp Ser 1:11-23; 1978.