

25  
Res



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**PAPEL DEL PIROXICAM EN RATAS  
INTOXICADAS EN FORMA AGUDA  
CON ETANOL**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**MARIA GABRIELA CABRERA VALLADARES**



MEXICO, D. F.



1995

**FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Cabrera Valladares María Gabriela

con número de cuenta 8623471-3 con el Título: "Papel del piroxicam en ratas intoxicadas en forma aguda con etanol"

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Bióloga

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	(FIRMA)
Dr.	Enrique Piña Garza		<i>[Firma]</i>
Director de Tesis	M. en C. Sergio Corona García		<i>[Firma]</i>
M. en C.	Martha Zentella Mayer		<i>[Firma]</i>
Biol.	Francisco Gutiérrez Zepeda		<i>[Firma]</i>
Suplente	Dra. Ma. Luisa Fanjúl de Moles		<i>[Firma]</i>
Suplente			

---

Ciudad Univesitaria

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 5 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, apoyado por el donativo IN-208992 de DGAPA.

Enero de 1995.

---

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

A mi tutor el Dr. Enrique Piña Garza por su paciencia, su ayuda y su sonrisa.

A mis asesores: Dra. Martha Zentella y Sergio Corona por su ayuda y apoyo incondicional.

A mis compañeros de Laboratorio y amigos que colaboraron para la realización de este trabajo.

---

<<Creo en Dios, en Einstein y en Mozart, así como en sus discípulos y apóstoles; creo en el Espíritu Santo y en la verdad de la ciencia una e indivisible; creo que dicha ciencia procede de Dios y vive en los corazones de todos los hombres iluminados desde Allá Arriba; creo que quien ha gustado una vez de los sublimes goces de esa ciencia le será siempre adicto y no renegará de él; creo que los fieles discípulos de esa ciencia serán glorificados en una esencia celestial, radiante de fulgor de todos los soles, en medio de los perfumes y los acordes más perfectos, y se reunirán para la eternidad en la fuente de toda armonía...>>

Wagner.

---

## Tabla de contenido

<b>Tabla de contenido.....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>9</b>
<b>Etanol .....</b>	<b>9</b>
<i>Metabolismo del etanol.....</i>	<i>11</i>
<i>Deshidrogenasa Alcohólica (DHA).....</i>	<i>12</i>
<i>Sistema Microsomal de oxidación del etanol (SMOE).....</i>	<i>13</i>
<i>Catalasa.....</i>	<i>14</i>
<i>Deshidrogenasa aldehídica (DHA1).....</i>	<i>15</i>
<b>Efectos metabólicos ocasionados por la oxidación del etanol .....</b>	<b>16</b>
<i>Relación NADH/NAD+.....</i>	<i>16</i>
<i>Acetaldehído .....</i>	<i>17</i>
<i>Efectos del etanol en el metabolismo intermediario .....</i>	<i>18</i>
<i>Otros efectos del etanol .....</i>	<i>20</i>
<b>Radicales libres .....</b>	<b>20</b>
<i>Radicales libres y etanol.....</i>	<i>22</i>
<i>Especies relacionadas con el oxígeno.....</i>	<i>23</i>
<i>Radical hidroxietil .....</i>	<i>24</i>
<b>Glutación.....</b>	<b>28</b>

---

Piroxicam .....	36
<b>Hipótesis.....</b>	<b>38</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>40</b>
<b>Método .....</b>	<b>41</b>
Recolección de las muestras .....	42
Cuantificación de glutatión .....	43
<b>Resultados.....</b>	<b>44</b>
Glutatión.....	44
Glutatión en eritrocitos y plasma.....	46
Hemoglobina .....	48
Glucosa .....	48
Transaminasa glutámico oxalacética .....	49
Transaminasa glutámico pirúvica .....	50
<b>Discusión .....</b>	<b>60</b>
Glutatión en sangre total .....	60
Glutatión en eritrocito y plasma .....	62
Efecto del piroxicam .....	64
Hemoglobina .....	66
Glucosa .....	69
Enzimas Glutámico oxalacética y Glutámico pirúvica .....	71
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>74</b>

---

---

## Resumen

Aún no se conocen con certeza, los mecanismos a nivel molecular, de las alteraciones provocadas por el etanol, sin embargo es ya aceptado que los radicales libres que son generados durante su oxidación en el hígado, pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis del daño a tejidos. En este trabajo se analizan los cambios cuantitativos de una defensa antioxidante como lo es el glutatión y algunos indicadores de daño a nivel sanguíneo como son la oxihemoglobina, la glucosa y las transaminasas séricas: glutámico oxalacética y glutámico pirúvica. Ratas macho Wistar entre 180 y 200 g alimentadas *ad libitum* fueron tratadas con una dosis isocalórica de glucosa o etanol 5g/kg de peso corporal v.o.g. con y sin piroxicam (antiinflamatorio no esteroideo) v. i. p. en una dosis de 10 mg/kg. Las muestras de sangre se obtuvieron a las 4, 8, 12 y 16 horas posteriores a la administración de los tratamientos. El antiinflamatorio administrado de manera simultánea con el etanol revierte los cambios provocados por el etanol *per se* en las concentraciones de oxihemoglobina y glutatión. La hiperglucemia generada por el etanol y el aumento en la actividad de las transaminasas séricas no son corregidas por el piroxicam. Se concluye que el antiinflamatorio ensayado atenúa la disminución de glutatión sanguíneo y de oxihemoglobina causada por el etanol.

---

## Introducción

Son varias las alteraciones que provocan daño celular por el alcoholismo. La secuencia en el daño aún no se conoce con precisión, sin embargo todos estos sucesos tienen en común su relación con la situación conocida como estrés oxidativo (Sies, 1985), en la cual, las defensas celulares antioxidantes son rebasadas por un agente oxidante potente, como lo es el etanol.

Dentro de las alteraciones que suceden a nivel celular por el etanol y que se identifican con la situación de estrés oxidativo, se encuentran: el aumento en la formación de triacilglicéridos hepáticos; aumento en la lipoperoxidación membranal (Di Iuzio 1966; Nordmann y cols. 1992) y la disminución del glutatión (GSH) hepático (McDonald y cols. 1977; Fernández y Videla 1981; Zentella y cols. 1994).

Los daños ocasionados por una ingesta crónica de etanol han sido ampliamente estudiados (Boveris y cols. 1983; Preedy y cols. 1988; Wilson y cols. 1986; Kretzschmar y cols. 1992), sin embargo existen menos estudios de las alteraciones provocadas por el etanol en modelos agudos. El estudio en modelos agudos podría ayudar a esclarecer el momento y las causas que ocasiona el daño en una intoxicación alcohólica crónica.

---

## **Antecedentes**

### ***Etanol***

El etanol es un alcohol derivado del etilo unido a un grupo hidroxilo. Es clasificado como un alcohol primario porque el grupo hidroxilo esta unido solamente a un átomo de carbono (Fig. 1).



Fig. 1 Fórmula del etanol

El etanol es una molécula pequeña, miscible con el agua y los lípidos, y posee una distribución desigual de sus cargas lo que la hace ser polar. Todo esto permite al etanol moverse con gran facilidad a través de las membranas celulares, de tal manera que su concentración se equilibra rápidamente entre la sangre y los tejidos.

El alcohol etílico (etanol) se conoce y ha sido utilizado desde la antigüedad, por tratarse del producto de la fermentación de los carbohidratos presentes en los vegetales. Se utiliza ampliamente como disolvente industrial y es el principal alcohol de las bebidas alcohólicas.

El etanol es la sustancia adictiva más común para el hombre y esta aceptada legalmente como una droga psicotrópica por la mayoría de los gobiernos y de las religiones en todo el mundo (Denney 1984).

No es fácil medir el impacto actual del alcoholismo en nuestro país, sin embargo, existen algunos indicadores que permiten suponer que el problema se ha incrementado en los últimos años.

De acuerdo con datos de la Secretaría de Salud (1992):

- Durante la última década la cirrosis hepática alcohólica ha ocupado un lugar preponderante entre las diez primeras causas de muerte.
- La tasa de mortalidad en el alcohólico es de 2.5 veces la tasa normal.
- La participación de las defunciones por alcoholismo en las causas de defunción total nacional, es alta (Cuadro I).

Causa de defunción total nacional	Absoluto	Participación porcentual	Tasa específica*
Alcoholismo	2566	0.61	3.14
Psicosis alcohólica	71	0.02	0.09
Congestión alcohólica	1755	0.42	2.15
Gastritis alcohólica	61	0.01	0.07
Cirrosis hepática alcohólica	9578	2.27	11.72

\*Tasa por cada 100 000 habitantes.

Cuadro I. Tasa de mortalidad y participación relativa de las defunciones por alcoholismo y afecciones relacionadas con el alcohol en México, 1990. (Fuente INEGI, DGE, Dirección de Estadísticas Demográficas y Sociales en "Diagnóstico general, Problemas sociales", Programa contra el alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas, 1992-1994, México: CONADIC, SSA, 1993).

Los problemas médicos, sociales, legales y laborales que estos datos manifiestan, hacen del alcoholismo uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país.

### **Metabolismo del etanol**

El principal órgano involucrado en el metabolismo del alcohol etílico es el hígado, en él se lleva a cabo entre un 80 a un 90% de su oxidación (Rubin y Lieber 1981). El hepatocito posee tres sistemas enzimáticos para metabolizar el etanol: **la deshidrogenasa alcohólica (DHA)**, localizada en el citosol; **el sistema microsomal oxidante del etanol (SMOE)**, ligado al retículo endoplásmico liso y **la catalasa**, ubicada en los peroxisomas (Fig.2). Estos tres sistemas catalizan la conversión del etanol a acetaldehído, el cual a su vez, es el sustrato de la deshidrogenasa aldehídica, que genera el ácido acético. En el hígado existe actividad de la deshidrogenasa aldehídica tanto en el citosol como en las mitocondrias. El ácido acético se transforma finalmente en acetil CoA que se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, alimentador de los equivalentes reductores para la cadena respiratoria, y a su vez el principal sistema celular productor de ATP cuya energía de hidrólisis se considera de "alta energía".



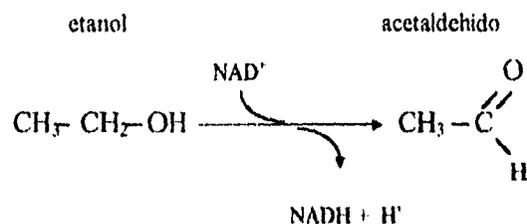


Fig.3. Reacción catalizada por la deshidrogenasa alcohólica.

La deshidrogenasa alcohólica contiene zinc y un grupo tiol (-SH), perteneciente al aminoácido cisteína que participa en la reacción. La enzima es relativamente inespecífica, ya que metaboliza también otros alcoholes y cataliza la dismutación de aldehídos (3-β-hidroxiesteroides). Su  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) es de 0.2 a 2 mM. La DHA se considera la enzima más importante en el metabolismo del etanol y puede ser inhibida *in vitro* por Pirazol (Theorell y Yonetani 1963).

### Sistema Microsomal de oxidación del etanol (SMOE)

La reacción del sistema microsomal oxidante del etanol, difiere de la catalizada por la DHA, puesto que requiere de oxígeno y NADPH. En esta reacción se genera la forma oxidada de la coenzima (NADP) y agua (Fig.4).

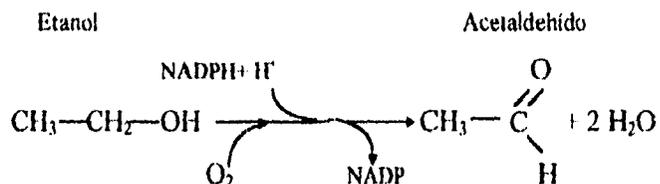


Fig.4. Reacción catalizada por el sistema microsomal de oxidación del etanol

El sistema microsomal de oxidación del etanol está relacionado funcionalmente con el citocromo P<sub>450</sub> y con la enzima NADPH-citocromo C-reductasa, ambos participan en el metabolismo y en la eliminación de fármacos y sustratos endógenos.

La Km del SMOE es de 8-10mM, o sea mucho mayor que la de la DHA, por lo tanto el sistema microsomal oxidante del etanol es más eficiente a altas concentraciones de etanol (Abdulla y Badawy 1978), cuando la ADH ha sido saturada, como en el alcoholismo crónico.

### Catalasa

Esta enzima cataliza la reacción que convierte el etanol a acetaldehído para lo cual requiere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig.5).

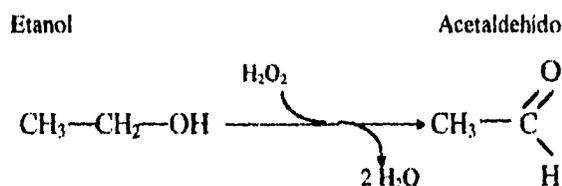
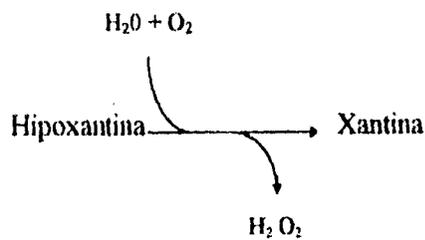


Fig. 5. Reacción catalizada por la catalasa

Al parecer la catalasa no contribuye en una forma cuantitativamente importante en la oxidación del etanol en el hígado (Abdulla y Badawy 1978; Rubin y Lieber 1981). Su principal limitante es la velocidad de generación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que

requiere normalmente la participación de reacciones bioquímicas acopladas como las que catalizan la xantina oxidasa (Fig. 6a) y la NADPH-oxidasa (Fig.6b).

a) Xantina



b) NADPH oxidasa

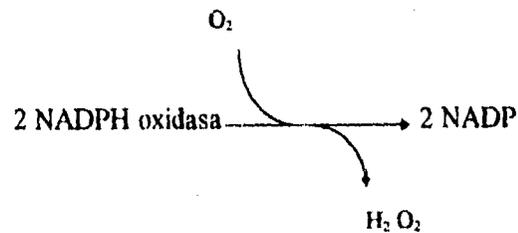


Fig.6. Reacciones productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a) Xantina oxidasa, b) NADPH oxidasa.

### **Deshidrogenasa aldehídica (DHAL)**

La deshidrogenasa aldehídica, transforma el acetaldehído que se genera en cualesquiera de las reacciones enzimáticas previamente descritas, en ácido acético. La DHAL es una deshidrogenasa que genera NADH. Su actividad es inespecífica, puesto que también oxida otros aldehídos aromáticos y alifáticos (Fig.7).

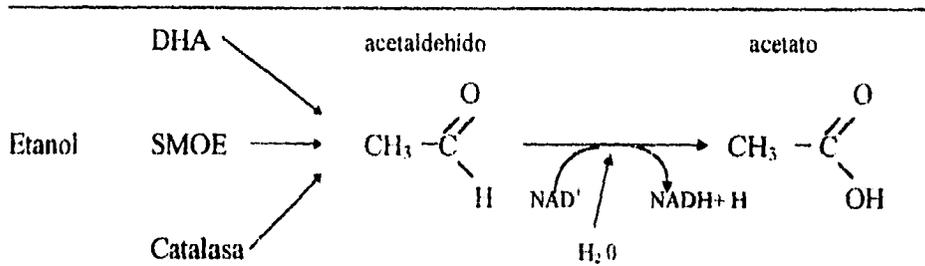


Fig. 7. Reacción catalizada por la deshidrogenasa aldehídica

### ***Efectos metabólicos ocasionados por la oxidación del etanol***

Como consecuencia del metabolismo del etanol, en el hepatocito se acumulan diversos productos que deben eliminarse debido a que alteran las funciones normales de la célula. Entre éstos se encuentra el NADH, el acetaldehído, el ácido acético, los radicales libres y el NADP.

### **Relación NADH/NAD<sup>+</sup>**

La acumulación de NADH ocasiona un incremento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> en el citosol del hepatocito, lo cual a su vez influye en todas las óxido-reductasas dependientes de NAD<sup>+</sup> situadas en el mismo compartimento celular: se eleva la poza de los sustratos potencialmente oxidables (es decir, sustratos reducidos) de dichas enzimas y disminuye la poza de los correspondientes sustratos oxidados.

---

### Incremento de la formación de NADP<sup>+</sup>

Recientemente se ha reportado que en hepatocitos aislados de rata, tratados con etanol, en forma aguda, se provoca un aumento de NADP<sup>+</sup> y una disminución de NAD<sup>+</sup> a los 2 min de incubación (Akinshola y cols. 1991). Sin embargo no se observan cambios en NADH y NADPH. Estas observaciones muestran que el etanol incrementa la síntesis de NADP<sup>+</sup> estimulando posiblemente con esto, la vía de las pentosas. El etanol también disminuye los niveles de ATP y aumenta los niveles de AMP.

### Acetaldehído

El acetaldehído, metabolito activo del etanol, es una molécula altamente reactiva, dada la naturaleza electrofílica del carbono carbonilo (el doble enlace del grupo carbono-oxígeno) (Fig.8). El enlace es polar dada la gran electronegatividad del átomo de oxígeno.

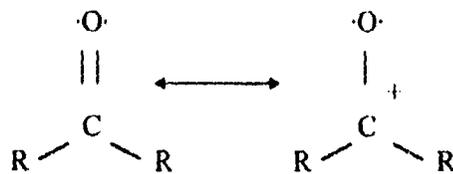


Fig.8. Inestabilidad del enlace del carbono carbonilo

---

El acetaldehído induce cambios mitocondriales que incluyen daño estructural,

---

fragilidad y alteraciones en la integridad de la membrana interna (Cederbaum y Rubin 1975). *In vitro* se ha demostrado que tiene varios efectos sobre el metabolismo mitocondrial, inhibe el sitio I de la fosforilación oxidativa (sitio acoplado a la cadena respiratoria en la etapa inicial dependiente de NAD) y por tanto, disminuye el consumo de oxígeno (Cederbaum y Rubin 1975; Lehninger 1975; Israel y cols. 1979). El acetaldehído establece uniones hemiacetal con la cisteína y el glutatión reducido, por lo que disminuye la cantidad de glutatión disponible para la detoxificación de radicales libres (Shaw, 1981, Lieber 1991a), se une covalentemente a las proteínas de hígado (Nomura y Lieber 1987), al citocromo P450 (Behrens y cols. 1988), a proteínas circulantes como la albúmina (Donohue y cols. 1983) y la hemoglobina (Stevens y cols. 1981).

Los efectos metabólicos del acetato son menos claros. Lo que se conoce con certeza es que inhibe la lipólisis y en consecuencia, disminuye la cantidad de ácidos grasos libres circulantes (Rubin y Lieber 1981).

### **Efectos del etanol en el metabolismo intermediario**

A medida que se oxida el etanol disminuye el NAD<sup>+</sup> y aumenta el NADH, lo que no solo bloquea la oxidación del etanol sino que afecta a todo el metabolismo. Las diferentes deshidrogenasas ubicadas en el citosol del hepatocito comparten las pozas de NAD<sup>+</sup> y NADH y por la ley de acción de masas la escasez del NAD y el exceso de NADH se refleja en la mayor producción de metabolitos reducidos, en comparación con los oxidados, ambos sustratos de las deshidrogenasas en cuestión. Por ejemplo, en el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el aumento en

---

la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  promueve la síntesis de del gliceraldehído3-fosfato a partir del 1,3 difosfoglicerato, lo que trae como consecuencia la inhibición de la glucólisis hepática en un estado de ayuno.

La deshidrogenasa láctica es otra enzima para la cual se afecta el equilibrio de sus sustratos por la oxidación del etanol. La elevación de la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  tiende a la formación de más lactato y menos piruvato. El lactato difunde fuera del hepatocito y propicia un estado de acidosis. Además el exceso de lactato tiene otras consecuencias si la ingesta de etanol fue en un estado de ayuno y por lo tanto el hígado no tiene reservas de glucógeno. En este caso lo que resulta es un estado de hipoglucemia que persiste al estar inhibida la gluconeogénesis hepática: el predominio en la formación de lactato abate la poza celular del piruvato y el oxalacetato, lo que determina una menor síntesis de fosfoenolpiruvato, todo lo cual es limitante para la formación de glucosa.

La mayor relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  hace que se forme más glicerofosfato que hidroxiacetona fosfato, los sustratos de la deshidrogenasa del glicerofosfato. Con ello el metabolismo se desplaza hacia la síntesis de triacilglicéridos hepáticos. La acetaldehído deshidrogenasa requiere  $\text{NAD}^+$  para producir acetato.

Una ingesta aguda de etanol afecta el metabolismo de los lípidos. Ocasiona un aumento en la liberación de lípidos del tejido adiposo, semejante a la que se observa en situaciones de estrés, mediada por epinefrina. El exceso de ácidos grasos liberados por el tejido adiposo contribuye a elevar los niveles séricos de triacilglicéridos, hasta 36 horas después de haber ingerido el etanol (Zentella y cols. 1991).

---

La administración aguda de etanol ocasiona una disminución de la síntesis proteica, mientras que la ingestión crónica condiciona a un aumento en la síntesis de algunas proteínas. Uno de los efectos más importantes del etanol en este sentido es la estimulación de fibogénesis hepática. La hiperlactacidemia que se asocia con la ingestión del etanol se debe al estímulo de la enzima peptidilprolilhidoxilasa y a la inhibición de la prolina oxidasa, cuya consecuencia es el aumento en la biosíntesis de colágena (Kershenobich y cols. 1979).

### **Otros efectos del etanol**

El etanol promueve otros efectos por una vía no oxidativa: la formación de esterios etílicos de ácidos grasos por tres enzimas diferentes: Sintetasa I (un tipo de glutatión transferasa), Sintetasa II (muy similar a la colesterol esterasa) y Sintetasa III o Sintetasa mayor (otro tipo de glutatión transferasa) (Lange 1991). Así mismo, los sistemas de transducción de señales en el plasma membranal son afectados por el etanol. En el hígado, los procesos asociados con fosfolipasas C y D responden particulamente al etanol (Hoeck y cols. 1992).

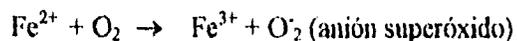
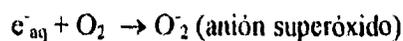
### **Radicales libres**

Aún no se conocen con certeza todos los mecanismos moleculares de las alteraciones tisulares provocadas por un abuso en la ingestión del alcohol, sin embargo, en fechas recientes se ha puesto especial interés en la asociación de estas alteraciones con los mecanismos de daño oxidativo, consecuencia de un aumento en la poza tisular de los radicales libres (Lieber y cols. 1989).

---

Los radicales libres son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital externo, lo que los vuelve especies extremadamente reactivas (inestables) (Halliwell y cols. 1989). Éstos, tenderán a establecer tal desequilibrio sustrayendo o adicionando electrones a otras moléculas, los cuales a su vez se convertirán en radicales libres.

Ejemplo:



Todos los sistemas biológicos están expuestos a los radicales libres que son formados endógenamente durante los procesos metabólicos de la célula: durante la cascada de la cadena respiratoria entre la ubiquinona y el citocromo c, por la reducción incompleta de las moléculas y por la transformación de los xenobióticos, o como resultado de alguna influencia externa como por ejemplo la radiación ionizante.

Las especies altamente reactivas, implicadas hasta la fecha en el daño celular, son principalmente los radicales libres provenientes del oxígeno, las cuales son continuamente generadas de manera intracelular por reacciones de oxidación y reducción (Southorn 1988). Las especies más comunes son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y sin ser radical libre, pero sí generador de ellos, el peróxido de hidrógeno, ( $H_2O_2$ ).

Los radicales hidroxilo son considerablemente más reactivos y por tanto más tóxicos que el peróxido de hidrógeno o que el superóxido (Comporti y Benedetti 1985).

---

Los radicales libres pueden interaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, alterando la estructura y la función de estos componentes celulares. Los radicales libres reaccionan con los lípidos insaturados de los fosfolípidos estructurales de las membranas celulares y de los organelos, mediante una reacción conocida como lipoperoxidación.

La lipoperoxidación altera las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular y puesto que estas propiedades pueden determinar directamente los indicadores funcionales básicos de las membranas como permeabilidad para iones monovalentes, puede deducirse que es indispensable analizar las posibles consecuencias funcionales de los cambios inducidos por los radicales libres. Una manera indirecta entre otras de medir lipoperoxidación en una célula es por la formación de malondialdehído (Recknagel y Ghoshal 1966).

### **Radicales libres y etanol**

Una importancia creciente se le ha atribuido al daño ocasionado por radicales libres en lesiones hepáticas inducidas por la ingesta aguda o crónica de etanol.

El primer acercamiento a este problema fueron los experimentos de Di Luzio y Costales (1964), que mostraron una acción protectora de antioxidantes, sobre el hígado graso generado por un tratamiento agudo con etanol en ratas. Se había demostrado ya que la lipoperoxidación aumentaba en el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (Comporti y col. 1965, Recknagel y Ghoshal 1966); Comporti y colaboradores (1967) estudiaron la aparición de este indicador en ratas tratadas con etanol, encontrando también un aumento en la producción de malondialdehído.

---

Ahora es claro que se producen varios tipos de radicales libres derivados del oxígeno, o generadores de éstos durante una intoxicación etílica. Entre estas especies se encuentra el anión superóxido  $O_2^-$ , que es producido por el citocromo  $P_{450}$  y su formación se ve notablemente aumentada después de un tratamiento crónico con etanol en ratas (Ekstrom y cols. 1986). El peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , (producido por la dismutación del anión superóxido y catalizado por la enzima superóxido dismutasa) en la presencia de hierro reducido y oxidado y degradado directamente en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, reacciones que incrementan los radicales hidroxilo (Fig.26).

Se ha demostrado que los radicales libres "tilos" son producidos en la presencia de anión superóxido y de sustancias que contienen grupos -SH libres (Cederbaum y Dicker, 1983). Otros radicales libres se derivan de la lipoperoxidación (lipodienilos y lipoperóxidos). También ha sido demostrado que el radical libre derivado del etanol (hidroxietil) es producido por el sistema microsomal oxidante del etanol en presencia de hierro (Lai y Piette, 1977; Finkelstein y cols. 1980; Ross y cols. 1984).

### **Especies relacionadas con el oxígeno.**

La formación de radicales libres del oxígeno producidos por la ingesta de etanol fue examinado en primer lugar por Cederbaum y colaboradores del grupo de Lieber (Roubal y Tappel, 1966; Cederbaum y cols. 1979; Klein y cols. 1983. Ohnishi y Lieber, 1978). Estos autores mostraron que en presencia de microsomas y hierro, el etanol llega a ser oxidado a acetaldehído de manera no enzimática. Sin embargo con

---

un agente quelante de hierro: desferrioxamina, la oxidación del etanol no se llevaba a cabo (Klein y cols. 1983). A partir de esto se postuló la formación del radical libre hidroxilo (OH·), el cuál puede ser el promotor real de la oxidación del etanol, posiblemente el intermediario en la formación del hidroxietil.

El OH· puede ser formado directamente de la reacción de Fenton involucrando al peróxido de hidrógeno en la presencia de Fe<sup>2+</sup> (Fig. 9).

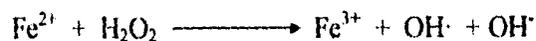


Fig.9. Reacción de Fenton

El peróxido de hidrógeno, requerido para esta reacción se produce de la reducción del anión superóxido. Este puede ser formado en cadena en el retículo endoplásmico liso, con la contribución del FAD.

El origen del anión superóxido puede estar también relacionado con la oxidación del etanol en el metabolismo de xenobióticos, es decir, por reacción enzimática a nivel de la P<sub>450</sub>c reductasa.

### **Radical hidroxietil**

La hipótesis de la formación de un radical libre derivado del etanol durante una intoxicación etílica fue hecha por Slater (1972). Cederbaum y colaboradores (Roubal y Tappel 1966; Klein y cols. 1983), mostraron que la oxidación del etanol en microsomas de hígado depende de la presencia de especies reactivas del oxígeno y

---

propusieron que un radical libre puede ser formado y centrado en el etanol *per se* e inducirse del OH· no proveniente del etanol.

El sitio de formación del hidroxietil no es claro aún (Albano 1988). La adición de catalasa, para destruir peróxido de hidrógeno disminuye la formación del hidroxietil, mientras que la adición de azida, para inhibir catalasa, incrementa su formación. Sin embargo utilizando *in vitro* atrapadores de OH·, como manitol o benzoato, tienen una acción protectora contra la formación del hidroxietil. Todos estos resultados muestran la importancia de la formación no enzimática del hidroxietil directa de la interacción del etanol con el OH·.

Hasta el momento no se sabe la importancia toxicológica real de la producción del hidroxietil. Lo que se sabe con certeza es que *in vitro* este radical libre es producido únicamente durante el metabolismo del etanol en el retículo endoplásmico liso, y que su formación es mucho mas alta en animales pretatados con etanol (Lieber y cols. 1991b).

### **Radical libre Tilo**

La formación de este radical (RS·) fue demostrada por Ross y colaboradores (1984) al estudiar el metabolismo del acetaminofen. El proceso es catalizado por una peroxidasa al actuar sobre grupos tioles (R-SH) los cuales se oxidan en presencia de iones metálicos de transición (Fig. 10).

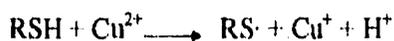


Fig. 10. Formación de radical tilo.

---

Los radicales "tilo" pueden ser formados también por la fisión homolítica de enlaces disulfuro en proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1989)(Fig.11).

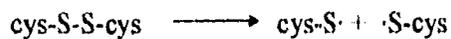


Fig.11. Formación de radical tilo en enlace disulfuro.

La producción de radicales libres "tilo", especialmente de glutatión (GS·) puede explicarse como una acción protectora de grupos tioles contra los radicales libres de algunos xenobióticos (Fig.s.12 y 19). La formación de radicales libres tilos puede ser como una reacción protectora para la destrucción del peligroso OH·, en el caso del GSH en estas reacciones se provoca una disminución en la concentración local de éste, pero usualmente la célula reemplaza la cantidad perdida rápidamente por una síntesis directa *de novo* de GSH o por reducción de G-S-S-G (Dianzani,1991).



Fig.12. Formación de radical tilo de glutatión.

A pesar de que los radicales tilo son menos reactivos que los radicales hidroxilo pueden causar algunos problemas biológicos. Mezclas de sales de Fe<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y GSH pueden también producir radicales OH·, sin embargo esto ha sido demostrado solo a bajas concentraciones de GSH (<1mmol/l) por lo que no es probable que ocurra así intracelularmente (Wefers y Sies, 1983).

---

## Defensas Celulares Contra Radicales Libres

Para protegerse de un aumento en la poza tisular de radicales libres, la célula cuenta con mecanismos complementarios: el primer mecanismo consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno, mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva, sin liberar los intermediarios. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa, responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo. Un segundo mecanismo lo realizan enzimas especializadas, entre las que se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), que son metaloenzimas que catalizan con una gran eficiencia la dismutación del radical anión superóxido para dar como producto oxígeno y peróxido de hidrógeno. En las células de los organismos eucariontes existen dos: una que es la citoplásmica y contiene un átomo de  $\text{Cu}^{2+}$  y uno de  $\text{Zn}^{2+}$  en su sitio activo. El átomo de cobre es reducido a  $\text{Cu}^+$  y reoxidado a  $\text{Cu}^{2+}$  durante el ciclo catalítico; la otra es mitocondrial y contiene Manganeseo ( $\text{Mn}^{2+}$ ) en su sitio activo. Otro mecanismo de defensa involucra la acción de la enzima catalasa que se encuentra en los peroxisomas y que cataliza la conversión de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a dos de agua y una de oxígeno; y en el mismo contexto, la acción de las peroxidasas que catalizan la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por diversos donadores de electrones.

Otros mecanismos celulares de defensa contra radicales libres, involucran la acción de un grupo de atrapadores fisiológicos de radicales libres entre los que se describen, la vitamina A ( $\beta$ -caroteno), la vitamina C, la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), el glutatión reducido (GSH) y la bilirrubina, entre otros (Fig. 13).

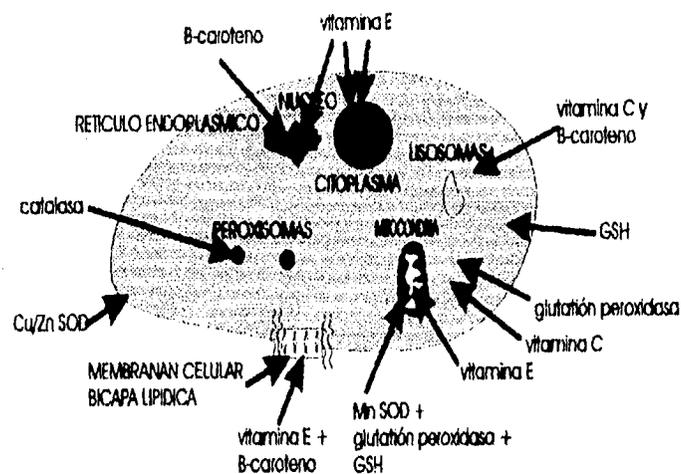


Fig.13. Mecanismos celulares de defensa

### **Glutatión**

Una de las moléculas celulares más importantes que actúa como atrapador de radicales libres es el glutatión (Akerboom y Sies, 1981; Meister y Suresh, 1976; Sagone y Husney, 1987; Ziegler, 1985). El glutatión es un tripéptido tiolizado de naturaleza no protéica, compuesto por tres aminoácidos no esenciales: glutamato, cisteína y glicina, es también llamado L- $\gamma$ glutamil-L-cisteinilglicina (Fig. 14).

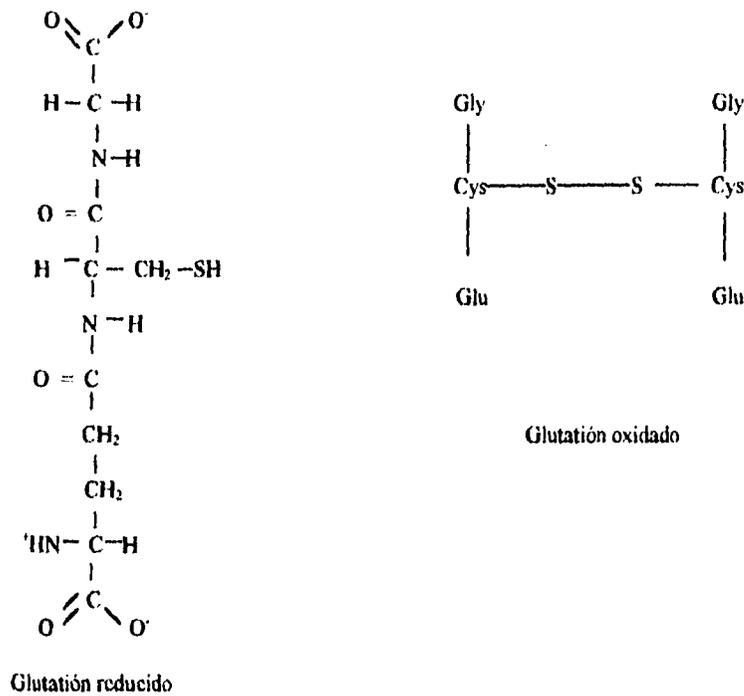


Fig. 14 Estructura química del glutathión

La síntesis del glutathión se realiza principalmente en el hígado de donde posteriormente es transportado al resto de las células, pero puede ser sintetizado en el riñón, cerebro, intestino, músculo y eritrocito (Meister, 1976). En la síntesis, intervienen la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteínsintetasa, como primer paso y posteriormente la glutathión sintetasa, promoviéndose la síntesis *de novo* a partir de cisteína como fuente de grupos tiolizados (Tateishi y cols. 1974).

La síntesis intracelular de glutathión y su utilización, están relacionadas con el

ciclo del  $\gamma$ -glutamil, una serie de seis reacciones catalizadas por algunas enzimas (Fig. 15), las cuales fueron analizadas a través de trabajos sobre enzimología de glutatión, especialmente estudios sobre su síntesis y uno de sus productos metabólicos: la 5-oxoprolina (Meister, 1975; Van Der Werf, 1975).

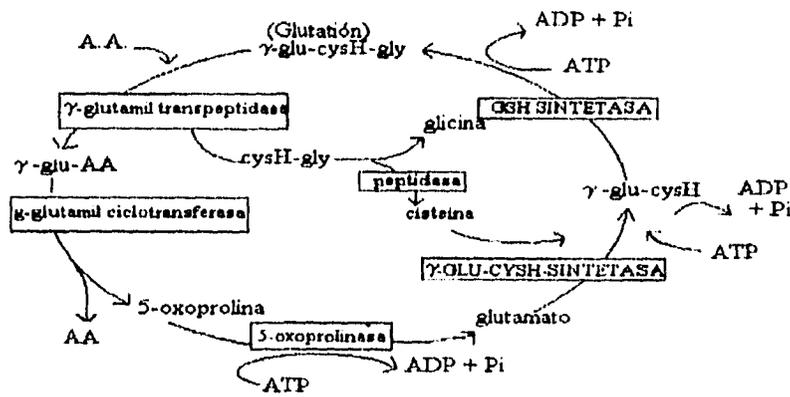


Fig. 15. Ciclo del  $\gamma$ -glutamil.

Tomado de: Glutathione and Related  $\gamma$ -glutamil compounds. Meister, 1976

El contenido de glutatión celular es la suma de todos sus posibles estados: como glutatión reducido GSH, como glutatión oxidado (GSSG) y en mezclas de disulfuros unido a proteínas, xenobióticos o endobióticos como conjugados.

---

### **Funciones Celulares del glutati3n**

1. Protege la integridad estructural y funcional de las c3lulas evitando la lipoperoxidaci3n lip3dica de los 3cidos grasos insaturados interceptando radicales libres y descomponiendo los hidroper3xidos (Halliwell, 1989).
2. Regula la actividad enzim3tica de la c3lula normal (Ziegler, 1985).
3. La respuesta celular a inductores de mitosis esta relacionada con la concentraci3n de GSH, el que interviene en la liberaci3n de calcio necesario para iniciar la mitosis (Mallery y cols. 1991).
4. Modula la conformaci3n y s3ntesis prot3ica manteniendo la poza de grupos tioles en las prote3nas (Ziegler, 1985).
5. Participa en la s3ntesis de macromol3culas de DNA y de RNA. Algunos pasos en la s3ntesis de nucle3tidos se afectan por las bajas concentraciones de GSH o por el aumento de GSSG. Para la s3ntesis de DNA y RNA el GSH puede donar H<sup>+</sup> para reducir los ribonucle3tidos en el sistema con el NADPH, GSSG reductasa, GSH y glutarredoxina (Ziegler, 1985).
6. Participa en el metabolismo de agentes electrof3licos (radicales libres). El glutati3n forma compuestos conjugados, que son excretados como tales o se metabolizan, como el 3cido mercapt3rico y se eliminan por la orina o la bilis.

Dentro de los compuestos electrof3licos se encuentran los organofosfatados, las quinonas, los compuestos insaturados y los ep3xidos. Muchos de estos compuestos reactivos se producen por la oxidaci3n del compuesto original en

---

el hepatocito, como sucede con los epóxidos (Comporti y Benedetti, 1985; Southorn, 1988). La conjugación se realiza por medio de la glutatión S-epóxidotransferasa, glutatión S-alkil transferasa y la glutatión S-transferasa. (Boyland, 1976; Ziegler, 1985).

7. Neutraliza los peróxidos que se liberan por los macrófagos y las células líticas del sistema inmune en el caso de células oncogénicas (Kosower, 1978).
8. Es la mejor defensa antioxidante contra la quimioterapia en células cancerosas.
9. Participa en el proceso inflamatorio uniéndose al leucotrieno C<sub>4</sub> y formando leucotrieno D<sub>4</sub>.

El glutatión forma parte esencial de la célula al mantener a los grupos sulfhidrilos (-SH) en su forma funcional reducida, y actúa indirectamente como protector de membranas celulares (Akerboom y Sies, 1981, Brigelius y cols. 1983; Ziegler, 1985). En su forma reducida juega un papel importante en la desintoxicación al reaccionar con peróxidos de hidrógeno y con peróxidos orgánicos (Halliwell, 1987), evitando la lipoperoxidación de las membranas, lo cual a su vez es indicador del grado de toxicidad ante la presencia de radicales libres.

En el metabolismo alterado por xenobióticos, puede resultar hasta un 30% de glutatión por debajo del nivel normal (Plummer, 1981). Se propone que el consumo agudo del etanol, inhibe la síntesis y provoca un aumento en la utilización del glutatión reducido (Speisky, 1985).

En los mamíferos, la glutatión peroxidasa (enzima citoplasmática que contiene selenio) es muy importante, ya que cataliza la siguiente reacción:

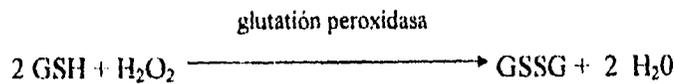


Fig. 16. Oxidación del GSH

Por otro lado, la glutación reductasa convierte al glutación oxidado (GSSG) en reducido (GSH) con intervención de NADPH, impidiendo así que se agoten las reservas de GSH (Fig. 17).

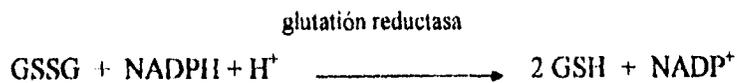


Fig. 17. Reducción del glutación

El NADPH requerido para esta reacción proviene principalmente de la vía metabólica conocida como vía de oxidación de las pentosas. La primer enzima en esta vía es la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Fig. 18).

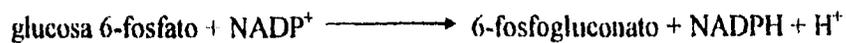


Fig. 18 Reacción catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

La tasa a la cual la vía de las pentosas opera está controlado por el abastecimiento de  $\text{NADP}^+$  para la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Dado que la glutación reductasa requiere y disminuye la tasa de  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ , la vía de las pentosas se acelera para reemplazar el NADPH.

Como ya se mencionó, el GSH es un cofactor para varias enzimas de distintas vías metabólicas, tales como la glioxalasa, la maleilacetoacetato isomerasa, la

endoperóxido prostaglandina isomerasa y la DDT dihidroclorinasa y puede estar involucrado en la síntesis de hormonas tiroideas. El glutatión juega un papel muy importante en la degradación de la insulina en los animales y también en el metabolismo de herbicidas y pesticidas y otros compuestos ajenos. Muchos de estos compuestos ajenos son metabolizados en el hígado para formar ácido mercaptúrico, el cual es excretado vía biliar. El primer paso en este proceso de conjugación de compuestos con el GSH está dado por la enzima glutatión S-transferasa (Fig.19). Los conjugados de glutatión son excretados hacia la bilis y así eliminados del organismo.

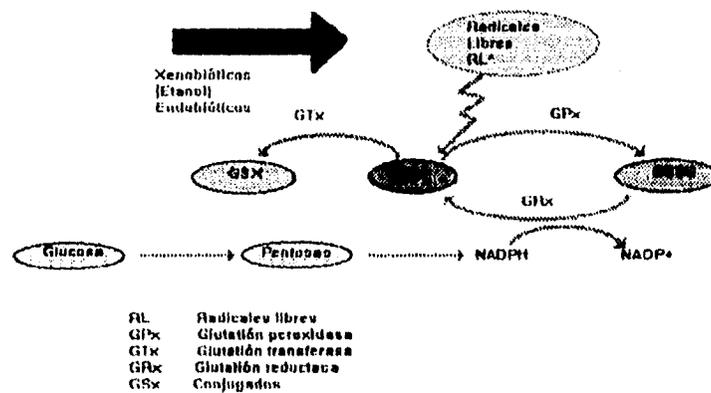


Fig. 19. El GSH puede ser oxidado a GSSG (Fig. 16) o formar conjugados (GSX) con sustancias generadoras de radicales libres (\*RL) ya sean xenobióticos (ajenas al organismo) o endobióticos (producidos en el metabolismo); por lo tanto el GSH contribuye a disminuir el tamaño de la poza de radicales libres en células y tejidos, y por ende a evitar el daño producido por un exceso de radicales libres.

Las concentraciones de glutatión total que Akerboom y Sies (1981) reportan en sangre y en plasma de humano son de 1.5  $\mu$ mol/ml y 0.3 nmol/ml respectivamente y en rata de 1.2  $\mu$ mol/ml en sangre total y en plasma de 5 nmol/ml.

Los eritrocitos estan continuamente expuestos al flujo del anión superóxido que se produce al ser oxidada la oxihemoglobina (Fig.20 y 26). El eritrocito carece de mitocondrias y de la maquinaria para sintetizar proteínas, y ácidos nucleicos, sin embargo cuenta con la maquinaria para sintetizar el GSH a partir de sus tres aminoácidos constitutivos, con ello logra mantener su concentración y así protegerse contra la acción del anión superóxido y contra peróxidos de hidrógeno u orgánicos.

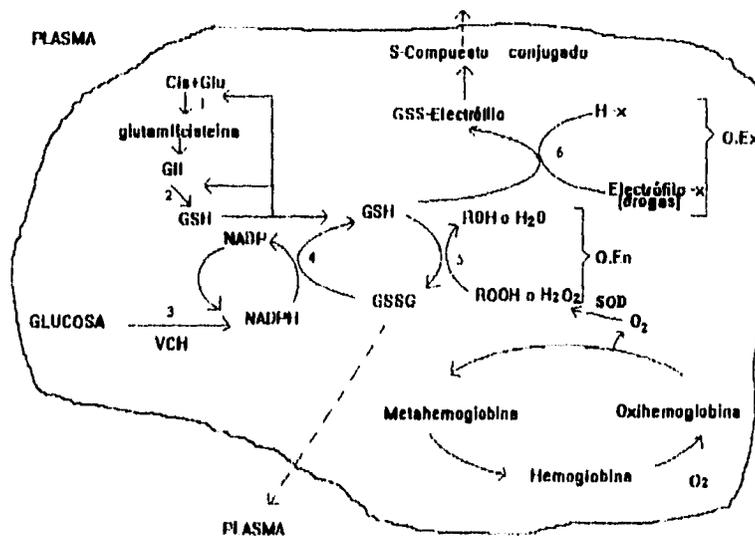


Fig.20 El sistema glutatión en el eritrocito. Cis=Cisteína; Glu=Glutamato; Gli=Glicina; GSH=Glutatión reducido; GSSG=Glutatión oxidado; VCH=Via colateral de las hexosas, O.Ex=Oxidantes exógenos, O.En=Oxidantes endógenos; SOD= Superóxido dismutasa  
 REACCIONES: 1)g-glutamil-cistein sintetasa, 2)glutatión sintetasa, 3)Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 4)glutatión reductasa, 5)glutatión peroxidasa, 6)glutatión S-transferasa.  
 Modificado de: Costagliola y Rinaldi, 1990.

---

## Piroxicam

El Piroxicam (4-hidroxi-2-metil-N-2-pirivinil-2H-1,2-benzotiacina-3-carboximida) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (Fig. 21), que *in vivo* e *in vitro* inhibe la síntesis de prostaglandinas llegando a ser un inhibidor selectivo reversible del paso de la ciclooxigenasa en el metabolismo de ácido araquidónico de la misma manera que otros antiinflamatorios no esteroideos (Brogden 1981).

Existen datos en la literatura respecto a la capacidad de este fármaco para disminuir la producción de aniones superóxido por los neutrofilos activados en sangre *in vitro* e *in vivo* (Kaplan y cols.1984).

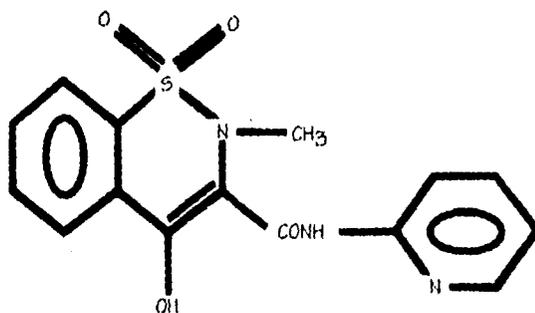


Fig. 21 Fórmula del piroxicam.

Hay evidencia de que la administración de este antiinflamatorio, simultáneamente con CCL<sub>4</sub>, previene parcialmente en hígado, el incremento en la actividad de dos aminotransferasas, mantiene en valores normales la lipoperoxidación y el contenido de triacilglicéridos, atenuando los cambios

---

morfológicos del hígado causados por compuestos hepatotóxicos (Diaz Belmont y cols. 1990).

También se ha demostrado que en ratas ayunadas, a las 8 horas posteriores a una intoxicación etílica y ser administrado de manera simultánea, el piroxicam, protege parcialmente el aumento de la lipoperoxidación hepática, y además revierte los valores bajos de glutatión en hígado, observados también como consecuencia de la intoxicación aguda con etanol (Zentella y cols. 1993).

---

## Hipótesis

La oxidación de una carga aguda de etanol produce un aumento en la poza tisular de radicales libres. Si en respuesta a la toxicidad del etanol, la concentración de glutati3n reducido (GSH) se ve disminuida en h3gado, entonces, el efecto en sangre total, ser3 semejante.

Si la administraci3n de piroxicam revierte los bajos valores de GSH en h3gado provocados por una intoxicaci3n etilica aguda, entonces, los efectos del antiinflamatorio no esteroideo (AINE) en sangre, ser3n similares.

Si los eritrocitos liberan GSSG cuando est3n expuestos a estr3s oxidativo (Srivastava, 1969; Smith, 1974), probablemente como una consecuencia del incremento del contenido intracelular de GSSG al ser oxidado el GSH, (Bhattacharya, 1955) y el piroxicam impide su oxidaci3n, entonces, al ser administrado el AINE simult3neamente con el etanol, la concentraci3n de GSSG en sangre total no se elevar3.

Si la oxihemoglobina ( $\text{oxiHb-Fe}^{2+}$ ) se oxida a metahemoglobina ( $\text{metaHB-Fe}^{3+}$ ) en presencia de radicales libres (Witerbourn, 1990) o sustancias altamente oxidantes producidos durante la oxidaci3n del etanol (Reinke y cols. 1987; Reinke y cols. 1992; Halliwell y Gutteridge, 1990)(Fig 26), entonces, la concentraci3n de oxihemoglobina disminuir3 durante la intoxicaci3n etilica aguda.

Si el piroxicam act3a inhibiendo la producci3n de an3n super3xido generado por el etanol (Sagone y cols. 1987; Abramson y cols. 1984), entonces, la oxidaci3n de la oxihemoglobina ser3 revertida.

---

Si el etanol provoca cambios en los niveles de glucosa sanguínea y el piroxicam revierte algunos efectos deletéreos del etanol, entonces, al ser administrado de manera simultánea el piroxicam con el etanol, se revertirán los efectos del etanol.

Si el etanol a la dosis administrada (5g/kg de peso) por vía orogástrica ocasiona daño hepático manifiesto por la elevación de las enzimas de escape (GOT y GPT) en suero y si el piroxicam atenúa el daño hepático producido por el etanol, entonces, podremos apreciar ausencia de cambios de estas transaminasas a lo largo del tiempo post-tratamiento con el fármaco.

---

## **Objetivo**

Conocer si en sangre total de rata, el piroxicam revierte los efectos deletéreos del etanol causados por una intoxicación aguda, tomando en cuenta algunos indicadores sanguíneos como: oxihemoglobina, glucosa, glutatión oxidado, glutatión reducido y transaminasas glutámico-oxalacética y glutámico-pirúvica.

---

## Método

Se utilizaron ratas macho Wistar de un peso corporal entre 180 a 220 g, alimentadas *ad libitum*, y con libre acceso a agua hasta el inicio del experimento, distribuidas en 4 grupos:

a) **Grupo G+S:** las que recibieron glucosa, 40% p/v, solución isocalórica (aporta las mismas calorías que el etanol) tomando en cuenta la dosis de etanol, y además las cantidades equivalentes de la solución vehículo del piroxicam: solución salina fisiológica;

b) **Grupo G+P:** las que recibieron glucosa + piroxicam, solución isocalórica de glucosa (aporta las mismas calorías que el etanol) y piroxicam (Feldene) 10 mg/kg de peso corporal;

c) **Grupo E+S:** las que recibieron etanol (60% v/v) 5 g/kg de peso corporal + solución salina fisiológica;

d) **Grupo E+P:** las que recibieron etanol + piroxicam, etanol 5 g/kg de peso corporal y piroxicam (Feldene) 10 mg/kg de peso corporal.

La solución de glucosa y la solución de etanol fueron administrados vía orogástrica (v.o.g.) y la solución salina fisiológica y la solución de piroxicam por vía intraperitoneal (v.i.p.).

---

### **Recolección de las muestras**

A partir de la administración de los tratamientos a las 4:00 a.m., se recolectó en forma sistemática aproximadamente 1 ml de sangre del plexo orbital, cada 4 horas, teniendo con esto muestras de las 4, 8, 12, y 16 horas posteriores a la intoxicación.

Para la toma de muestra de sangre, las ratas fueron ligeramente anestesiadas con éter etílico anhidro y la sangre fue tomada con tubos capilares y recolectada en tubos vacutainer de 5 ml.

La sangre tomada fue preparada para la cuantificación de glutatión total GT (GSH + GSSG) y glutatión oxidado (GSSG) según los métodos I y IV de Akerboom (1981), respectivamente.

Para la cuantificación de GT la muestra se mezcló 1:1 con ácido perclórico (2M) + EDTA (4mM), se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se decantó el sobrenadante, se desechó la proteína precipitada y se usó una alícuota de 10 µl, donde inmediatamente se midió la concentración de GT.

Para GSSG la muestra se mezcló en relación 1:1 con ácido perclórico (2M) + EDTA (4mM) + NEM (N-etil maleimida 5 mg/ml) se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. a 4°C, se decantó el sobrenadante el cual se ajustó a pH de 6.2 utilizando una solución 2M de KOH + 0.3M de MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico). El precipitado -perclorato de potasio (KClO<sub>4</sub>)- se eliminó por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y para eliminar el NEM se lavó la muestra con éter etílico anhidro por cinco veces en relación 1:1. El exceso de éter, se liberó en una atmósfera a presión reducida.

---

### **Cuantificación de glutatión**

Para valorar el glutatión total GSH + GSSG (GT) según el método I propuesto por Akerboom y Sies (1981), se empleó una alícuota de 10  $\mu$ l de la muestra, siguiendo la reducción de DTNB (5,5'-Ditio-bis 2-ácido dinitrobenzoico) por espectrofotometría a 412 nm, durante 5 minutos.

Para el glutatión oxidado (GSSG), se emplearon 500  $\mu$ l de la muestra, siguiendo la desaparición de NADPH por espectrofotometría a 340 nm durante 2 minutos, utilizando el método IV de Akerboom y Sies (1981).

En ambos procesos, los cálculos se basaron en las curvas patrón que fueron preparadas de manera individual para cada experimento.

El glutatión reducido (GSH), fue calculado por la diferencia del glutatión total menos el GSSG. Como el Glutatión reducido forma casi el 95% del glutatión total, a partir de aquí, hasta la discusión, se hará referencia solo al GSH en lugar del GT.

Por otro lado, se llevaron a cabo análisis de glucosa sanguínea y hemoglobina total, así como también la medición en la concentración sérica de dos enzimas: la GOT (transaminasa glutámico oxalacética) y la GPT (transaminasa glutámico pirúvica), por tiras enzimáticas en un sistema reflectómetro Reflotron. Los reactivos empleados proceden de Sigma Chemical y son de grado analítico. Las tiras enzimáticas son de Boehringer Mannheim.

Los datos presentados son valores promedio  $\pm$  error estándar. En el tratamiento estadístico se empleó la prueba t-student. La significancia estadística se consideró como  $p \leq 0.05$ .

---

## Resultados

### Glutación

#### 4 HORAS

Los valores de glutación reducido en la sangre de las ratas fueron graficados y se muestran en la Fig.22. Existe una disminución estadísticamente significativa de los valores de GSH en el grupo G+P con respecto al grupo control G+S ( $0.788 \pm 0.03$  vs.  $0.969 \pm 0.06$   $\mu\text{mol/ml}$  de sangre total.  $p \leq 0.04$   $N=10$ ). Se observa también una considerable disminución, estadísticamente significativa, de GSH en el grupo E+S con respecto al control ( $0.638 \pm 0.03$   $\mu\text{mol/ml}$  de sangre total  $p \leq 0.0006$   $N=10$ ). Cuando se comparan las concentraciones de GSH en el grupo E+S y el grupo E+P se aprecia diferencia significativa con una  $p \leq 0.0002$   $N=10$ . Las concentraciones de GSH en el grupo E+P se asemejan a las controles.

Con respecto a las concentraciones de GSSG en la sangre de las ratas y que se muestran graficados en la Fig.23, es de notarse que los valores son 500 veces menores que los de GSH (Fig.22). Se observa un aumento estadísticamente significativo de GSSG al comparar el grupo E+S con respecto al control ( $1.93 \pm 0.17$  vs.  $1.23 \pm 0.02$   $\text{nmol/ml}$  de sangre total.  $p \leq 0.02$   $N=8$ ). Existe también diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.02$   $N=8$ ) al comparar los valores del grupo E+S y el grupo E+P, en este caso los valores altos de GSSG regresan a las cifras controles al administrar simultáneamente el piroxicam y el etanol.

La relación GSH/GSSG se ve disminuida en el grupo G+P en un 23.6% y en el grupo E+S en un 58% (ver Cuadro II), ambos en comparación con el grupo G+S.

---

## 8 HORAS

A las 8 horas del tratamiento la concentración sanguínea de GSH (Fig.22), permanece disminuida de manera significativa en el grupo E+S con respecto al control G+S ( $0.689 \pm 0.03$  vs.  $0.899 \pm 0.05$   $\mu\text{mol/ml}$  de sangre total.  $p \leq 0.008$   $N=9$ ). Al ser comparados los valores de GSH del grupo E+S y el grupo E+P existe diferencia significativa ( $p \leq 0.002$   $N=7$ ), siendo los valores de este último grupo semejantes a los controles tratados con glucosa.

En lo que respecta a la concentración de GSSG (Fig.23), continúa aumentada en los grupos E+S y E+P ( $1.57 \pm 0.17$  y  $1.44 \pm 0.26$   $\text{nmol/ml}$  de sangre total respectivamente) con respecto al control ( $1.30 \pm 0.14$   $\text{nmol/ml}$  de sangre total), sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas.

La relación GSH/GSSG, probablemente por ritmo circádico, baja en el grupo control y continúa baja en los grupos G+P y E+S (ver Cuadro II) al compararla con el grupo G+S.

## 12 HORAS

A las 12 horas de recibir el tratamiento la concentración de glutatión reducido del grupo E+S es igual a la concentración del grupo control G+S (Fig. 24).

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.04$   $N=8$ ) entre el grupo E+S ( $0.689 \pm 0.03$   $\mu\text{mol/ml}$  de sangre total) y el grupo E+P ( $0.818 \pm 0.04$   $\mu\text{mol/ml}$  de sangre total), observándose aumentada la concentración en este último grupo.

---

Las concentraciones de GSSG en los grupos E+S y E+P permanecen aumentadas con respecto al control, no siendo estadísticamente significativas estas diferencias (Fig.23).

La relación GSH/GSSG se recupera en el grupo G+P y sin embargo aún permanece baja en los grupos E+S (ver Cuadro II) al comparar con el grupo G+S.

### **16 HORAS**

A las 16 horas de recibir el tratamiento la concentración de GSII en el grupo E+S aparece por debajo de la control ( $0.569 \pm 0.08$  y  $0.739 \pm 0.06$ ), no siendo esta diferencia, (Fig.22) significativa estadísticamente.

En lo que se refiere a la concentración de GSSG continúa aumentada en el grupo E+S, con respecto al control G+S pero esta diferencia no es significativa estadísticamente (Fig.23).

La relación GSH/GSSG continúa disminuida en el grupo tratado con etanol al comparar con el grupo control (ver Cuadro II).

### ***Glutación en eritrocitos y plasma***

Se realizó una serie de experimentos con el fin de conocer y comparar los efectos del etanol sobre la concentración de glutación total en el plasma y en el eritrocito, bajo las mismas condiciones experimentales estudiadas para la sangre total.

Estos experimentos proporcionan datos que indican que a las 4 horas posteriores a la intoxicación existe aumento significativo de GT en el plasma en los

---

grupos G+P ( $62 \pm 9$  nmolas) y E+S ( $70 \pm 8$  nmolas), con respecto al grupo G+S ( $13 \pm 5$  nmolas)  $p \leq 0.001$  N=4 (Fig.24). Cuando se compara el grupo E+S y E+P existe diferencia significativa. Los valores de glutatión en el grupo E+P son semejantes a los controles.

Con respecto a la concentración de glutatión total en eritrocito a las 4 horas posteriores al tratamiento, existe disminución significativa de GT en el grupo E+S con respecto al control G+S ( $0.94 \pm 0.04$  vs.  $1.36 \pm 0.08$   $\mu$ molas  $p \leq 0.004$  N=4) (Fig.25). Cuando el piroxicam es administrado de manera simultánea con el etanol, los valores de GT no se ven alterados.

A las 8 y 12 horas posteriores al tratamiento permanecen aumentados los valores de GT en el plasma en el grupo E+S, existiendo diferencias significativas tanto a las 8 horas ( $83 \pm 6$  vs.  $26 \pm 4$  nmolas  $p \leq 0.0003$  N=4) como a las 12 horas ( $100 \pm 6$  vs.  $19 \pm 3$  nmolas  $p \leq 0.001$  N=4) (Fig.24) al ser comparados con el grupo control.

En el eritrocito, a las 8 horas posteriores a la intoxicación etílica, aunque permanecen aumentados los valores de GT, ya no se aprecian diferencias significativas entre los grupo G+S y E+P. A las 12 horas de tratamiento, los valores de GT se estabilizan en todos los grupos experimentales. Sin embargo a las 16 horas aparece diferencia significativa en el grupo E+S al compararlo con el grupo E+P ( $0.60 \pm 0.07$  vs.  $0.915 \pm 0.06$   $p \leq 0.02$  N=4) (Fig.25).

Con lo que respecta a la concentración de GT en plasma a las 16 horas posteriores se estabilizan los valores en todos los grupos experimentales (Fig.24).

---

## **Hemoglobina**

En el Cuadro III se muestra la concentración de oxihemoglobina en sangre de rata a diferentes horas posteriores al tratamiento. A las 4 horas de tratamiento se observa una disminución estadísticamente significativa en el grupo E+S con respecto al grupo control ( $14.51 \pm 0.22$  vs.  $16.71 \pm 0.36$  N=9  $p \leq 0.0009$ ), mientras en el grupo E+P se revierte esta disminución.

A las 8 horas posteriores al tratamiento, continúa baja la concentración de oxihemoglobina en el grupo E+S con respecto al control ( $13.26 \pm 0.31$  vs.  $14.02 \pm 0.64$ ), esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p \leq 0.02$ , N=7).

A partir de las 12 hasta las 16 horas posteriores a la administración de los tratamientos no existen diferencias en las concentraciones de oxihemoglobina entre los distintos grupos.

Cabe hacer notar la disminución que existe en la concentración de oxihemoglobina en todos los grupos en el transcurso del tiempo, probablemente debida al sangrado al que fueron expuestos los animales, aunque es importante mencionar que la relación hematocrito/ volumen sanguíneo se mantuvo constante con lo que se descarta una hemodilución.

## **Glucosa**

Con respecto a las concentraciones de glucosa sanguínea (ver Cuadro IV), a las 4 horas después de haber sido administrado el tratamiento se observa una clara hiperglucemia en el grupo E+S con respecto al grupo control G+S ( $170.67 \pm 9.53$  vs.  $131.90 \pm 6.18$  N=10,  $p \leq 0.001$ ).

---

Este mismo efecto hiperglucemiante se conserva a las 8 (150.3±.58 vs. 140.3±6.05) y a las 12 horas postratamiento (151.99±12.06 vs. 129.87±7.3), siendo significativa esta diferencia solo a las 12 horas ( $p \leq 0.006$ ). El efecto hiperglucemiante del etanol no es revertido cuando se administra simultáneamente el piroxicam con el etanol.

A las 16 horas postratamiento se restablecen los valores en todos los grupos experimentales.

### ***Transaminasa glutámico oxalacética***

En el Cuadro V se presentan los datos de la concentración sérica de la GOT. A las 4 horas posteriores al tratamiento se observa un aumento significativo en la concentración de esta enzima en el grupo G+P con respecto al grupo control G+S (58.56±3.51 vs. 50.22±1.59  $p \leq 0.03$ ). También en este mismo tiempo se observa un aumento en la concentración sérica de esta enzima en el grupo E+S con respecto al grupo control G+S (62.24±3.15 vs. 50.22±1.59  $p \leq 0.006$ ). Notablemente al administrarse el AINE de manera simultánea con el etanol, la concentración de esta enzima sérica vuelve a los valores registrados en las ratas controles.

A las 8 horas posteriores a la intoxicación, continúa aumentada la concentración de la GOT en el grupo E+S con respecto al grupo G+S (77.88±4.84 vs. 58.55±6.41), diferencia que se prolonga hasta las 12 horas (85.38±5.44 vs. 67.67±5.19  $p \leq 0.03$ ) posteriores a la administración del tratamiento. La administración del piroxicam en forma simultánea no revierte los valores alterados por el etanol.

---

A las 16 horas se observa un aumento, con una marcada diferencia estadísticamente significativa, en la concentración de esta transaminasa entre el grupo G+P y el grupo G+S ( $125.73 \pm 8.54$  vs.  $66.43 \pm 6.32$   $p \leq 0.0001$ ) probablemente debido a la permanencia del piroxicam en la sangre o al daño causado por el antiinflamatorio.

### ***Transaminasa glutámico pirúvica***

En cuanto a la concentración de la GPT sérica (ver Cuadro VI), se observa un aumento significativo, estadísticamente, en la concentración de esta enzima en el grupo E+S con respecto al grupo G+S a las 4 horas posteriores al tratamiento ( $27.02 \pm 0.82$  vs.  $20.70 \pm 0.91$   $p \leq 0.0001$ ), que se prolonga hasta las 8 horas posteriores ( $27.20 \pm 1.33$  vs.  $20.67 \pm 0.94$   $p \leq 0.001$ ). No existe cambio aparente al administrar en forma simultánea el AINE con el etanol.

A las 12 horas no se aprecia ningún cambio estadísticamente significativo entre los grupos experimentales.

A las 16 horas posteriores al tratamiento aparece aumentada la concentración de esta enzima sérica en el grupo G+P ( $20.16 \pm 0.91$ ) con respecto al grupo G+S ( $16.96 \pm 0.73$ ) y en el grupo E+P ( $24.61 \pm 1.2$ ) con respecto al grupo E+S ( $19.05 \pm 1.25$ ), siendo estas diferencias, estadísticamente significativas. El aumento en la concentración de la GPT no se revierte cuando el piroxicam es administrado en forma simultánea con el etanol.

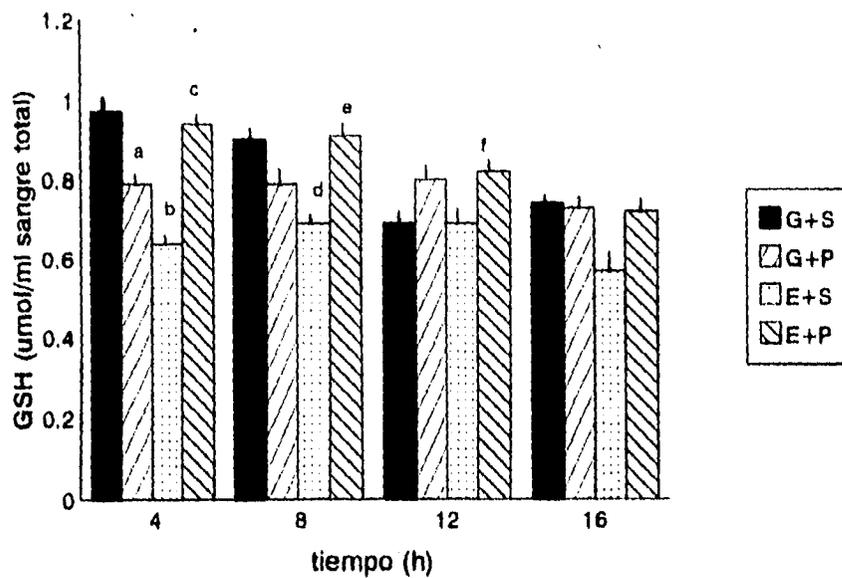


Fig.22. Efecto del piroxicam sobre el GSH sanguíneo en ratas etanolizadas en forma aguda. El etanol provoca una caída en la concentración de GSH, mientras que el piroxicam cuando se administra de manera simultánea con el etanol, revierte la concentración de GSH a los valores controles.

- |                          |                               |
|--------------------------|-------------------------------|
| G+S= Glucosa + Salina    | a G+S vs. G+P $p \leq 0.04$   |
| G+P= Glucosa + Piroxicam | b G+S vs. E+S $p \leq 0.006$  |
| E+S = Etanol + Salina    | c E+S vs. E+P $p \leq 0.0002$ |
| E+P = Etanol + Piroxicam | d G+S vs. E+S $p \leq 0.008$  |
|                          | e E+S vs. E+P $p \leq 0.002$  |
|                          | f E+S vs. E+P $p \leq 0.04$   |

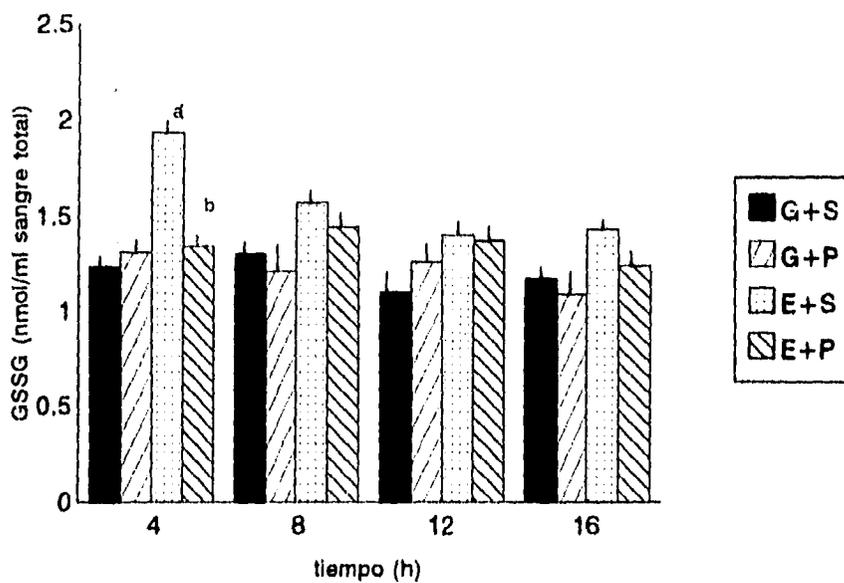


Fig.23. Efecto del piroxicam sobre la concentración de GSSG sanguíneo, en ratas etanolizadas en forma aguda. El etanol provoca un aumento hasta de un 56% en la concentración de GSSG a las 4 horas posteriores a la intoxicación etilica, mientras que al administrarse el piroxicam junto con el etanol, los valores no son afectados significativamente

G+S= Glucosa + Salina

G+P= Glucosa + Piroxicam

E+S = Etanol + Salina

E+P = Etanol + Piroxicam

a G+S vs. E+S  $p \leq 0.02$

b E+S vs. E+P  $p \leq 0.02$

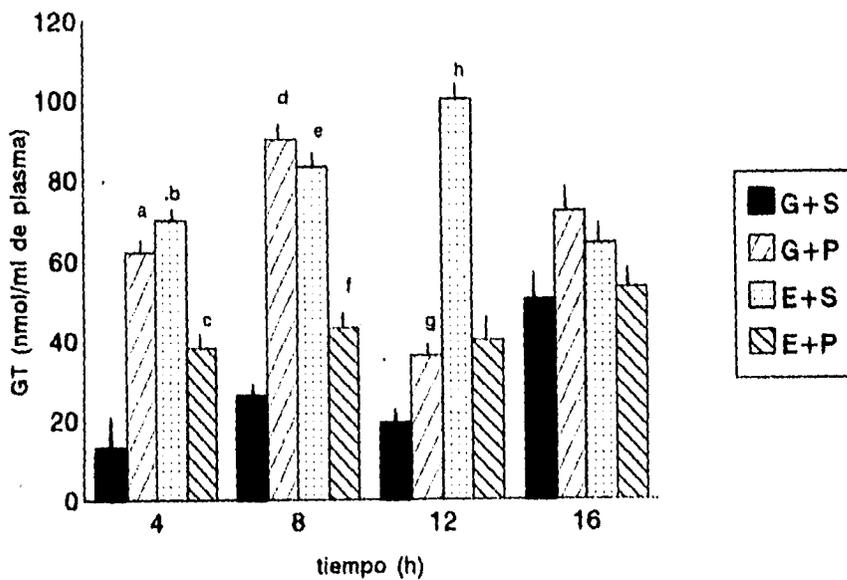


Fig. 24 Efecto del piroxicam sobre la concentración de GT en plasma en ratas etanolizadas. El etanol provoca un considerable aumento en la concentración de GT en el plasma, mientras que al administrar piroxicam de manera simultánea con el etanol los valores son disminuidos.

- |                          |                               |
|--------------------------|-------------------------------|
| G+S= Glucosa + Salina    | a G+S vs. G+P $p \leq 0.004$  |
| G+P= Glucosa + Piroxicam | b G+S vs. E+S $p \leq 0.001$  |
| E+S = Etanol + Salina    | c E+S vs. E+P $p \leq 0.01$   |
| E+P = Etanol + Piroxicam | d G+S vs. G+P $p \leq 0.0001$ |
|                          | e G+S vs. E+S $p \leq 0.0003$ |
|                          | f E+S vs. E+P $p \leq 0.003$  |
|                          | g G+S vs. G+P $p \leq 0.01$   |
|                          | h G+S vs. E+S $p \leq 0.0001$ |

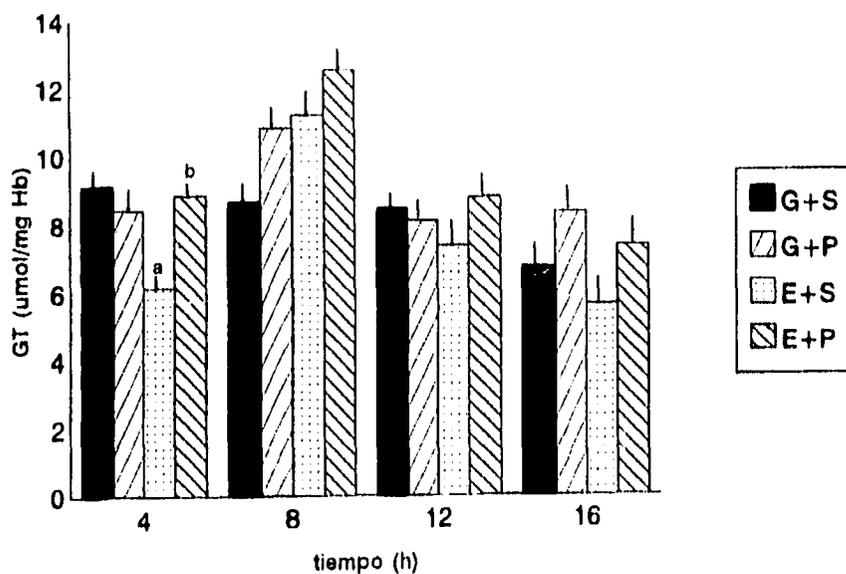


Fig.25 Efecto del piroxicam sobre la concentración de GT en eritrocito en ratas etanolizadas. El etanol provoca una disminución en la concentración de GT y al administrar de manera simultánea el piroxicam y el etanol la concentración de GT no se ve alterada.

G+S= Glucosa + Salina

a G+S vs. E+S  $p \leq 0.02$

G+P= Glucosa + Piroxicam

b E+S vs. E+P  $p \leq 0.006$

E+S = Etanol + Salina

E+P = Etanol + Piroxicam

---

**CUADRO II**

**Relación GSH/GSSG en sangre durante las diferentes horas posteriores al  
tratamiento**

TRATAMIENTO	4h	8h	12h	16h
G+ S	787.80	691.53	626.36	631.62
G + P	601.52	551.23	634.12	667.88
E + S	330.56	438.85	492.14	397.90
E+ P	700.00	630.94	597.08	579.83

CUADRO III

Efecto del piroxicam sobre la concentración de oxihemoglobina a diferentes horas después del tratamiento

TRATAMIENTO	4h	8h	12h	16h
G + S	16.71±0.36 <sup>1</sup> (9)	14.44±0.35 (9)	12.25±0.35 (7)	11.23±1.10 (7)
G + P	15.79±0.26 (9)	13.67±0.41 (7)	12.60±0.53 (7)	11.23±1.28 (7)
E + S	14.51±0.22 <sup>a</sup> (9)	13.26±0.31 <sup>c</sup> (7)	12.03±0.54 (7)	10.91±1.57 (7)
E + P	15.75±0.26 <sup>b</sup> (9)	14.02±0.64 (7)	12.25±0.55 (7)	11.15±2.24 (7)

<sup>1</sup> g/dl. Promedio ± error estándar El número de ratas en paréntesis.

<sup>a</sup> G+S vs. E+S p≤0.00009

<sup>b</sup> E+S vs. E+P p≤0.002

<sup>c</sup> G+S vs. E+S p≤0.02

CUADRO IV

Efecto del piroxicam sobre la concentración de glucosa sanguínea de ratas a diferentes horas después del tratamiento

TRATAMIENTO	4h	8h	12h	16h
G+ S	131.9±6.18 <sup>1</sup> (10)	140.3±6.05 (10)	129.87±7.3 (8)	138.57±14.79 (8)
G+ P	131.57±4.41 (10)	130.3±4.87 (10)	144.67±6.02 (9)	139.0±2.74 (7)
E + S	170.67±9.53 <sup>a</sup> (10)	150.3±6.58 (10)	151.99±12.06 <sup>b</sup> (9)	134.09±10.4 7(8)
E+ P	160.12±7.12 (10)	157.0±8.49 (10)	163.7±11.63 (10)	139.0±17.5 (7)

<sup>1</sup> mg/dl. Promedio ± error estándar. El número de ratas en paréntesis.

<sup>a</sup> G+S vs. E+S p≤0.001

<sup>b</sup> G+S vs. E+S p≤0.006

CUADRO V

Efecto del piroxicam sobre la actividad de la transaminasa glutámico oxalacética sanguínea en ratas a diferentes horas después del tratamiento

TRATAMIENTO	4h	8h	12h	16h
G + S	50.22±1.59 <sup>1</sup> (9)	58.55±6.41 (9)	67.67±5.19 (8)	66.43±6.32 (7)
G + P	58.56±3.51 <sup>a</sup> (9)	68.72±4.61 (9)	72.01±4.56 (8)	125.73±8.54 <sup>c</sup> (7)
E + S	62.24±2.34 <sup>b</sup> (9)	77.88±4.84 <sup>c</sup> (9)	85.38±5.44 <sup>d</sup> (8)	73.39±4.68 (8)
E + P	54.69±3.29 (9)	70.96±4.21 (8)	75.3±3.44 (8)	74.93±5.81 (7)

<sup>1</sup> U/dl. Promedio ± error estándar. El número de ratas en paréntesis

<sup>a</sup> G+S vs. G+P p≤0.03

<sup>b</sup> G+S vs. E+S p≤0.0006

<sup>c</sup> G+S vs. E+S p≤0.02

<sup>d</sup> G+S vs. E+S p≤0.03

<sup>e</sup> G+S vs. G+P p≤0.0001

CUADRO VI

Efecto del piroxicam sobre la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica  
sanguinea en ratas a diferentes horas después del tratamiento

TRATAMIENTO	4h	8h	12h	16h
G + S	20.70±0.91 <sup>1</sup> (8)	20.67±0.94 (8)	20.02±0.74 (8)	16.96±0.73 (8)
G + P	22.08±1.15 (8)	22.27±0.82 (8)	22.65±1.32 (8)	20.16±0.91 <sup>c</sup> (8)
E + S	27.02±0.82 <sup>a</sup> (9)	27.20±1.33 <sup>b</sup> (8)	21.70±1.62 (9)	19.05±1.25 (8)
E + P	28.13±1.56 (10)	27.03±0.93 (9)	24.10±0.85 (9)	24.61±1.2 <sup>d</sup> (8)

<sup>1</sup> U/dl. Promedio ± error estándar. El número de ratas en paréntesis

<sup>a</sup>G+S vs. E+S p≤0.0001

<sup>b</sup>G+S vs. E+S p≤0.001

<sup>c</sup>G+S vs. G+P p≤0.01

<sup>d</sup>E+S vs. E+P P≤0.006

---

## **Discusión**

### ***Glutación en sangre total***

A pesar de la extensa literatura que existe sobre el papel de la molécula del glutación en los procesos de detoxificación y su consecuente disminución en el hígado durante un periodo agudo o crónico de tratamiento con etanol, es insuficiente la información sobre el efecto del etanol sobre los valores de glutación (GSH y GSSG) en sangre total, en un modelo de intoxicación aguda. A este respecto, bajo un modelo de intoxicación aguda, Fernández y cols. (1983), reportan un aumento del 24% en la concentración de glutación total (GT) en sangre completa de rata a las 3 horas posteriores a la intoxicación. Sin embargo, son pocos los datos presentados, dado que el principal objetivo de su estudio fue la variación en la concentración de glutación en eritrocito y plasma provocada por el etanol.

A diferencia de los datos reportados por Fernández y cols. (1983), en este trabajo se encontró que en la sangre total de rata, sometida a una intoxicación aguda con etanol (5g/kg de peso corporal), la concentración de glutación total disminuye aproximadamente en un 34% a las 4 horas posteriores a la intoxicación etílica ( $0.97 \pm 0.06 \mu\text{mol}/\text{ml}$  de sangre total vs.  $0.64 \pm 0.03 \mu\text{mol}/\text{mol}$  de sangre total en el tratamiento con etanol  $n = 10$   $p \leq 0.0006$ ). Existe confiabilidad en los datos presentados en este trabajo puesto que la  $n$  experimental es mayor que el presentado por Fernández y cols. (1983) y el error estándar es muy pequeño.

Los datos de glutación total presentados arriba, comprenden la suma de GSH más los valores de GSSG. Como ya se mencionó en los capítulos que corresponden a

---

los antecedentes y en el capítulo de método, el glutatión total está constituido en un 95% por glutatión reducido.

Es interesante que las cifras de ambos metabolitos muestren diferente respuesta al tratamiento con el etanol: mientras las cifras de GSH disminuyen con el hepatotóxico ( $0.969 \pm 0.06$   $\mu\text{mol}/\text{ml}$  de sangre total control vs.  $0.638 \pm 0.03$   $\mu\text{mol}/\text{ml}$  de sangre total en tratamiento con etanol) (Fig.22), las de GSSG aumentan ( $1.93 \pm 0.17$   $\text{nmol}/\text{ml}$  de sangre total control vs.  $1.23 \pm 0.02$   $\text{nmol}/\text{ml}$  de sangre total en tratamiento con etanol) (Fig.23) a las 4 horas posteriores, generándose con esto una baja significativa del 58% en la relación GSH/GSSG (Cuadro II). La disminución más importante de GSH en sangre coincide con el aumento más importante del GSSG, lo que sugiere un aumento en la oxidación de GSH a GSSG (ver Fig. 16 y 20). Este efecto se mantiene durante las 16 horas posteriores a la intoxicación etílica. Existe la hipótesis que plantea que los radicales libres generados por el etanol, o el acetaldehído (Di Luzio y cols. 1976), aumentan la formación de lipoperóxidos (Videla y cols. 1980) después de una intoxicación etílica aguda y por esto aumenta la oxidación del GSH a GSSG: el GSH puede desaparecer rápidamente de la sangre debido probablemente, a su combinación con acetaldehído (Meister y Suresh, 1976) y a su participación en mecanismos tales como atrapador de radicales libres (Meister 1983).

En vista de que son muy grandes los aumentos que experimenta la concentración de GSSG provocados por el etanol en sangre total, una alternativa adicional, además de que el GSH sea convertido en GSSG, es que otros tejidos contribuyan a la poza sanguínea de GSSG por la liberación del mismo o de sus componentes, desde las células, a la circulación (Lauterburg y cols. 1984). Algunos

---

autores resaltan el hecho de que, bajo una intoxicación etílica aguda, no se encuentre aumentada la concentración de GSSG y sin embargo si disminuya la concentración de GSH (Speisky y cols. 1985), lo que apoyaría el supuesto que la célula, en este caso el hepatocito, este continuamente liberando GSSG hacia su exterior.

Se ha reportado una disminución intracelular de GSH por la acción de xenobióticos, sin embargo en órganos como el hígado o el riñón, se observa una recuperación de las concentraciones de glutatión al poco tiempo de provocado el estrés, debido, al alto porcentaje de síntesis de este metabolito en tales tejidos. En el hígado el porcentaje de síntesis de GSH representa el 60% del total del organismo y en el caso del riñón, la tasa de síntesis representa el 30% del total. Tejidos como la sangre, el pulmón, el colon, el corazón y el intestino grueso, son tejidos que tienen una tasa de síntesis de GSH y de recambio del mismo metabolito, muy baja (Potter y Tran 1993). La sangre, por ejemplo, tiene una tasa de síntesis que representa el 0.6% del total en el organismo; probablemente ésta sea la causa de que en sangre no exista una recuperación de las concentraciones normales de GSH (1.2 micromolas/ml de sangre) después de una intoxicación aguda (5g/kg de peso) con etanol.

### ***Glutatión en eritrocito y plasma***

Con lo que respecta a los resultados obtenidos en las concentraciones de glutatión total en plasma y en eritrocito en los grupos tratados con etanol, se observó un significativo aumento de GT en plasma, que coincide con una disminución significativa también de GT en eritrocito a las 4 horas posteriores a la intoxicación etílica. Se ha reportado que la ingesta de una carga aguda de etanol en ratas ayunadas provoca un efecto bifásico sobre el contenido de glutatión en el eritrocito, esto es: existe una disminución en el GT, con un efecto máximo a las 3 horas

---

posteriores a la intoxicación, seguida por una recuperación hasta los niveles basales a las 6 horas postintoxicación, además la caída en la concentración de GT en eritrocito coincide con el aumento en la concentración del mismo metabolito en plasma, el cual presenta un efecto máximo a las 3 horas posteriores a la intoxicación (Fernández y cols. 1983). Por otra parte en plasma de humanos se registró también un aumento en la concentración de glutatión en total, posterior a una intoxicación etílica aguda (Vendemiale y cols. 1989).

Los resultados obtenidos en este trabajo, en plasma y en eritrocito concuerdan con lo arriba descrito, así como también con lo reportado por Guerri y Grisolia (1982): la ingestión de etanol disminuye el contenido de glutatión (principalmente GSH) del eritrocito, debido sobre todo a una conversión a GSSG, lo que coincide con el punto de vista general: el glutatión es liberado de la célula en forma oxidada. De acuerdo con los datos de este trabajo se aprecia una recuperación de las concentraciones normales de glutatión total en el eritrocito hasta las 12 horas posteriores a la intoxicación. En el plasma, el etanol provoca un aumento de GT durante las 12 horas posteriores a la intoxicación, recuperándose las concentraciones hasta las 16 horas posteriores a la intoxicación.

El análisis realizado en sangre total por una parte, y en el eritrocito y plasma por la otra, conduce a la hipótesis de que la célula roja esté liberando GSSG hacia el plasma y probablemente también conjugados de glutatión por medio de la transferasa. El aumento observado en el plasma y la deficiente recuperación a las concentraciones normales, podrían ser efecto de: 1) la liberación de GSSG del eritrocito, 2) el probable daño causado a hígado con esa dosis de etanol y por tanto un flujo de glutatión oxidado de este órgano hacia el plasma y 3) que otros tejidos

---

esten contribuyendo a este efecto. Con lo observado, se podría postular que el efecto del etanol en sangre total es un reflejo de lo que ocurre en el hígado bajo una intoxicación etílica aguda, puesto que este órgano es el principal suministro de glutatión de todo el organismo, puesto que la concentración de GSH en hígado y en sangre es disminuida por el etanol.

### ***Efecto del piroxicam***

Se ha reportado que al administrar en forma simultánea piroxicam 10mg/ml y una dosis de etanol de 5g/kg de peso, se observa una disminución en los niveles de etanol en sangre, una disminución en la formación de triacilglicéridos, y una disminución en las concentraciones de MDA como índice de lipoperoxidación hepática (Zentella y cols. 1992).

En este trabajo, al ser administrarse el piroxicam en forma simultánea con el etanol, revierte las concentraciones de GSH y GSSG en sangre total, a las 4 y 8 horas posteriores a la intoxicación etílica aguda, y con esto se recupera la tasa GSH/GSSG. El etanol disminuye la concentración de GSH, mientras que al administrar de manera simultánea el piroxicam, la concentración observada no es diferente al control. El etanol desencadena un aumento de GSSG y de igual manera al administrar el etanol y el piroxicam simultáneamente, la concentración de GSSG observada no es distinta a la del grupo control.

Se ha reportado que algunos antiinflamatorios no esteroideos, entre ellos el piroxicam, inhiben la activación de neutrófilos como respuesta a un proceso inflamatorio (Abramson y cols. 1984), los cuales son importantes generadores de radicales superóxido en el organismo. Si el piroxicam actúa inhibiendo el aumento en la poza de radicales libres como el anión superóxido (Kaplan y cols. 1984), una

---

hipótesis plausible es que por esto, no decaiga la concentración de GSH, ni aumente la del GSSG, así como no se vea alterada la relación GSH/GSSG debido a que la poza tisular de radicales libres no sea alterada.

A las 4 y 8 horas postintoxicación, el piroxicam *per se*, provoca también una baja de los niveles de GSH, no siendo evidente el efecto sobre el GSSG. Micheli (1992) reporta variaciones en el contenido de GSH hepático y estomacal debido a la acción de diferentes AINES, entre ellos el piroxicam, situación que probablemente sea semejante en sangre, pero el mecanismo molecular aún no es claro.

La disminución en las concentraciones de GSH observada en sangre total cuando se ha administrado el piroxicam, podría estar relacionada con un efecto semejante al que se observa en hígado cuando se administra piroxicam (Zentella y cols. 1994). El descenso del GSH en sangre cuando se administran algunos compuestos como el acetaminofen y el dietil malato, Adams y cols. (1983) lo describen como una disminución en el flujo de GSH del hígado y de otros órganos hacia la sangre.

Con respecto a las variaciones temporales observadas en las concentraciones de GT en los grupos controles, lo que indica es la probable existencia de un ritmo circádico de glutatión reducido en sangre, como resultado del ritmo circádico reportado en hígado: la concentración de glutatión y la actividad de la enzima glutatión transferasa en hígado, presentan una variación diurna con un máximo durante el periodo de luz y un mínimo durante la noche (Tuñón y cols. 1992). Lo encontrado en sangre muestra que el periodo de máxima concentración de glutatión, es probablemente durante la noche, periodo que coincide con la máxima actividad en los roedores, posiblemente por su requerimiento durante el periodo de vigilia.

---

## **Hemoglobina**

El alcoholismo crónico esta asociado con algunas anormalidades sobre las células rojas, las plaquetas y las células blancas. Dentro de estas alteraciones hematológicas se encuentran alteraciones en el metabolismo del hierro (deficiencia) y del ácido fólico en eritrocitos y por lo tanto anemias (Eichner, 1976). Asimismo se ha comprobado que existe un aumento en la formación de aductos entre el acetaldehído y proteínas (Lin 1988) como la hemoglobina (Stevens y cols. 1981).

Kanwar (1992) ha reportado recientemente, fluctuaciones hematológicas provocadas por una administración crónica de etanol en ratas (2ml/día durante 10 a 20 semanas), observándose una caída en los valores del hematocrito y de la hemoglobina, así como un aumento significativo en la cantidad absoluta de neutrófilos, sin embargo pocos reportes hacen referencia a las alteraciones desencadenadas sobre las concentraciones de la hemoglobina posteriores a una ingesta aguda de etanol.

La hemoglobina es altamente susceptible a la autooxidación. El etanol puede producir aniones superóxido y oxidar a la hemoglobina bajo los siguientes reacciones (Fig. 26). La desoxihemoglobina al combinarse con el oxígeno molecular se transforma en oxihemoglobina. La oxihemoglobina es oxidada a metahemoglobina y se supone el paso por un estado de transición (ferril), el cual estimula la lipoperoxidación y por otra parte es a su vez generador de radicales superóxido. El radical superóxido es dismutado a peróxido de hidrógeno por la enzima SOD, sin embargo cuando se provoca un exceso en la cantidad de  $H_2O_2$  en relación con la hemoglobina, hay una degradación del grupo hemo lo que promueve a una liberación del ión hierro que por medio de la reacción de Fenton (Fig.9) inicia la formación de

radical hidroxilo y este radical provoca daño a tejidos o moléculas directamente o estimula también la lipoperoxidación.

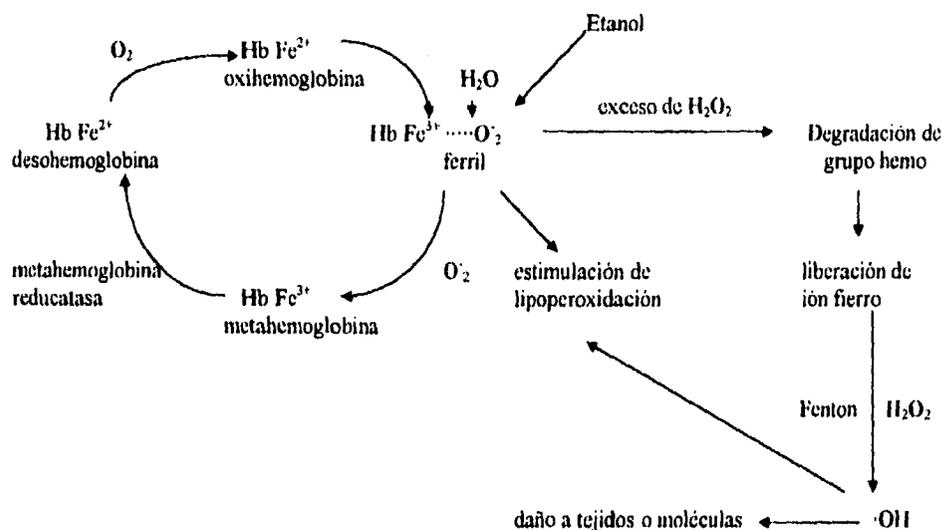


Fig. 26 Autooxidación de la hemoglobina  
 Modificado de: Methods in Enzymology. Paker, L. and Glazer, A. 1990 y de:  
 Decompartamentalised iron, microbleeding and membrane oxidation. Rice-Evans 1990. Free  
 Radicals, Lipoproteins.

En el eritrocito, por ejemplo, existe un balance normal entre la formación espontánea de metahemoglobina y radicales superóxido, y la restauración de esta hemoglobina oxidada a su estado normal funcional, esta controlada por defensas antioxidantes.

Se sabe que la exposición de eritrocitos intactos a un estrés oxidativo extracelular, con oxígeno, induce, *in vitro*, a oxidación de grandes cantidades de oxihemoglobina intracelular y muy poca peroxidación membranal (Rice-Evans 1990).

---

Lo observado en este trabajo indica que bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por una intoxicación aguda con etanol, los niveles de oxihemoglobina disminuyen aproximadamente en un 15% con respecto al control, a las 4 horas posteriores, probablemente transformándose a metahemoglobina y de esta manera sirviendo como un sumidero de radicales libres, protegiendo a la membrana del eritrocito del ataque de radicales generados durante el metabolismo del etanol.

Esta observación apoya el papel de la hemoglobina como un interceptor en el daño oxidativo a la membrana de eritrocitos expuestos a radicales del oxígeno, en otras palabras el mecanismo de propagación oxidativa en la membrana de estas células podría estar balanceada por la oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina dentro del eritrocito (Fig. 26) y su capacidad de actuar como un sumidero oxidante (Rice-Evans, 1990).

La administración simultánea del etanol y del piroxicam restaura los niveles de oxihemoglobina controles, de tal manera que el piroxicam actúa probablemente en el proceso de mantenimiento de las defensas antioxidantes al mantener baja la generación de radicales libres.

Durante las 16 horas posteriores a la intoxicación parece existir una disminución en la concentración de oxihemoglobina con respecto al tiempo en el grupo control y en el resto de los grupos experimentales, sin embargo se hizo cuantificación del hematocrito y con esto se comprobó que esta disminución es debida al sangrado al que fueron sometidos los animales (1.62% referido al 6.5% de sangre total por peso corporal). El hematocrito no fue alterado en ningún caso.

---

## **Glucosa**

La administración de etanol tiene efectos diferentes cuando se trata de individuos alimentados o en ayuno. Está bien establecido que el etanol induce hipoglucemia en ratas ayunadas durante 48 horas (Krebs y cols. 1969; Forsander y cols. 1965) y en humanos (Kreisberg y cols. 1971; Field y cols. 1963). La hipoglucemia observada resulta de una disminución en la tasa citoplasmática libre de [NAD<sup>+</sup>] a [NADH] lo cual se debe a la oxidación del etanol por la alcohol y la aldehído deshidrogenas (Krebs y cols. 1969).

Este cambio en el estado redox disminuye la concentración de piruvato y de otros intermediarios gluconeogénicos (Krebs y cols. 1969; Guynn y Pieklik, 1975), y la inhibición de la gluconeogénesis de sustratos como el lactato (Krebs y cols. 1969; Kreisberg y cols. 1971; Puhakainen y cols. 1991), el glicerol (Krebs y cols. 1969; Puhakainen y cols. 1991) y aminoácidos gluconeogénicos (Krebs y cols. 1969). Por lo tanto el etanol disminuye la glucólisis hepática como resultado de una inhibición en la actividad de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que se encuentra sujeta al aumento del estado redox (NADH/NAD) en el citosol.

Por otro lado en estudios con animales bajo alimentación continua (Forsander y cols. 1965 y Dittmar y Hetenyi 1978) o en humanos (Kreisberg y cols. 1971; Field y cols. 1963), el etanol no produce hipoglucemia. Los datos que estudian el mecanismo por el cual la hipoglucemia es prevenida, son aún controversiales. *In vivo* el etanol inhibe la utilización de glucosa durante la estimulación con insulina en perros (Lochner y cols 1967) y en humanos (Yki-Järvi 1985). Para explicar la ausencia del efecto hipoglucémico del etanol en el estado alimentado, se ha propuesto que debido a la

---

---

inhibición de la gluconeogénesis por el etanol, esto pueda ser compensado por un aumento en la glucogenólisis hepática por activación de la fosforilasa, mediada por la liberación de las catecolaminas, y de esta manera no resultar alterados los niveles de glucosa en el organismo (Kubota y cols.1992). A pesar de los datos aportados, el mecanismo por el cual la glucogenólisis se ve estimulada por el etanol no ha sido aún esclarecida.

Se ha establecido también de manera muy clara que en animales alimentados, la ingesta de una carga aguda de etanol (entre 2 a 5 g/kg de peso), no solo se inhibe la gluconeogénesis y se estimula la glucogenólisis hepática compensando los niveles de glucosa disminuída, sino que ocurre la aparición de una marcada hiperglucemia acompañada de hipotermia (Souza y Masur 1981), estableciendo una relación directamente proporcional entre la hiperglucemia y la hipotermia y una correlación genética entre estos indicadores (Risinger y Cunningham, 1991).

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que existe un aumento en la glucosa sanguínea desde las 4 hasta las 12 horas posteriores a una intoxicación con etanol en dosis de 5g/kg de peso. Este aumento es estadísticamente significativo a las 4 y a las 12 horas. Esto apoya la hipótesis de que bajo alimentación continua, el etanol en la dosis administrada, provoca hiperglucemia probablemente debido a la estimulación de la glucogenólisis en hígado.

Cuando el piroxicam es administrado en forma simultánea con el etanol, no se observa una modificación adicional en los valores de la glucosa sanguínea, durante el curso temporal del experimento, lo que indica que el antiinflamatorio administrado no influye en los procesos relacionados con el metabolismo de la glucosa bajo una intoxicación etílica aguda.

---

### **Enzimas Glutámico oxalacética y Glutámico pirúvica**

Los aumentos en la actividad de algunas enzimas séricas han sido propuestas como indicadores de daño hepatocelular. La medición de la actividad sérica de la aminotransferasa aspártica (AST o SGOT) y de la alanino aminotrasferasa (ALT o SGPT) son las mas utilizadas.

Estas enzimas catalizan la transferencia de los grupos  $\alpha$ -amino del aspartato y alanina, respectivamente, a los grupos  $\alpha$ -ceto y cetoglutarato, a la formación de ácido oxalacético y ácido pirúvico. En contraste con la SGPT, la cual se encuentra principalmente en el hígado, la SGOT esta presente en muchos tejidos incluyendo el corazón, músculo esquelético, riñón y cerebro, por lo que resulta menos específica como indicador de daño hepático.

La fuente de GOT y GPT en el suero de una persona normal (menos de 40 UI), no es claro y los mecanismos responsables para su desaparición son inciertos. En el hepatocito la GPT se encuentra exclusivamente en el citosol, mientras que existen diferentes isoenzimas de GOT en mitocondrias y citosol.

Niveles elevados de estas enzimas pueden observarse también en una variedad de alteraciones no hepáticas. Sin embargo, comunmente la actividad de estas enzimas se incrementa en alteraciones hepáticas. Altos niveles se han encontrado en asociación con condiciones de intensa necrosis hepática, como una hepatitis viral severa o un daño hepático inducido por toxinas. Incrementos menores se han encontrado en leves hepatitis agudas virales y en enfermedades crónicas como hepatitis activa, cirrosis y metástasis hepática.

---

Es notable que en hepatitis alcohólica sea común encontrar incrementada la actividad de estas enzimas. Del Villano y cols. (1979), reporta un marcado aumento aproximadamente de un 120% en la concentración de la GOT en pacientes alcohólicos.

En general los niveles de GOT y GPT son paralelos, con una excepción: en hepatitis alcohólica la tasa GOT/GPT puede ser mayor de 2. Esto parece resultar de una disminución en el contenido hepático de GPT debido a la deficiencia del cofactor piridoxina 5-fosfato.

Este trabajo muestra que bajo las condiciones experimentales empleadas, una intoxicación etílica aguda de 5g/kg peso corporal, provoca un aumento en la presencia sérica de ambas enzimas.

El aumento del 23% observado a las 4 horas del tratamiento, en la cantidad de la enzima GOT en el grupo tratado con etanol (ver Cuadro V) y el aumento del 30% en la concentración de la GPT también en el grupo tratado con etanol (ver Cuadro VI) refleja un probable daño hepático provocado por la dosis relativamente alta de etanol administrada. Existe reportado en la literatura que una dosis de tal magnitud, 5g/kg de peso corporal, provoca un aumento en la actividad sanguínea de la GOT aproximadamente de un 128% a las 2 horas de la intoxicación etílica y un aumento casi del 200% a las 4 horas y un aumento en la actividad de la GPT del 22% a las dos horas y del 77% a las 4 horas de la intoxicación etílica (Koçak-Toker y cols.1985), sin embargo este estudio fue hecho en ratas ayunadas, siendo probablemente por esto, un daño hepático manifiesto mucho mas marcado.

Ikatsu y cols., (1991), reportan una aumento del 25% en la actividad de la GOT y un aumento en la actividad de la GPT del 28% cuando se administra una dosis de etanol de 1-5g/kg de peso.

---

En ambos reportes se deduce un daño hepático provocado por el etanol en esa dosis, esto se apoya con los estudios de Ikatsu y colaboradores (1991), sobre la GSH transferasa hepática y plasmática puesto que encuentran una disminución de la actividad de la GSH transferasa hepática, lo cual consideran como resultado de la liberación de esta enzima al plasma, provocado, de igual manera, por daño hepático.

El aumento observado en el grupo G+P para la GOT se explica debido a que algunos antiinflamatorios por si solos aumentan la actividad de estas enzimas en la sangre y esto esta relacionado con la vida media de cada antiinflamatorio y su permanencia en la circulación. La liberación de la enzima GOT hacia plasma, como ya se mencionó, no es específica de daño hepático, existe liberación de ésta también en infarto al miocardio y en daño a músculo esquelético por lo que con base en esta información no se puede concluir que un aumento en su actividad en suero sea debida exclusivamente a un daño hepático.

Al ser administrado el piroxicam de manera simultánea con el etanol, no se observa cambio para ninguna de las dos enzimas, es decir, no existe una acción por parte del antiinflamatorio para modificar la liberación de estas enzimas al plasma. Tanto para la GOT como para la GPT permanece aumentada su presencia hasta las 16 horas posteriores al tratamiento con etanol, siendo este aumento más evidente para la GOT.

---

## Referencias Bibliográficas

- ◆ Abdulla, A., Badaway, B. 1978. "The metabolism of Alcohol" *Clin. Endocr. Metab.* 7:2.
- ◆ Abramson, S.; Edelson, H.; Kaplan, H.; Ludewin, R.; Weissman G. 1984. Inhibition of neutrophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 77:3-6.
- ◆ Adams, J.; Lauterburg, B. y Mitchell J. 1983. Plasma glutathione and glutathione disulfides in the rat: Regulation and response to oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 227: 3.
- ◆ Akerboom T. y Sies, H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth Enzymol.* 77:373-382.
- ◆ Akinshola, B.E.; Potter, J.J.; Mezey E. 1991. Ethanol increases the formation of NADPH in rat hepatocytes. *Hepatology* 13: 509-514.
- ◆ Albano, E., Tomasi, A., Goria-Gatti, L. y Dianzani, M.U. 1988. Spin trapping of free radicals species produced during the microsomal metabolism of ethanol. *Chem. Biol. Interact.* 65:223.
- ◆ Behrens, B.J.; Hoerner, M.; Lasker, J.M. y Lieber, C.S. 1988. Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P450IIE1 *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154:584-590.
- ◆ Bhatthacharya, S.K.; Robson, J.S.; Stewart, C.P. 1955. The determination of glutathione in blood and tissues. *Biochem. J.* 60: 696-702 .
- ◆ Boveris A.; Fraga C.; Varsavsky A.; Koch O. 1983. Increased Chemiluminescence and Superoxide Production in the Liver of Chronically Ethanol-treated Rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: (2) 534-541.

- 
- ◆ Boyland, E. y Chassecaud, L.F. 1976. Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem. J.* 104:95-102.
  - ◆ Brigelius, R.; Mockel, C.; Akerboom T.P.M. y Sies H. 1983. Identification and Quantification of glutathione in hepatic protein Mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem. Pharmacol.* 32: 2529-2534.
  - ◆ Brogden R.N; Heel, R.C.; Speight, T.M. y Avery, G.S. 1981. Piroxicam: a review of its pharmacological proprieties and therapeutic efficacy. *Drugs* 22: 165-187.
  - ◆ Cederbaum, A. I., y Rubin, E. 1975. Molecular Injury to Mythochondria Produced by Ethanol and Acetaldehyde. *Fed.Procced.* 34:11.
  - ◆ Cederbaum, A. Y. y Dicker, E. 1983. Inhibition of microsomal oxidation of alcohols and hydroxyradical-scavenging agents by the iron-chelating agent desferrioxamine. *Biochem. J.*, 210:107.
  - ◆ Cederbaum, A.I.; Miwa, G.; Cohen, G. y Lu, A.Y.H. 1979. Production of hydroxyl systems containing cytochrome P<sub>450</sub> purified from phenobarbital-trated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91:747.
  - ◆ Comporti, M. y Benedetti, A. 1985. Biology of Disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 53:599-623.
  - ◆ Comporti, M., Hartman, A. y Di Luzio, N. R. 1967. Effect on "in vivo" and "in vitro" ethanol administration on liver lipid peroxidation. *Lab. Invest.* 16:616.
  - ◆ Comporti, M., Saccocci, C y Dianzani, M.U. 1965. Effect of CCl<sub>4</sub> in vitro and in vivo on lipid peroxidation on rat liver homogenates and subcellular fractions. *Enzymol.* 29:185.
  - ◆ Costagliola C. 1990. Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients: In vivo and in vitro study. *Clin. Physiol. Biochem.* 8:204-210.

- 
- ◆ Denney R. 1984. Nutrition, alcohol and drug abuse. *Proc. Nutr. Soc.* 43:265-270.
  - ◆ Díaz Belmont, P.A.; Zentella de Piña, M.; Rodríguez, L y Piña E.1990. En: *Clin. Res* 38: 533.
  - ◆ Di Luzio N.R., Steege T.E. 1976. The role of ethanol metabolites in hepatic lipid peroxidation. En Fisher MM. Ronkin JG, Eds. Alcohol and the Liver, Nueva York: Plenum Press, 45-59.
  - ◆ Di Luzio, N.R. y Costales, F. 1964. Inhibition of the ethanol and carbon tetrachloride-induced fatty liver by antioxidants. *Exp. Molec. Pathol.*, 4:141.
  - ◆ Di Luzio, N.R., 1966. A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification on liver lipid peroxidation. *Lab. Invest.* 15:50-63
  - ◆ Dittmar, EA; y Hetenyi G. 1978. The effect of ethanol on glucose homeostasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56:54-61.
  - ◆ Donohue, T.M.; Tuma, D.J. y Sorrell, M.F. 1983. Acetaldehyde adducts with proteins; binding of [<sup>14</sup>C] acetaldehyde to serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 220:239-246.
  - ◆ Eichner, E. 1976. The hematological disorders of alcoholism. *Am. J. Med.* 54: 621-628.
  - ◆ Ekstrom, G., Chroholm, T. y Ingelman-Sundberg M.1986. Hydroxyl-radical production and ethanol oxidation by liver microsomes isolated from ethanol-treated rats. *Biochem. J.* 233:755.
  - ◆ Fernández, V., Videla, L.A. 1981. Effects of acute and chronic ethanol ingestion on the content of reduced glutathione of various tissues of the rat. *Experientia* 37: 392-394.

- 
- ◆ Fernández, V.; Fernández N.; Valenzuela, A. y Videla L.A. 1983. Time course study on the changes in blood glutathione by acute ethanol intoxication in the rat. *Experientia* 39:880-882.
  - ◆ Field, JR; Willians, HE y Mortimore GE. 1963. Studies on the mechanism of ethanol-induced hypoglycemia. *J. Clin. Invest.* 42:497-506.
  - ◆ Finkelstein, E.; Rosen, G.M. y Rauckman, E.J. 1980. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* 200:1
  - ◆ Forsander, O.; Rähä, M.; Salaspuro M. y Mäenpää, P. 1965. Influence of ethanol on the liver metabolism of fed and starved rats. *Biochem. J.* 94:259-265.
  - ◆ Guerri, C. y Grisolia, S. 1982. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13:53.
  - ◆ Guynn, RW y Pieklik, JR. 1975. Dependence on dose of the acute effects of ethanol on liver metabolism *in vivo*. *J Clin. Invest.* 56:1411-1419.
  - ◆ Halliwell, B. 1987. Oxidants and Human disease: some new concepts. *FASEB lett.* 1:358-364.
  - ◆ Halliwell, B. y Gutteridge J.M.C. 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*. Second edition. Clarendon Press Oxford. 543pp.
  - ◆ Halliwell, B. y Gutteridge J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *En: Meth. Enzymol.* 186:1-85.
  - ◆ Hoek, J.B.; Thomas, P.A.; Rooney, T.A.; Higashi, K. y Rubin, E. 1992. Ethanol and signal transduction in the liver. *FASEB J.* 6:2386-2396.
  - ◆ Ikatsu, H.; Okino, T. y Nakajima, T. 1991. Ethanol and food deprivation induced enhancement of hepatotoxicity in rats given carbon tetrachloride at low concentration. *Brit. J. Indus. Med.* 48: 636-642.

- 
- ◆ Israel, Y., Videla, L., Bernstein. 1979. Liver Hypermetabolic state after chronic ethanol consumption: Hormonal interrelations and pathogenic implications. *Alcohol and the Blood. Brit. J. Haematol.* 42: 333-336.
  - ◆ Kanwar, K.C y Tikoo, A. 1992. Hematological lesions in rat following heavy alcohol ingestion. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 11: (4)241-245.
  - ◆ Kaplan H. B.; Edelson, H; Korchak, M; Given, W; Abramson, S y Wissmann G. 1984. Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents of human neutrophil functions *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* 33: (3) 371-378.
  - ◆ Klein, S.M.; Cohen, G.; Lieber, C.S. y Cederbaum, A.I. 1983. Increased microsomal oxidation of hydroxyl radical scavenging agents and ethanol after chronic consumption of ethanol. *Arch. Biochem. Biophys.* 233:245.
  - ◆ Koçat-Toker N.; Uysal, M.; Aykaç G.; Sivas, A.; Yalçın, S. y Öz, H. 1985. Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in the rat. *Pharmacol. Res. Com.* 17: (3) 123-126.
  - ◆ Kosower, N.S. 1978. The glutathione status of cells. *Inter. Rev. Cytol.* Academic Press, inc. 54: 109-153
  - ◆ Krebs, H.A.; Freeland, R.A.; Hems, R. Stubbs. M. 1969. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol *Biochem. J.* 112:117-124.
  - ◆ Kreisberg, R.A.; Siegal, A. M.; y Owen, W. 1971. Glucose-lactate interrelationships: Effect of ethanol. *J. Clin. Invest.* 50:175-185
  - ◆ Kretschmar, M; Reinhardt, D; Schlechtweg, J; Machnik, G; Klinger, W; Schirmeister W. 1992. Glutathione homeostasis in rats chronically treated with ethanol. Evidence for an increased hepatic GSH export *in vivo*. *Exp. Toxic. Pathol.* 44:344-348.

- 
- ◆ Kubota, M.; Virkamäki, A.; Yki-Järvinen, H. 1992. Ethanol Stimulates Glycogenolysis in liver from fed rats. *P.S.E.B.M.* 201:114-118.
  - ◆ Lai, C.S. y Piette, L. H. 1977. Hydroxyl radical production involved lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78:51.
  - ◆ Lange, L.G. 1991. Mechanism of fatty acid ethyl ester formation and biological significance. *Ann. Acad. Sci.* 624:802-805.
  - ◆ Lauterburg, B.H.; Smith, C.V.; Hughes H. y Mitchell, J. R. 1984. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*.1.4: (4) 586-590.
  - ◆ Lehninger, A. L. 1975. Oxidative phosphorylation, mitochondrial structure and the compartamentation of respiratory metabolism. *Biochemistry*. Segunda Edición. Worth. N.Y. 167-189
  - ◆ Lieber, CS. 1991a. Hepatic, metabolism and toxic effects of ethanol: 1991 Update. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* Vol. 15 No. 4 pp 573-591.
  - ◆ Lieber, CS. 1991b. Pathways of ethanol metabolism and related pathology. En Alcoholism: A molecular perspective. Ed. por T.N. Palmer, Plenum Press. N.Y.
  - ◆ Lieber, CS.; Baraona, E.; Hernández-Muñoz, R.; Kubota, S.; Sato, S.; Kawano, S.; Matsumura, T, y Inatomi, N. 1989. Impaired oxygen utilization: A new mechanism for the hepatotoxicity of ethanol in subhuman primates. *J. Clin. Invest.* 83:1682-1690.
  - ◆ Lin, RS. 1988. Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically. *J. Clin. Invest.* 81: 615-619.
  - ◆ Lochner, A.; Wulff, J. y Madison, L. 1967. Ethanol-induced hypoglycemia. The acute effects of ethanol on hepatic glucose output and peripheral glucose utilization in fasted dogs. *Metabolism.* 16: 1-18.

- 
- ◆ Mallery, S.R. y Laufman, H.B. 1991. Association of cellular thiol redox status with mytogen-induced calcium metabolization and cell cycle progression in human fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 45:82-92.
  - ◆ McDonald, C. M.; Dow, J. y Moore, M.R. 1977. *Biochem., Pharmacol.* 26:1529-1531.
  - ◆ Meister, A.. 1975. Biochemistry of Glutathione. En: Metabolism of Sulfur Compounds. De. D. M. Greenger pp.101-88. Nueva York: Academic Press.
  - ◆ Meister. A. y Suresh A. 1976. Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds. Biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.* 559-604.
  - ◆ Meister, A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Sc* 220-472
  - ◆ Micheli, L.; Fiaschi, A.; Giorgi, G.; y Cerretani, D. 1992. Modulation of glutathione levels by non steroidal antiinflammatory drugs. *Pharmacol. Res.* 25: 45-47
  - ◆ Nomura, F., Lieber CS. 1987. Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes: Enhancement after chronic alcohol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 131-137.
  - ◆ Nordmann R.; Ribière, C. y Rouach H. 1992. Implication of free radical mechanism in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad. Biol. Med.* 12: 219-240.
  - ◆ Ohnishi, K. y Lieber, C.S. 1978. Respective role of superoxide and hydroxyl-radical in the activity of the reconstituted microsomal ethanol-oxidizing system. *Arch. Biochem. Biophys.* 191:798.
  - ◆ Parker, L. y Glazer, A. 1990. *Methods in enzymolgy.* 186:265
  - ◆ Plummer, J. L.; Smith, B.R.; Sies, H. y Bend, J.R. 1981. Chemical Depletation of Glutathione *in vivo*. *Meth. Enzymol.* 77:50-59.

- 
- ◆ Potter, D., Tran T. 1993. Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120: 186-192.
  - ◆ Preedy VR, Duane P, Peters TJ. 1988. Biological effects of chronic ethanol consumption: A reappraisal of the Lieber-DeCarli liquid-diet model with reference to skeletal muscle. *Alcohol* 23:151-154.
  - ◆ Puhakainen. Y; Koivisto, VA;y Yki-Järvi, H. 1991. No reduction in total hepatic glucose output by inhibition of gluconeogenesis with ethanol in NIDDM patients. *Diabetes* 40:1319-1327.
  - ◆ Recknagel, F.O. y Ghoshal, A.K. 1966. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.* 15:132.
  - ◆ Reinke, L.A.; ;Lai, E.K.; Dubose, C.M. y McCay, P.B. 1987. Reactive free radical generation *in vivo* in heart and liver of ethanol-fed rats: Correlation with radical formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:9223-9227.
  - ◆ Reinke, L.A.; Towner R.A. y Janzen, E.G. 1992. Spin trapping of free radical metabolites of carbon tetrachloride *in vitro* an *in vivo*: Effect of acute ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112:17-23.
  - ◆ Rice-Evans, C. 1990. Decompartmentalised iron, microbleeding and membran oxidation. En: Free radicals, Lipoproteins and Membrane Lipids. Press, Nueva York.
  - ◆ Risinger y Cunningham, 1991, F. 1991. The relationship between ethanol-induced hyperglycemia and hypothermia: evidence of genetic correlation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15:730-733.
  - ◆ Ross, D.; Albano, E.; Nilsson, U. y Moldéus, P. 1984. Thyil radicals formation during peroxidase-catalysed metabolism of acetaminophen in the presence of thiols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125:109.

- 
- ◆ Roubal, W. T. y Tappel, A. L. 1966. Polymerization of protein produced by free-radical lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 113:150.
  - ◆ Rubin, E., Lieber, SC. 1981. Ethanol metabolism in the liver. *Progress in liver diseases*. H. Popper y F Schaffner (eds). Gune and Stratton. N. Y.
  - ◆ Sagone, A.L.; Husney, R. M. 1987. Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: Evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems. *J. Immunol.* 138:2177-2183.
  - ◆ Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1992. La salud pública en México. México.
  - ◆ Shaw, S. 1981. Hepatic lipid peroxidation: Potentiation by chronic alcohol feeding and attenuation by methionine. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 417-425.
  - ◆ Sies, H. 1985. Oxidative stress Academic Press Londres y Nueva York.
  - ◆ Sillanaukee, P., Seppa, K., Koivula, T., Israel, Y., Niemela, O. 1992. Acetaldehyde-modified hemoglobin as a marker of alcohol consumption: comparison of two methods. *J. Lab. Clin. Med.* 120:42-47.
  - ◆ Smith, J.E. 1974. A relationship of *in vivo* erythrocyte glutathione efflux to the oxidized glutathione transport system. *J. Lab. Clin. Med.* 83:444-450.
  - ◆ Southorn, P.A. 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Clin. Proc.* 63: 381-389.
  - ◆ Souza, M. y Masur, J 1981. Blood glucose and body temperature alterations induced by ethanol in rats submitted to different levels of food deprivation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15:551-554.
  - ◆ Speisky A.; McDonald, A.; Giles, G.; Orrego, H. y Israel, Y. 1985. Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem. J.* 255: 565-572.

- 
- ◆ Srivastava, S.K.; Beutler E. 1969. The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes. *J. Biol. Chem* 244:9-15.
  - ◆ Stevens, V.J.; Fantl, W.; Newman, C. 1981. Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J. Clin. Invest.* 67:361-369.
  - ◆ Tateishi, N.; Higashi, T.; Shinya, S.; y Sakamoto, Y. 1974. Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J. Biochem. (Tokio)* 75-93. En: Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine 1989. 1: 91-93
  - ◆ Theorell, H. y Yonetani, T. 1963. *Biochem.* 338:537-553.
  - ◆ Tuñón, M.J.; González, P.; López, P.; Salido, GM. y Madrid, JA. 1992. Circadian Rhythms in glutathione and glutathione-S transferase activity of rat liver. *Arch. Physiol. Biochem. Biophys.* 100: 83-87.
  - ◆ Van Der Werf, P.; Orłowski, M. y Meister, A. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2982-2985.
  - ◆ Vendemiale, G.; Altomare, E.; Grattagliano, Y.; Albano, O. 1989. Increased plasma levels of glutathione and malondialdehyde after acute ethanol ingestion in humans. *J. Hepatol.* 9: 359-365.
  - ◆ Videla, L.A.; Fernández, V.; Ugarte, G. y Valenzuela, A. 1980. Effect of ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in relation of its lipoperoxidative capacity in the rat. *Febs lett.* 111:(1) 361-369.
  - ◆ Villano, B.del; Tishfield, J.A; Schacter, L.; Stilwil, D. y Miller, S. 1979. Cupro-Zinc Superoxide Dismutase: A Possible biologic marker for alcoholism. (Studies in black patients). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 3 : (4)291-296
  - ◆ Wefers, H. y Sies, H. 1983. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur. J. Biochem.* 137, 29.

- 
- ◆ Wilson JS, Korsten MA, Leo MA, Lieber CS. 1986. The combined effects of protein deficiency and chronic ethanol administration on rat ethanol metabolism. *Hepatology*. 6:823-829
  - ◆ Winterbour, C. 1990. Oxidative Reactions of Hemoglobin. *En: Meth. Enzymol.* 186 : 265-272.
  - ◆ Yki-Järvi, H y Nikkilä EA. 1985. Ethanol decreases glucose utilization in healthy man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61:941-945.
  - ◆ Zentella de Piña, M., Hernández-Tobías, A., Saldaña-Balmori, Y., Díaz-Belmont, A., y Piña E. 1992. Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Febs lett.* 298: 123-125.
  - ◆ Zentella de Piña, M.; Saldaña Balmori, Y.; Hernández Tobias, A. y Piña E. 1993. Non steroidal antiinflammatory drugs lower ethanol mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: (6)123-125.
  - ◆ Zentella de Piña, M.; Corona, S.; Rocha Hernández, A.E.; Saldaña Balmori, Y.; Cabrera, G. y Piña, E. 1994. Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decrease by acute ethanol intoxication. *Li. Sci.* 54: (19) 1433-1439.
  - ◆ Ziegler, D.M. 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 305-329.