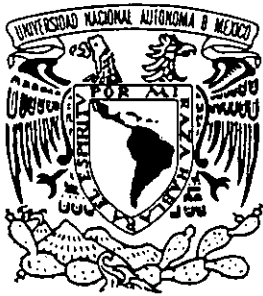


84
CEJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**INHIBICION DE LA LIPOLISIS POR NAPROXEN
EN ADIPOCITOS AISLADOS EN RATAS**

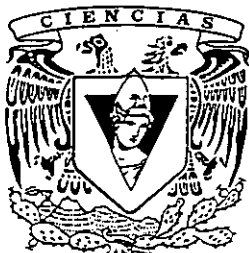
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
GUADALUPE PIÑA ZENTELLA

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. **HECTOR RIVEROS-ROSAS**

MEXICO, D.F.

27/9/99



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1999

**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 Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:


INHIBICION DE LA LIPOLISIS POR NAPROXENO EN ADIPOCITOS AISLADOS DE RATA.

realizado por Guadalupe Piña Zentella

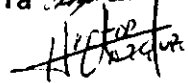
con número de cuenta 9150665-6 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis M. en C. Héctor Riveros-Rosas 
Propietario

Propietario Biol. Virginia Esmeralda Urbieta Ubilla 

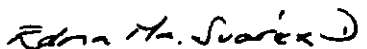
Propietario Biol. Héctor Vázquez Meza 

Suplente Biol. Ma. Esther Rubio Ruíz 

Suplente M. en C. Martha Zentella Mayer 

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Ciudad Universitaria

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-210094-96 de DGAPA.

DEDICATORIAS

A mi madre, por ser mi mejor amiga

A mi esposo, porque su presencia me basta para ser feliz

A mi padre, por haberme enseñado a vivir la vida intensamente

A mis hermanos, por ser tan distintos a mi y por lo mismo haber complementado mi vida con tanto cariño

A mi abuela, por ser la mujer que más admiro

A mi familia política, de forma muy especial a mi suegra, por hacerme sentir su hija.

A mis hijos, a quienes espero poder transmitir todo el cariño y el amor con los que yo siempre he vivido.

Agradezco el apoyo de todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A Enrique Moreno por su apoyo técnico

A los sinodales por tomarse la molestia de leer la tesis varias veces

A Yolanda Saldaña por sus correcciones

A Héctor Riveros-Rosas por sus comentarios y recomendaciones

A Héctor Vázquez por todo lo que aprendí conviviendo con él

“Hay un tiempo para cada cosa, y un momento para hacerla bajo el cielo:

Hay tiempo de nacer y tiempo para morir; tiempo para plantar, y tiempo para arrancar lo plantado.

Un tiempo para dar muerte, y un tiempo para sanar; un tiempo para destruir y un tiempo para construir.”

Eclesiastes 3:1-3

INDICE

I. ABREVIATURAS

II. RESUMEN

1. ANTECEDENTES

1.1. Los lípidos

1.1.1. Química

1.1.2. Importancia

1.1.3. Digestión y absorción

1.1.4. Metabolismo: el caso de los triacilglicéridos

1.1.4.1. Lipogénesis

1.1.4.2. Lipólisis

1.1.4.3. Características relevantes

1.5. Movilización

1.2. El tejido adiposo

1.2.1. Composición

1.2.2. Fisiología

1.2.3. Bioquímica

1.3. Señales hormonales

1.3.1. Catecolaminas

1.3.2. Traducción de la señal dependiente de AMPc

1.4. El etanol

1.4.1. Intoxicación alcohólica experimental

1.5. AINEs: Los antiinflamatorios no esteroideos

1.5.1. Mecanismos de acción

1.5.2. Naproxen

2. INTRODUCCION

2.1. Planteamiento del problema

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Aislamiento de hepatocitos

3.2. Soluciones

3.2.1. Enzimas

3.3. Determinación de la cantidad de glicerol

3.4. Curva estándar de glicerol

3.5. Procedimiento

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de la curva estándar de glicerol

4.2. Obtención de la curva dosis-respuesta de epinefrina

4.3. Obtención de la curva dosis-respuesta de naproxen

4.4. Adipocitos incubados con concentraciones crecientes de epinefrina y una concentración fija de naproxen

4.5. Adipocitos incubados con concentraciones crecientes de naproxen y una concentración fija de epinefrina

5. DISCUSION

6. CONCLUSIONES

7. APENDICE

7.1. Apéndice de material y método

7.2. Apéndice de resultados

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

8.1. Bibliografía citada

8.2. Bibliografía consultada

I. ABREVIATURAS

ACTH	Hormona corticotrópica
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ADH	Deshidrogenasa alcohólica
ADP	Difosfato de adenosina
ALDH	Deshidrogenasa aldehídica
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPC	AMP cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
CO	Ciclooxigenasa
CoA	Coenzima A
COX 1	Ciclooxigenasa tipo 1 (constitutiva)
COX 2	Ciclooxigenasa tipo 2 (inducible)
DE50	Dosis efectiva media
DG	Diacilglicerol
GC	Glicerolcinas
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
G-3-PDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
IP ₃	Trifosfato de inositol
LO	Lipooxigenasa
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
O ₂ ⁻	Anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
-OH	Ion hidroxilo
PUFA	Acido graso insaturado
ROS	Especies reactivas del oxígeno
STH	Somatotrofina
TAG's	Triacilglicéridos
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
TSH	Tirotrofina

II. RESUMEN

El alcoholismo representa un problema de salud pública en México, el 47% de la población total del país ingiere bebidas alcohólicas, mientras que el 5.5% de los mexicanos mayores de 12 años se clasifican como bebedores consuetudinarios (Espinosa, 1995).

Datos previos obtenidos en el laboratorio donde se llevó a cabo esta tesis, indican que los efectos del etanol descritos en el hígado: aumento de triacilglicéridos y de especies reactivas del oxígeno (ROS), se evitan parcialmente cuando se administran simultáneamente con el etanol antiinflamatorios no esteroideos como por ejemplo: aspirina, dipirona, naproxen, nimesulide y piroxicam (Zentella, *et al.* 1992; Zentella, *et al.* 1993). Una de las explicaciones para estos hallazgos es que a dosis altas de etanol (desde de 5g/kg de peso) se desencadena un estrés tóxico mediado por la liberación de catecolaminas, consecuencia del estímulo del tóxico sobre el eje pituitario adrenal. Durante esta liberación de catecolaminas se estimulan entre otras vías metabólicas, la lipólisis en tejido adiposo periférico con la movilización excesiva de ácidos grasos libres hacia el hígado en donde se reesterifican y ocasionan un aumento transitorio de grasas neutras en el hígado conocido como hígado graso. Los antiinflamatorios no esteroideos, en forma particular el piroxicam, ejercen su efecto posiblemente evitando la lipólisis en tejido adiposo y con ello el hígado graso. Para comprobar la posibilidad de que el naproxen comparta este mismo mecanismo de acción para evitar la acumulación de TAG en hígado, se diseñaron experimentos en los cuales se estimulan adipocitos de epidídimo de rata con epinefrina y se incuban con naproxen para ver si se inhibe la lipólisis.

Los resultados indican que el naproxen inhibe solo parcialmente la lipólisis previamente estimulada con epinefrina, a la concentración $1 \times 10^{-4}M$, lo cual explica en parte el control del hígado graso que ejerce el naproxen cuando se administra simultáneamente con el etanol en el animal integro (Zentella, 1993). A diferencia del piroxicam que inhibe la lipólisis a concentraciones bajas, este resultado sugiere que el naproxen ejerce su efecto hepatoprotector a través de un mecanismo distinto al del piroxicam.

1. ANTECEDENTES

1.1 Los lípidos.

La definición de lípidos es operacional y abarca un gran número de compuestos. En bioquímica los lípidos son todas las sustancias extraídas de un organismo por medio de solventes orgánicos, como el éter o el cloroformo.

1.1.1. Química.

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos que no se disuelven en solventes polares como el agua, pero sí en solventes orgánicos no polares como el cloroformo, éter y benceno. Muchos, aunque no todos, contienen ácidos grasos como componentes estructurales principales (Mayes, 1988).

Los lípidos se pueden clasificar en simples y compuestos:

A. Lípidos simples: Están constituidos por ésteres de ácidos grasos con diversos alcoholes.

1. Grasas: Son ésteres de ácidos grasos con glicerol, se les identifica con varias denominaciones como glicéridos, acilglicéridos o triacilglicéridos, siendo esta última la que mejor indica los constituyentes de la molécula. A las grasas en estado líquido a temperatura ambiente se les conoce como aceites.

2. Ceras: Son ésteres de ácidos grasos con alcoholes monohídricos de peso molecular elevado.

B. Lípidos complejos: Son ésteres de ácidos grasos que contienen otros grupos químicos además de un alcohol y del ácido graso.

1. Fosfolípidos: Lípidos que contienen, además de ácidos grasos y un alcohol, un residuo de ácido fosfórico. Con frecuencia tienen bases nitrogenadas u otros sustituyentes:

a. Glicerofosfolípidos: El alcohol es el glicerol.

b. Esfingofosfolípidos: El alcohol es la esfingosina.

2. Glucolípidos (Glucoesfingolípidos): Lípidos que contiene un ácido graso, esfingosina y carbohidratos.

3. Otros lípidos complejos: Lípidos como sulfolípidos y aminolípidos. También las lipoproteínas pueden colocarse en esta categoría.

En el adulto normal y en condiciones de equilibrio energético la ingestión de calorías debe ser igual a su gasto, tomando en cuenta que ésta depende de los siguientes factores:

1. La **tasa metabólica basal**, es el gasto energético necesario para mantener las funciones fisiológicas básicas bajo condiciones estándar.
2. El **efecto termogénico** del alimento, equivale aproximadamente de 5 a 10% del gasto total de energía y se atribuye al gasto energético adicional debido a la digestión.
3. La **actividad física** es la variable mayor que afecta al gasto de energía; hay una diferencia de hasta diez veces el valor basal, entre las condiciones de reposo y la actividad atlética máxima.
4. La **temperatura ambiental**, la cual al ser baja tiende a elevar el gasto energético, ya que aumenta la termogénesis, mientras que a temperaturas ambientales superiores a la de la sangre, se gasta energía extra para enfriar al organismo.

Dependiendo de los factores antes mencionados, la ingestión energética diaria varía mucho para cada individuo. En el siguiente cuadro (cuadro 1) se incluye la ingestión diaria recomendada para varones y para mujeres:

CUADRO 1. Ingestión energética diaria recomendada para mujeres y varones*						
Categoría	Edad (años)	Peso (kg)	Requerimiento energético			
			(kcal)		(MJ)**	
			Media	Límite	Media	Límite
Varones	23-50	70	2,700	2,300-3,100	11.3	9.6-12.9
Mujeres	23-50	55	2000	1,600-2,400	8.4	6.7-10.0
embarazadas			+ 300		9.6	
En lactancia			+500		10.5	

* Tomado de: Herrera, 1986.

** 1 caloría equivale a 4.18 Joules.

La proporción de carbohidratos, lípidos y proteínas ingeridas en la dieta varía ampliamente entre las diferentes poblaciones. En comunidades industrializadas, la ingesta diaria de grasas es de unos 100 g, los cuales aportan del 40-al 45% de las calorías totales de la dieta. Alrededor de un tercio de ellas proviene de la carne, otro tercio de productos grasos propiamente

dichos (aceite, mantequilla, margarina), un quinto de productos lácteos y el resto de una serie de productos manufacturados o naturales como son: frutos secos, chocolates, pastelería, etc. (Herrera, 1986).

Aparte de incrementar el sabor agradable del alimento y de producir una sensación de saciedad, los lípidos con frecuencia, proporcionan una cantidad importante del requerimiento alimentario de energía, si bien algunos estudiosos no la consideran como su función esencial, los lípidos tienen otras dos funciones esenciales en la nutrición de los mamíferos: actúan como vehículo alimentario de las vitaminas liposolubles y suministran ácidos grasos poliinsaturados esenciales, que el cuerpo es incapaz de sintetizar. Se han reconocido a tres ácidos grasos poliinsaturados como esenciales en la alimentación de algunos animales: el ácido linoleico, el ácido α -linolénico y el ácido araquidónico (Mayes, 1988).

En el cuerpo, los lípidos en forma de grasas neutras sirven como una fuente eficiente de energía directa y potencial, cuando están almacenados en el tejido adiposo. Es conveniente recordar que si bien el tejido más rico en lípidos es el adiposo, éstos se encuentran presentes en la totalidad de las células y tejidos del organismo (cuadro 2) (Mayes, 1988).

CUADRO 2. Distribución de los lípidos en diversos tejidos de rata
(% peso seco)*

Tejido	Lípidos totales	Grasa neutra	Fosfolípidos	Cerebrósidos	Colesterol total
Cerebro	54	2	37	8.4	7.0
Corazón	19	3	15	1.4	0.7
Riñón	21	3	15	1.3	1.9
Pulmón	22	5	13	0.9	2.4
Testículo	23	3	14	3.9	1.5
Hígado	20	5	14	0.1	1.0
Timo	19	7	10	1.1	0.8
Bazo	15	3	10	0.8	1.6

* Tomado de: Laguna, J. y Piña, E. 1991.

Los ácidos grasos de los lípidos contienen mayor proporción de enlaces carbono-hidrógeno ricos en energía que los carbohidratos, y en consecuencia poseen más energía química. Como término medio, las grasas rinden 9.3 kcal/g, en comparación con 4.5 kcal /g de los carbohidratos y 4.3 kcal/g de las proteínas. Además como son hidrofóbicas, se aíslan de las moléculas de agua, almacenándose en forma anhidra (Curtis, 1986).

Sirven como aislante térmico en los tejidos subcutáneos y alrededor de ciertos órganos, y los lípidos no polares actúan como aislantes eléctricos que permiten la propagación rápida de las ondas despolarizantes a lo largo de los nervios mielinizados. El contenido de lípidos en el tejido nervioso es particularmente alto (cuadro 2). Los lípidos y lipoproteínas son constituyentes celulares importantes que se encuentran en la membrana celular y en las mitocondrias (Mayes, 1988).

Los triacilglicéridos son particularmente importantes cuando se debe mantener elevada la relación energía/peso, como por ejemplo en las aves migratorias. En un estudio sobre diversas especies de aves migratorias que cruzan el Golfo de México de norte a sur, éstas fueron capturadas después de su vuelo y se compararon sus reservas de grasa con la de las aves no migratorias de las mismas especies. El índice de grasa (cantidad de material graso extraíble con éter por gramo de peso seco de material no graso) estuvo entre 2.5 y 3.5 en las aves previo a su migración comparada con valores entre 0.2 y 0.4 en las aves no migratorias (Palatt, 1982). Los insectos migratorios también dependen de los triacilglicéridos almacenados para mantener el vuelo. Un ejemplo interesante es el saltamontes (*Schistocerca gregaria*), el cual utiliza carbohidratos para los vuelos cortos pero cambia a la utilización de grasas después de la primera hora de vuelo (Palatt, 1982).

Otros animales, en los cuales el acceso a las fuentes de alimentos es irregular, han desarrollado, durante la evolución, regiones especiales de depósito de grasa como la joroba en el camello y la cola en la oveja de cola grasosa. En los mamíferos acuáticos, el tejido adiposo subcutáneo es particularmente extenso y forma el unto, el cual es importante en la termorregulación. Los vertebrados inferiores tienen poca grasa, pero ellos acumulan triacilglicéridos en el hígado (bacalao) o en sus músculos como en los llamados peces “aceitosos”, el salmón, el aranque y la macarela (Palatt, 1982).

1.1.3. Digestión y absorción

La poca hidrosolubilidad de los lípidos presenta problemas para la digestión ya que como sustratos no son fácilmente accesibles a las enzimas digestivas de la fase acuosa. Estos problemas se pueden superar mediante (1) aumento de la interfase entre las fases acuosa y lipídica y (2) solubilización de los productos de hidrólisis con ácidos biliares (Devlin, 1989).

Pueden distinguirse, al menos, cinco fases en la digestión y absorción de los lípidos:

1. Hidrólisis de triacilglicéridos a ácidos grasos libres y monoacilglicéridos.

2. Solubilización de los ácidos grasos libres y monoacilglicéridos por ácidos biliares, y transporte desde la luz del intestino hacia la superficie celular. Las micelas constituyen el vehículo principal para el transporte de lípidos, desde la luz intestinal a la superficie celular en donde tiene lugar la absorción.

3. Captación de ácidos grasos libres y monoacilglicéridos al interior de la célula intestinal donde ocurre la resíntesis de triacilglicéridos.

4. Empaquetamiento de los triacilglicéridos recién sintetizados en partículas de lipoproteína especiales denominados quilomicrones para ser transportadas por los líquidos corporales.

5. Exocitosis de los quilomicrones desde las células y liberación a la linfa (Fig 2).

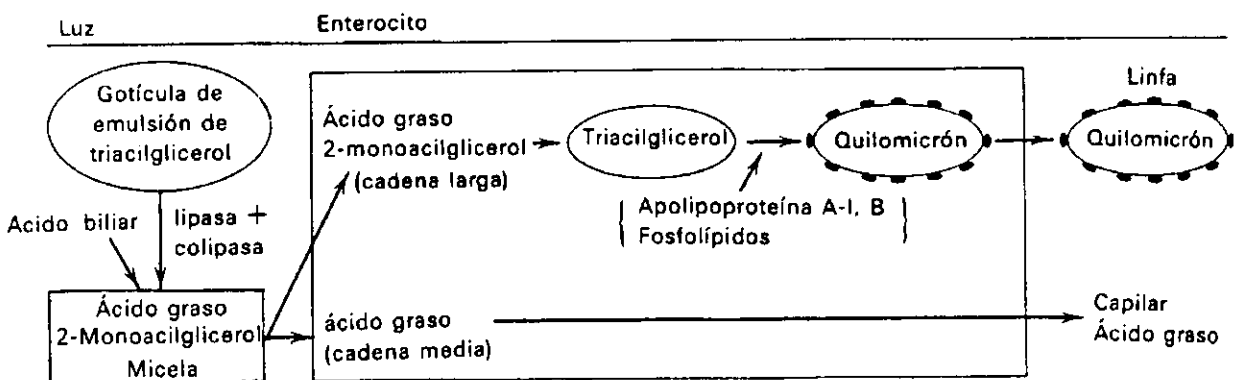


Fig 2. Digestión y absorción de lípidos.

Se ha calculado que una persona absorbe más del 98% de los lípidos que en un momento se encuentran en la luz del intestino delgado. Estos incluyen los que proceden de la dieta y los llamados endógenos. Así pues la asimilación de los lípidos es un proceso altamente eficaz en condiciones fisiológicas (Herrera, 1986).

1.1.4. Metabolismo de los triacilglicéridos.

En este trabajo no se revisa el metabolismo de todos los tipos de lípidos, sino únicamente y de manera resumida, el de los triacilglicéridos. Ello obedece a que son los que se relacionan directamente con el tema de la tesis. Además son los lípidos más abundantes de la dieta, y son los constituyentes principales del tejido adiposo y los que cuantitativamente tienen un metabolismo más activo en comparación con otros lípidos.

Las principales vías metabólicas de los triacilglicéridos son su síntesis o lipogénesis y su degradación o lipólisis (Fig. 3).

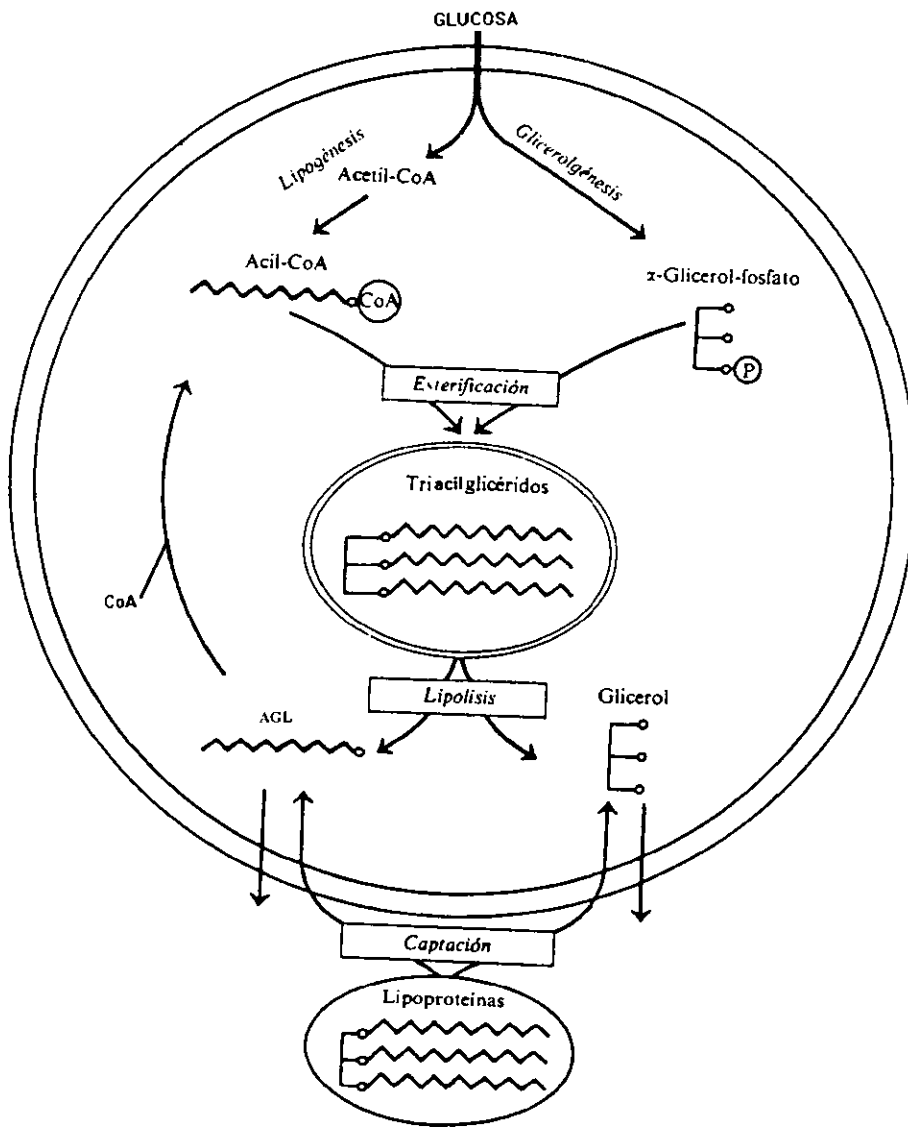
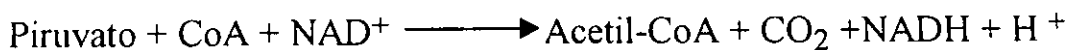


Fig. 3 Principales vías metabólicas de los triacilglicéridos en adipocitos

1.1.4.1. Lipogénesis.

La lipogénesis incluye la síntesis de glicerol, la síntesis de los ácidos grasos y la esterificación de los ácidos grasos al glicerol. La glucosa es el principal sustrato para formar tanto el glicerol como los ácidos grasos, otra alternativa importante es que se encuentren ya formados por provenir de la dieta, de otros tejidos o de la propia célula. La vía denominada glucólisis, resumida en la figura 4, forma glicerol-3-fosfato por un lado y termina en piruvato. Dependiendo de los requerimientos celulares el piruvato mediante un proceso de descarboxilación y activación genera acetil coenzima A, que es el precursor inmediato en la síntesis de los ácidos grasos, como se observa en la siguiente reacción:



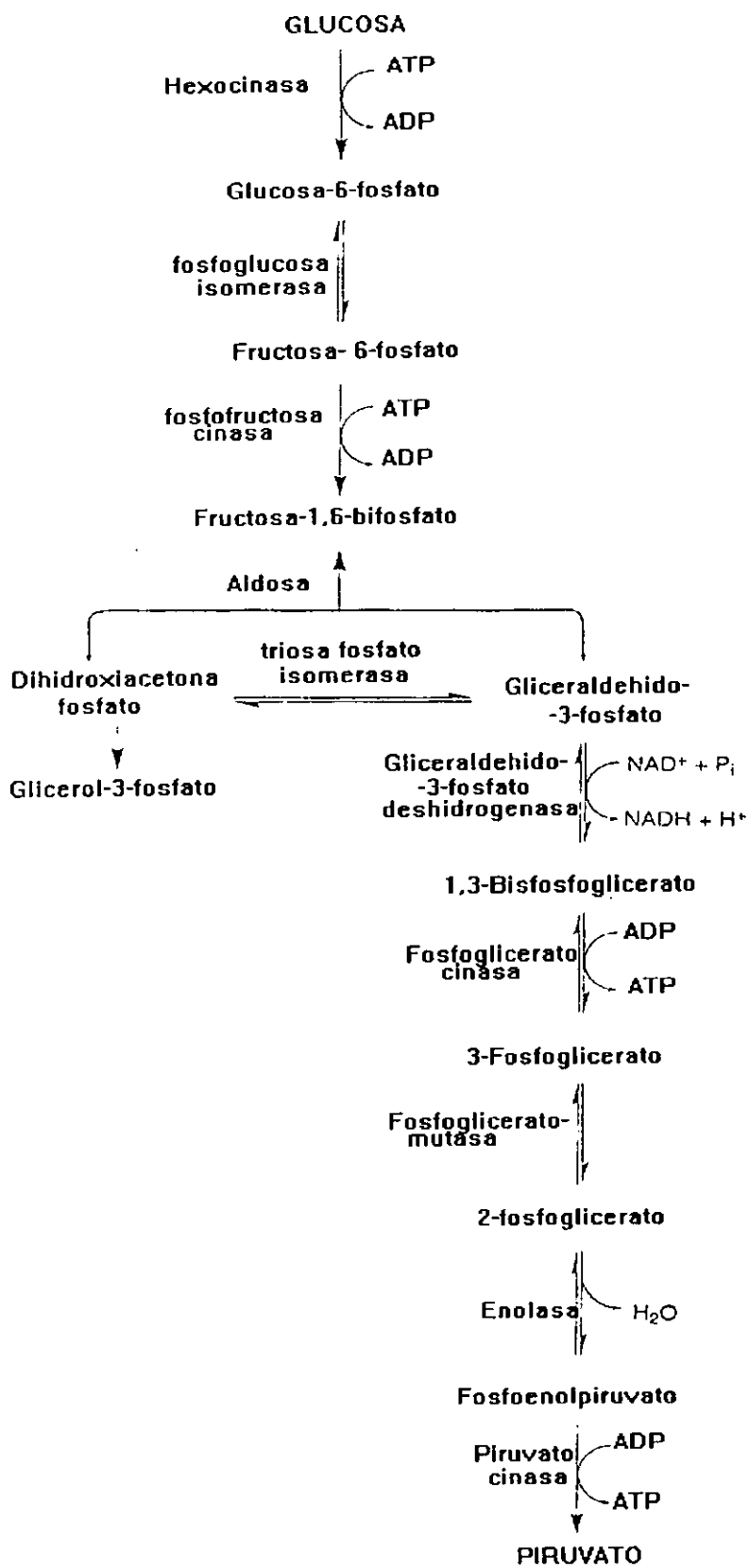


Fig. 4 Vía de la glucólisis

La síntesis de los ácidos grasos en los mamíferos se realiza mediante la condensación de 2 carbonos activados contenidos en la acetil coenzima A. La sustancia clave de la lipogénesis es la malonil coenzima A carboxilasa, la cual requiere biotina, vitamina con capacidad para recibir y ceder CO_2 en una reacción dependiente de ATP; la enzima favorece la carboxilación de la biotina y la transferencia del carboxilo a la acetil coenzima A. La fosforilación de la carboxilasa, por una cinasa, disminuye su actividad, recuperable si pierde los fosfatos por acción de una fosfatasa específica (Laguna y Piña, 1991).

Un esquema del complejo proceso de síntesis se incluye en la figura 5 en la que el producto final es un ácido graso con un número par de átomos de carbono y unido a la coenzima A formando una acil coenzima A (Mayes, 1988).

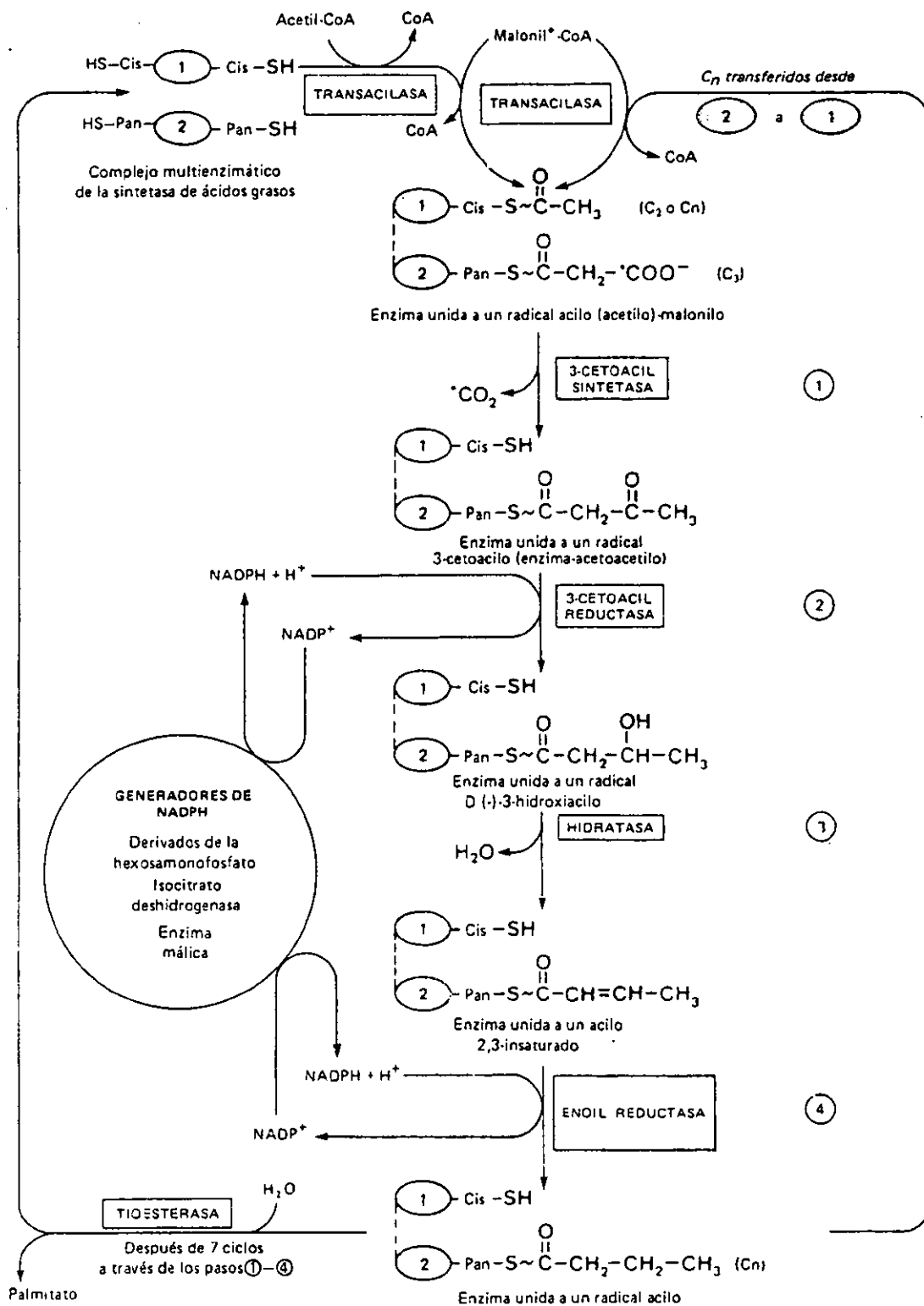


Fig. 5 Síntesis de los ácidos grasos.

La esterificación sucede al reaccionar el glicerofosfato con una molécula de acil coenzima A y la enzima correspondiente, luego se incorpora una segunda molécula de acil-coenzima A. Es necesario que se pierda el fosfato para la incorporación de la tercera molécula de acil coenzima A (Laguna y Piña, 1991) (Fig. 6).

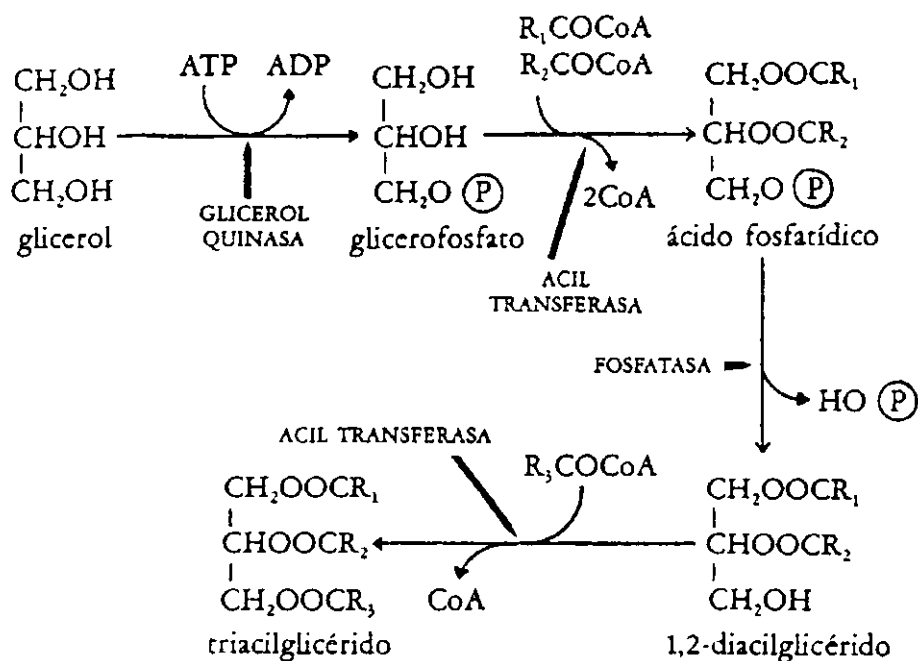
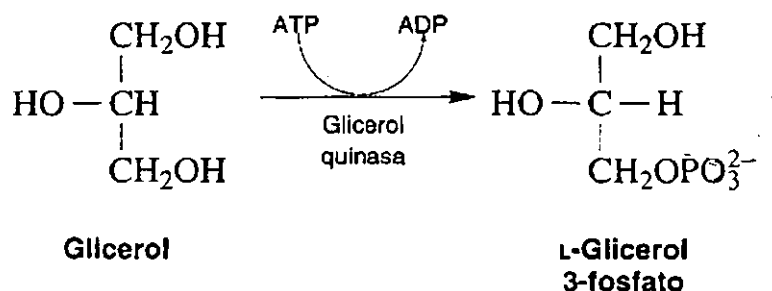
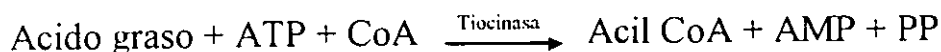


Fig. 6 Esterificación de los ácidos grasos

Si el glicerol o los ácidos grasos se encuentran ya formados en la célula, por ejemplo los que proceden de la dieta, habrán de activarse para formar el triacilglicérido. El glicerol se activa con ATP y la participación de la glicerocinasa para formar glicerol-3-fosfato (Stryer, 1995).



Por su parte la activación de los ácidos grasos se realiza con ATP, coenzima A y la tiocinasa:



1.1.4.2. Lipólisis.

La etapa inicial en la utilización de la grasa como fuente de energía es la hidrólisis de los triacilglicéridos por la lipasa (Fig. 7).

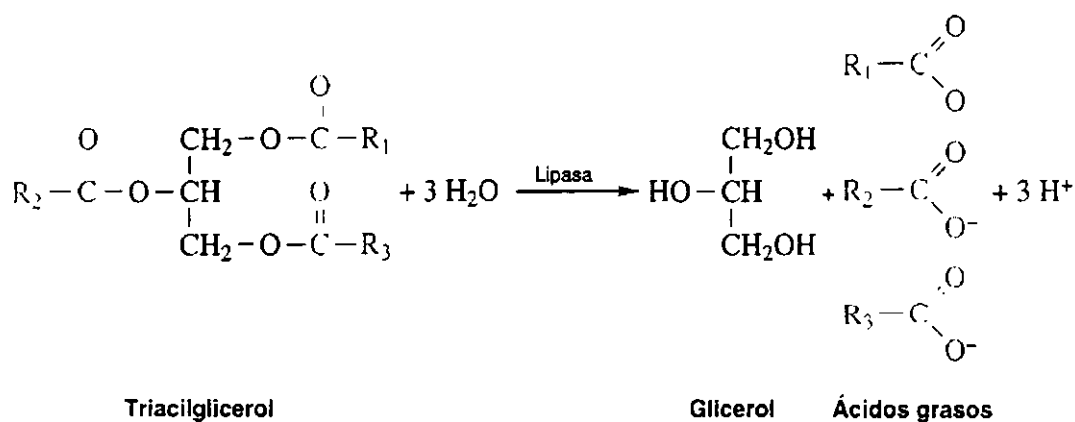


Fig.7 Hidrólisis de un triacilglicérido por la lipasa.

La actividad de la lipasa de triacilglicéridos en las células adiposas está regulada por hormonas como la epinefrina, norepinefrina, glucagon y la hormona adrenocorticotrópica (Stryer, 1995). El glicerol formado en la lipólisis sale del adipocito y es metabolizado por aquellos tejidos en donde esta presente la enzima glicerolcinasas, la cual cataliza la reacción incluida en la figura 6. Una vez fosforilado el glicerol-3-fosfato puede oxidarse y convertirse en dihidroxiacetona fosfato, que a su vez se isomeriza a gliceraldehido-3-fosfato (Fig. 8). Este compuesto intermediario se haya tanto en la vía glucolítica como en la gluconeogénica. Así pues, en el hígado que contiene las enzimas necesarias, el glicerol puede convertirse en piruvato o en

glucosa. El proceso inverso ocurre por reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato, una hidrólisis mediante una fosfatasa libera glicerol. Por consiguiente, el glicerol y los intermediarios glucolíticos son fácilmente interconvertibles (Stryer, 1995).

El glicerol para continuar su metabolismo habrá de activarse tal como se indicó en el párrafo previo, y en forma de glicerofosfato, se incorpora al metabolismo de los carbohidratos a través de la glucólisis (Fig. 4) o sirve de sustrato para la síntesis de nuevos triacilglicéridos. En el sujeto con un ayuno prolongado, el glicerofosfato obtenido a partir del glicerol es el precursor de más del 70% de la glucosa sanguínea formada en el hígado por medio de gluconeogénesis (Fig. 8).

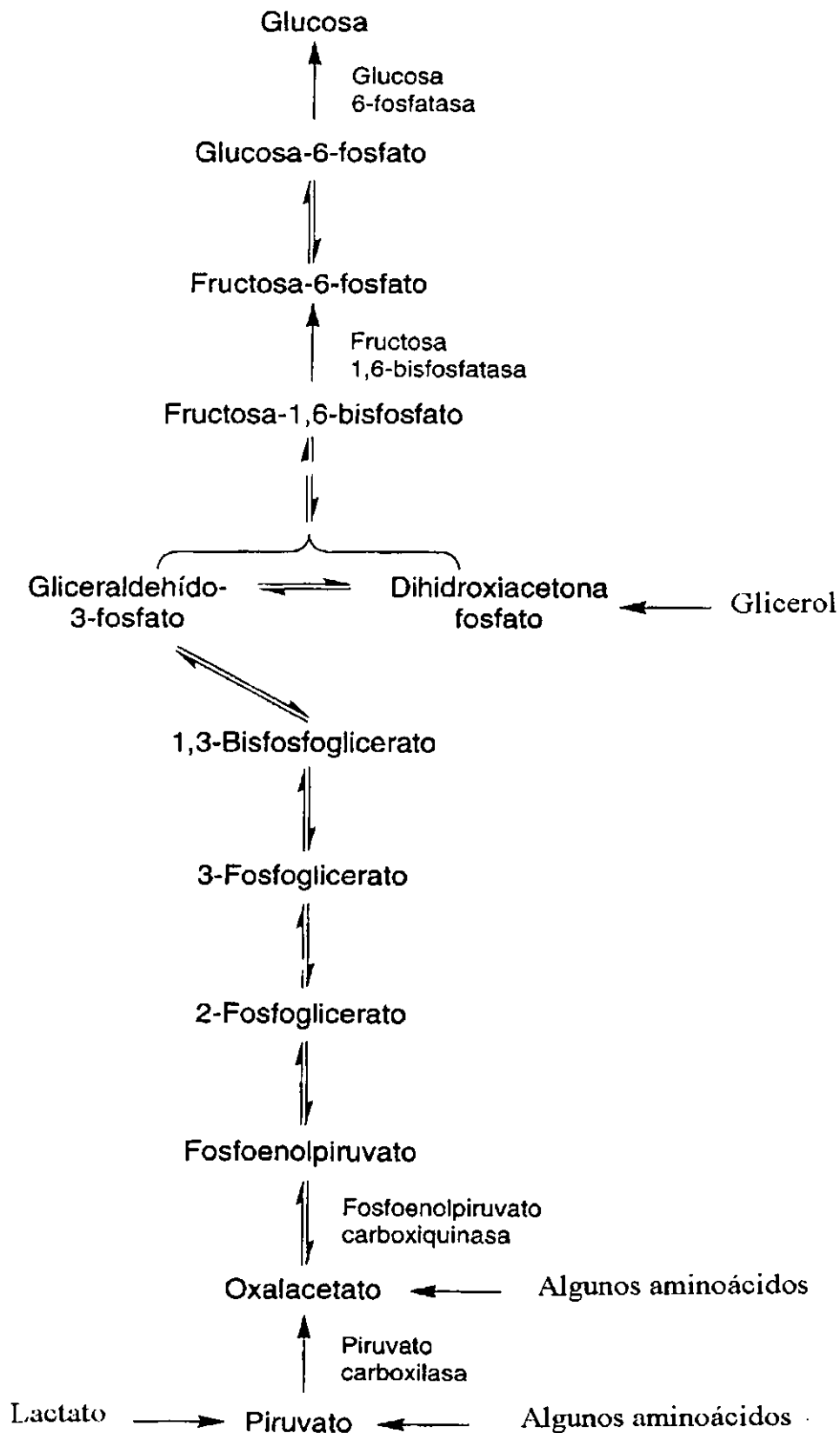


Fig.8 Gluconeogénesis. En este esquema sólo se muestran algunas enzimas de la vía de la gluconeogénesis, las demás se pueden observar en la figura 4, correspondiente a la vía de la glucólisis

Los ácidos grasos como ya se describió antes también deben ser activados para su oxidación final a H_2O y CO_2 ; Esta activación ocurre en la membrana externa mitocondrial y la oxidación en la matriz mitocondrial. Los ácidos grasos activados de más de 10 carbonos necesitan como transportador para atravesar la membrana mitocondrial, a la carnitina (Laguna y Piña, 1991). El camino más importante por medio del cual los ácidos grasos dentro de la mitocondria se oxidan a CO_2 y H_2O es la β -oxidación (Fig. 9), por una serie de reacciones ocurre una doble oxidación a nivel del carbono β (tercer carbono a partir del carboxilo), al final del proceso se desprende un fragmento de dos átomos de carbono y esto se repite una y otra vez hasta que todo el ácido graso queda convertido en fragmentos de dos átomos de carbono, como la acetyl-CoA.

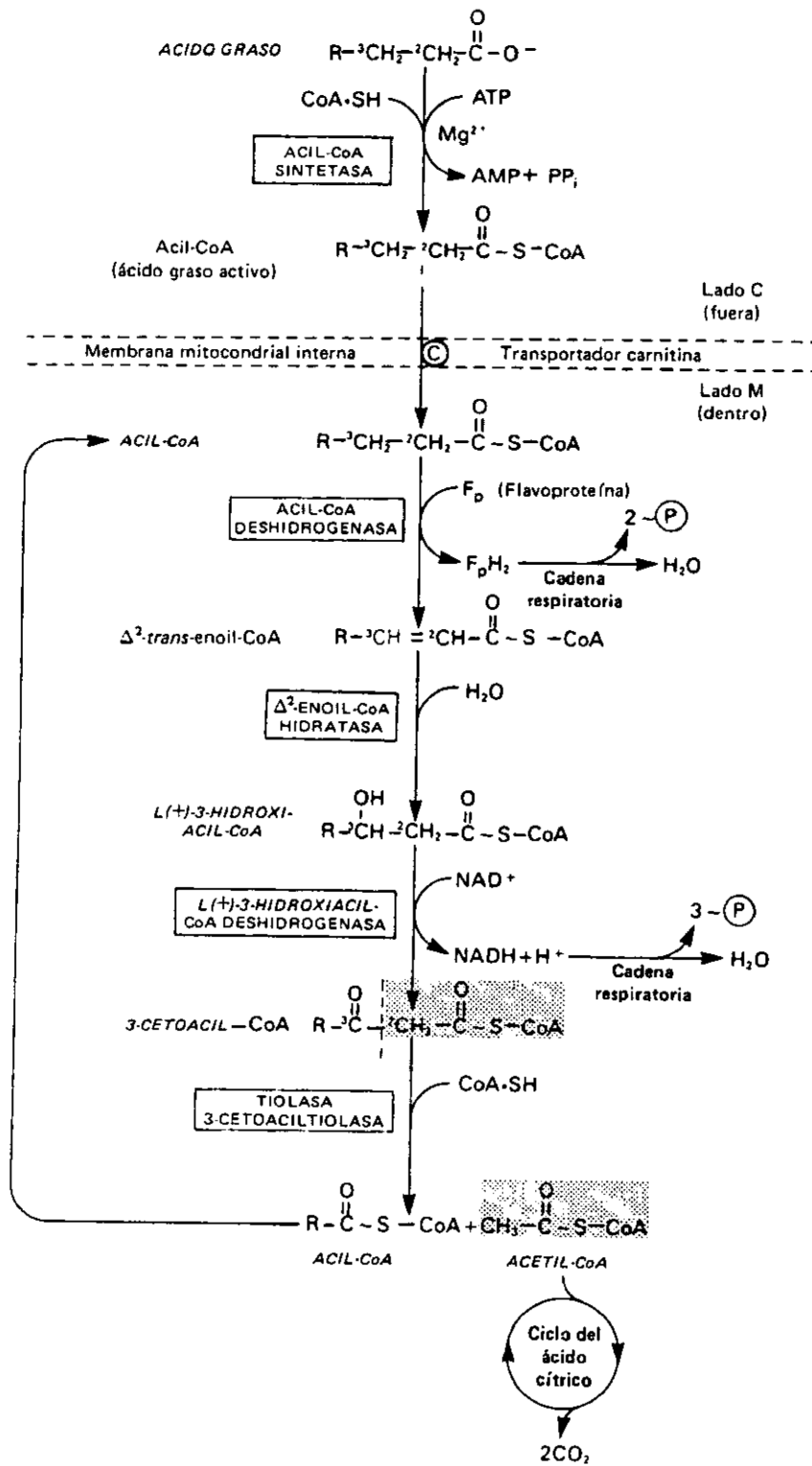


Fig. 9 β -oxidación de los ácidos grasos.

1.1.4.3. Características relevantes.

Parecería que los lípidos constituyen un material estático de reserva, que se moviliza únicamente en casos de desequilibrio metabólico para volverse a sintetizar en cuanto hay nuevamente acceso a sustratos. Sin embargo, ahora se sabe que los lípidos del organismo se encuentran en un estado dinámico de continuo intercambio de síntesis y degradación. La vida media biológica de los lípidos en diferentes tejidos de roedores se incluye en la cuadro 3.

CUADRO 3. Vida media de los lípidos en diferentes tejidos de roedores*			
Especie	Tejido	Tipo de lípido	Vida media
Ratón	Ádiposo	triacilglicérido	5 días
Rata	Adiposo	triacilglicérido	8 días
Rata	Hígado	Acidos grasos	2 días
Rata	Cerebro	Acidos grasos	13 días
Rata	Hígado	Colesterol	20 días
Rata	Cerebro	Coilesteroi	< 100 días

* Tomado de: Laguna, J. y Piña, E., 1991.

El metabolismo de los ácidos grasos tiene otra característica importante, que es su irreversibilidad de la vía catabólica (Fig.10). A diferencia de los carbohidratos y las proteínas, que pueden interconvertirse, la síntesis de los ácidos grasos constituye una vía sin retorno para los mamíferos, De tal forma que una vez que han sido sintetizados y almacenados, la única vía que tienen disponible es su degradación irreversible a CO₂ y agua con liberación de energía. El corolario de esta característica es que los ácidos grasos en los mamíferos no pueden convertirse en carbohidratos ni en aminoácidos.

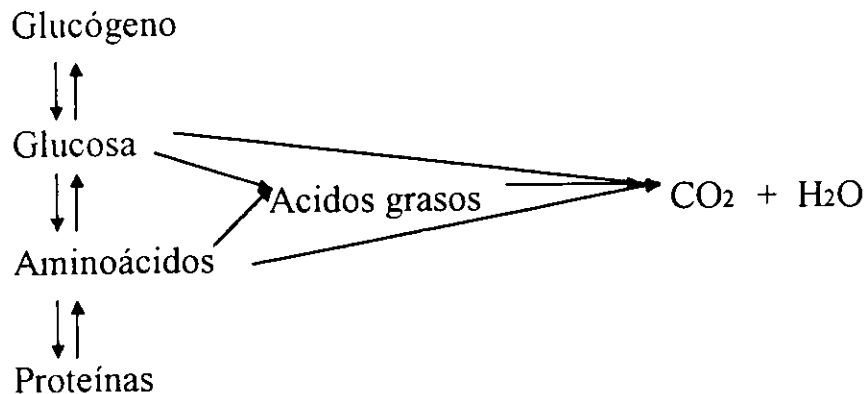


Fig. 10 Mientras que carbohidratos y proteínas pueden llegar a intercambiarse a través de sus moléculas más elementales, glucosa y aminoácidos, y llegar a sintetizar ácidos grasos, el metabolismo de los ácidos grasos ocurre exclusivamente hacia su degradación.

A pesar de sus ventajas como sustancia almacenadora de energía, los triacilglicéridos tienen la desventaja de que no pueden ser utilizados para la generación de ATP en ausencia de oxígeno. Si fuera posible sintetizar carbohidratos a partir de los triacilglicéridos, entonces cuando se dispone de oxígeno podría suceder la conversión de lípido en carbohidrato, y por otra parte, se utilizarían los carbohidratos exclusivamente en condiciones anaerobias. Sin embargo, salvo la excepción del gusano *Ascaris lumbricoides*, los animales son incapaces de realizar esta conversión (Palatt, 1982).

1.1.5. Movilización.

Los lípidos son insolubles en el agua y el medio en el que existe la vida en la Tierra es acuoso. Esto plantea ventajas y retos para los seres vivos. La movilización de los lípidos entre los diferentes tejidos de los mamíferos es un reto real con soluciones interesantes.

En el tema relativo a la absorción de los lípidos se mencionó la participación de los quilomicrones (de diámetros comprendidos entre 180 y 500 nm). Se trata de pequeñísimas gotas de grasa en la que predominan los triacilglicéridos, rodeados de una delgada película proteica (apoproteínas), que impide la coalescencia de las gotas y las hace miscibles en el líquido que las transporta. Así, en forma de quilomicrones se transportan los lípidos del intestino a los distintos tejidos de los mamíferos. Otro vehículo de transporte son las lipoproteínas presentes en el plasma, el cuadro 4 describe los tipos que existen, así como sus constituyentes y funciones. En todos los casos son pequeñísimas gotas de grasa rodeadas de proteínas, así se transportan los distintos lípidos entre los diferentes tejidos del organismo. Un tercer tipo de transporte lo constituye la albúmina plasmática, a la que se adsorben los ácidos grasos libres que llegan a la circulación; este sistema es ampliamente usado en el paso de ácidos grasos libres, o no esterificados, que se liberan del tejido adiposo y viajan a otros tejidos como el hígado o el corazón.

CUADRO 4. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas.*

Lipoproteínas	Lípidos principales en el núcleo	Apoproteínas	Funciones respecto a los lípidos
Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)	Triacilgliceroles endógenos	B-100,C,E	Hidrólisis por la lipoproteína lipasa
Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)	Esteres de colesterol endógenos	B-100, E	Endocitosis por el hígado mediada por receptores y conversión en LDL
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	Esteres de colesterol endógenos	B-100	Endocitosis por el hígado y otros tejidos mediada por receptores
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	Esteres de colesterol endógenos	A	Transferencia de ésteres de colesterol a IDL y LDL.

* Tomado de: Stryer, L., *Bioquímica*. 1995.

Algunos autores consideran que los llamados cuerpos cetónicos constituyen una manera de solubilizar en agua a los ácidos grasos libres. La conversión de los ácidos grasos en cuerpos cetónicos se realiza principalmente

en el hígado de los mamíferos y se resume en la Fig 11. Dos de los cuerpos cetónicos: el acetoacetato y el β -hidroxibutirato son excelentes sustratos energéticos para el tejido muscular y en determinadas condiciones, incluso, para el sistema nervioso central.

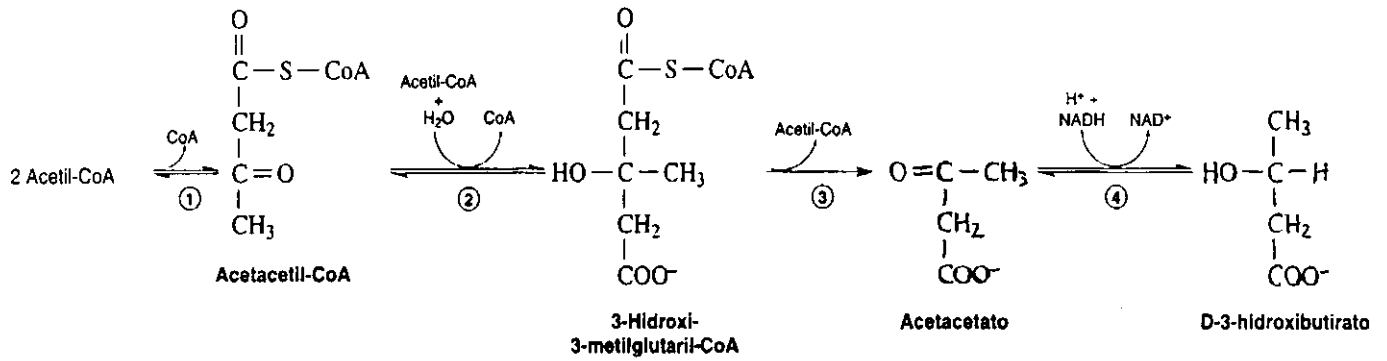


Fig. 11 Formación de cuerpos cetónicos.

En la figura 12 se ofrece un resumen de los principales flujos que se observan en la movilización de lípidos en los mamíferos.

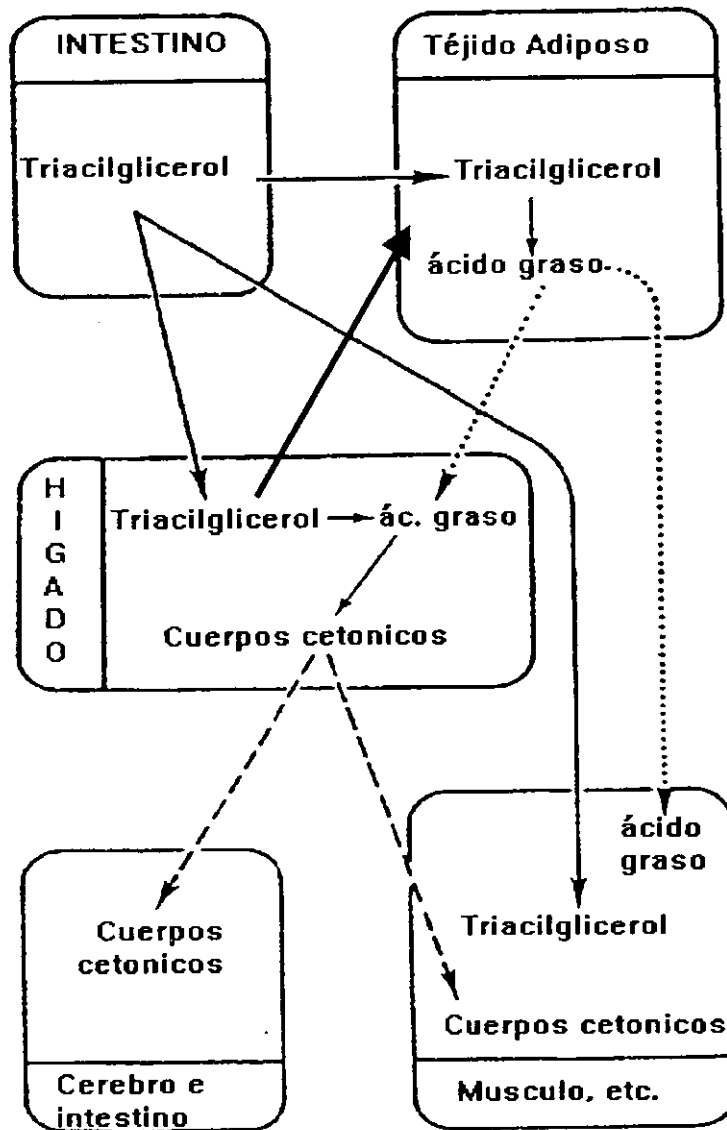


Fig. 12 Producción y utilización de triacilglicéridos por diferentes tejidos.

1.2. El tejido adiposo.

1.2.1. Composición

En situación normal y en promedio, el tejido adiposo constituye cerca del 18% del peso corporal en el hombre (Herrera, 1986). Desde el punto de vista estructural, las células representativas del tejido adiposo son los

adipocitos o células adiposas. Se trata de células con una gran vacuola de grasa, rodeada de un citoplasma con elevada densidad de mitocondrias y un núcleo bien diferenciado (Fig. 13)

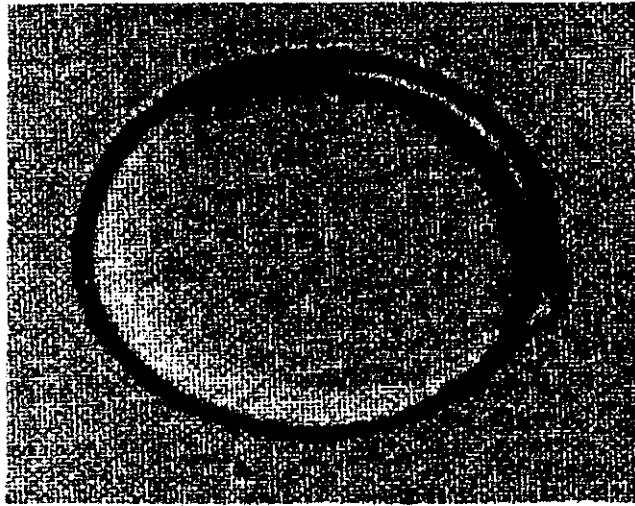


Fig. 13 Micrografía de una célula de grasa. Un lóbulo grande de grasa rodeado por una envoltura delgada de citoplasma y un núcleo abultado. Tomada de: Stryer, L. Bioquímica. 1995.

En conjunto, el tejido adiposo es el principal lugar de almacenamiento de lípidos, lo cual sucede principalmente en el citoplasma de los adipocitos. Se calcula que el 95% en peso húmedo de la grasa del tejido adiposo se encuentra como triacilglicerol, mientras que las concentraciones de monoacilglicerol y diacilglicerol son muy bajas (Newsholme y Leech, 1983).

Existen en los mamíferos dos tipos de tejido adiposo bien diferenciados: el café y el blanco. El tejido adiposo café es muy escaso, más bien rico en mitocondrias y presenta menor contenido de triacilglicéridos que el blanco. Su papel es principalmente termogénico, respondiendo rápidamente a una disminución de la temperatura externa.

El tejido adiposo blanco representa un papel cuantitativamente más importante en el metabolismo general del individuo (Herrera, 1986).

1.2.2. Fisiología.

Son diversas las funciones desarrolladas por el tejido adiposo. Es un aislante del medio externo así como un protector de otros órganos en contra de las presiones y golpes externos. Como se mencionó el papel del tejido adiposo café es termogénico y la función primordial del tejido adiposo blanco, es la de reserva energética para la sobrevivencia del organismo sujeto a prolongados períodos de ayuno. Se considera que un adulto normal con posibilidades de ingerir agua “ad libitum” resiste un ayuno de alimentos por 30 a 40 días, período en el cual la energía requerida para sus funciones es proporcionada por los triacilglicéridos ubicados en el tejido adiposo, mismos que son degradados progresiva y paulatinamente. Por ello las vías lipogénica y lipolítica están precisamente reguladas en el tejido adiposo.

Existe un conjunto de condiciones externas (frío, calor, estrés, ayuno, alimentación) a las cuales se adaptan los organismos. El tejido adiposo contribuye a la adaptación promoviendo la lipogénesis o la lipólisis en respuesta a hormonas específicas, o sea, un factor externo promueve la liberación de hormonas específicas que al llegar a sus órganos blanco estimulan o inhiben vías metabólicas. En la respuesta integrada al estímulo participa el tejido adiposo movilizando o no ácidos grasos en función de la hormona presente y del receptor al cual se une la hormona y que esté localizado en el propio tejido adiposo (Cuadro 5).

CUADRO 5 Factores que afectan la movilización de los ácidos grasos en el tejido adiposo.*

Factores	Aumento de la movilización	Disminución de la movilización
Nutricionales	Poca disponibilidad de glucosa (Hipoglucemia), Ayuno	Mayor disponibilidad de glucosa Poco ejercicio
Hormonales	Epinefrina Norepinefrina Corticosteroides Hormona tiroidea Glucagon ACTH STH TSH	Insulina
Nervioso	Estimulación simpática Trauma Exposición al frío Embarazo	Cordotomía Bloqueadores simpáticos Hipofisectomía Adrenalectomía
Químico	Etanol > 5g/kg CCl ₄	Prostaglandinas Nucleótidos Acido Nicotínico Salicilatos Tranquilizantes Adenosín trifosfato Clorofenoisobutirato Adenosina

* Tomado de: Halpers, D.H., y Sabesin S. M., 1987)

1.2.3. Bioquímica.

El tejido adiposo dispone de un equipo enzimático cuya regulación permite o impide la movilización de ácidos grasos. En el caso de la lipólisis la enzima reguladora es la lipasa sensible a hormonas. Si se activa la lipasa por medio de una hormona, tal como se describe en los siguientes incisos, se promueve la conversión de los triacilglicéridos en glicerol y ácidos grasos. El

metabolismo del glicerol en el tejido adiposo es determinante para marcar el destino de los ácidos grasos disponibles en el interior del adipocito. Una de las características del tejido adiposo de los mamíferos es que carece de la enzima gliceroquinasa, la cual cataliza la conversión del glicerol y ATP en glicerofosfato; por lo tanto, el glicerol, generado en el tejido adiposo por acción de la lipasa no se usa en el adipocito, sino que sale a la circulación para ser captado y usado por otros tejidos. En dicha situación, los ácidos grasos presentes en el adipocito no disponen de glicerofosfato para esterificarse y también salen de la célula adiposa, como ácidos grasos libres o no esterificados y unidos a la albúmina viajan a otros tejidos para su oxidación. El ejemplo descrito corresponde al de un ayuno de poco más de 24 horas.

Pero existe otra alternativa para los ácidos grasos ubicados en el interior del adipocito: si ésta célula está consumiendo activamente glucosa, forma glicerofosfato por la vía glucolítica (Fig. 4), con el cual se esterifican los ácidos grasos y se forman triacilglicéridos para ser almacenados. Puede darse el caso de que coexistirán dos tipos de estímulos sobre el tejido adiposo: por un lado un estímulo promotor de la oxidación de la glucosa (por ejemplo: después de una comida rica en carbohidratos y con la presencia de insulina en la sangre) y por otro lado una situación de estrés transitorio (por ejemplo una fuerte impresión con liberación de epinefrina y consecuentemente activación de la lipasa sensible a hormonas).

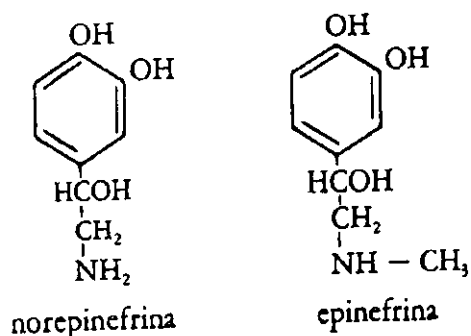
1.3. Señales hormonales.

La definición clásica de hormona es la de una molécula producida por un tejido, que a través de la sangre llega a otro tejido donde produce una respuesta. Al tejido productor se le llama glándula y al tejido que responde se le denomina órgano blanco. Para que un tejido sea órgano blanco debe poseer una proteína que reconozca y que se una específicamente a la hormona, la cual se le llama receptor. La cadena de sucesos que conectan el receptor con la respuesta tisular se define como la transducción de la hormona.

El sistema hormonal de los mamíferos es muy complejo y su descripción completa permanece fuera del ámbito de este trabajo. Aquí se incluye únicamente el sistema de las hormonas llamadas genéricamente catecolaminas, así como la principal respuesta que promueven en uno de sus órganos blanco, el tejido adiposo.

1.3.1. Catecolaminas.

Las hormonas de la médula suprarrenal son indispensables para la adaptación rápida del individuo a situaciones de emergencia. La médula suprarrenal responde con gran velocidad a los estímulos provenientes del sistema nervioso, ocasionados por diversas situaciones como ejercicio, hemorragia, miedo entre otras. Por vía esplácnica, a través de las fibras nerviosas de la porción tóracolumbar de la médula espinal, el sistema nervioso central provoca la estimulación de las células de la médula suprarrenal y la liberación de las catecolaminas hormonales correspondientes. Estas producen una compleja respuesta en la que participan el cerebro, los aparatos respiratorios y cardiovascular, los músculos, el hígado y el tejido adiposo. Los estudios de microscopía electrónica de las células cromafines de la médula suprarrenal han demostrado la presencia de gránulos osmofílicos que contienen complejos ricos en catecolaminas, varias proteínas, ATP y calcio. El mecanismo de liberación de las catecolaminas depende de calcio y comprende la fusión de la membrana de las vesículas almacenadoras con la membrana celular, para producir la exocitosis de las hormonas. El estímulo normal para la descarga es la acetilcolina, liberada por las terminaciones de los nervios espláncnicos, en contacto con las células de la médula suprarrenal. Dentro de las catecolaminas se encuentra a la epinefrina y a la norepinefrina (Laguna y Piña, 1991).



En los órgano blanco de la epinefrina y la norepinefrina existen receptores específicos para ellas. Se han descrito dos tipos de receptores, los alfa (α) y los beta (β); además se reconocen subclases para cada tipo de receptor los β_1 , β_2 , β_3 y los $\alpha_1 A$, $\alpha_1 B$, $\alpha_1 C$, $\alpha_1 D$. Cada receptor al ser estimulado por la hormona tiene un mecanismo de acción particular y desencadena en la célula una respuesta específica. A su vez, cada tejido posee

una distinta proporción de cada uno de los tipos de receptores. Por lo tanto las hormonas suprarrenales actúan de manera diferente en los distintos tejidos dependiendo del receptor predominante y del tipo de respuesta del receptor. En el cuadro 6 se observan algunas de las respuestas asociadas a los receptores adrenérgicos dependiendo del tipo de célula blanco (Mathews y Van Holde, 1995).

CUADRO 6. ACCIONES BIOLÓGICAS ASOCIADAS A RECEPTORES ADRENÉRGICOS*		
Tipo de receptor	Célula blanco	Efecto de la hormona
α -1	iris del ojo intestino	contracción disminuye movilidad
α -2	glándulas salivales células β pancreática plaquetas de sangre adipocitos estómago	secreción de potasio y agua disminuye secreción aumenta agregación disminuye lipólisis
β -1	corazón	disminuye movilidad incrementa la fuerza y frecuencia de contracciones
β -2	adipocitos intestino pulmón hígado intestino	aumenta la lipólisis disminuye movilidad relajación muscular aumenta glicogenólisis disminuye movilidad

* Mathews y Van Holde, *Biochemistry*. 1995.

Como se puede observar en el cuadro, en los adipocitos la estimulación de receptores β -2 por catecolaminas aumenta la lipólisis. La lipólisis como se mencionó en 1.1.4.2. es el proceso que libera ácidos grasos y glicerol a partir de triacilglicéridos almacenados. Las catecolaminas interactúan con receptores β adrenérgicos localizados en la membrana causando un aumento en la formación de AMPc y la subsecuente fosforilación y activación de la enzima lipasa sensible a las hormonas (Egan et al, 1992).

Los receptores β adrenérgicos son proteínas de tamaño considerable, tienen entre 415 y 480 residuos, incluyen 7 regiones conservadas ricas en aminoácidos hidrofóbicos, lo cual representa regiones de α hélice que están

embebidas en la membrana y unidas por regiones hidrofílicas proyectadas hacia el citosol y hacia el exterior de la célula. (Fig 14).

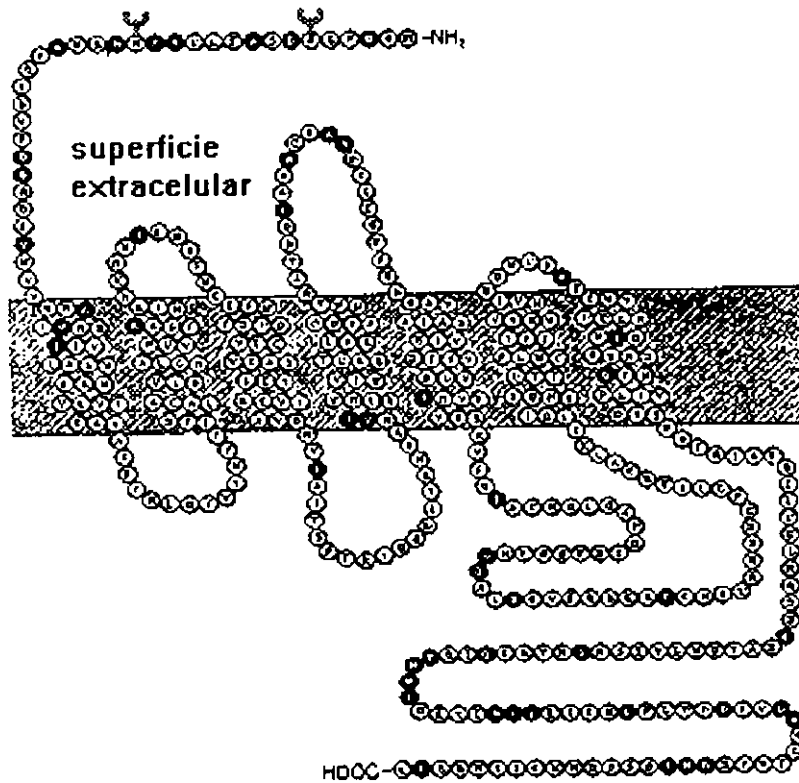


Fig. 14 Secuencia de un receptor β -2 adrenérgico humano.

La diversidad de señales y respuestas en las células blanco depende de la diversidad de receptores y de enzimas en las células, con la cual su actividad puede ser estimulada o inhibida por el AMPc y, como desde hace tiempo se sabe, la transducción de la señal hormonal hacia la adenilato ciclasa incluye un tercer tipo de proteínas, las proteínas G (Mathews y Van Holde, 1995).

1.3.2 Transducción de la señal a través de AMPc.

El sistema de transducción de la señal es modular y consiste en tres componentes protéicos: un receptor, un transductor y un efector, como se observa en la figura 15.

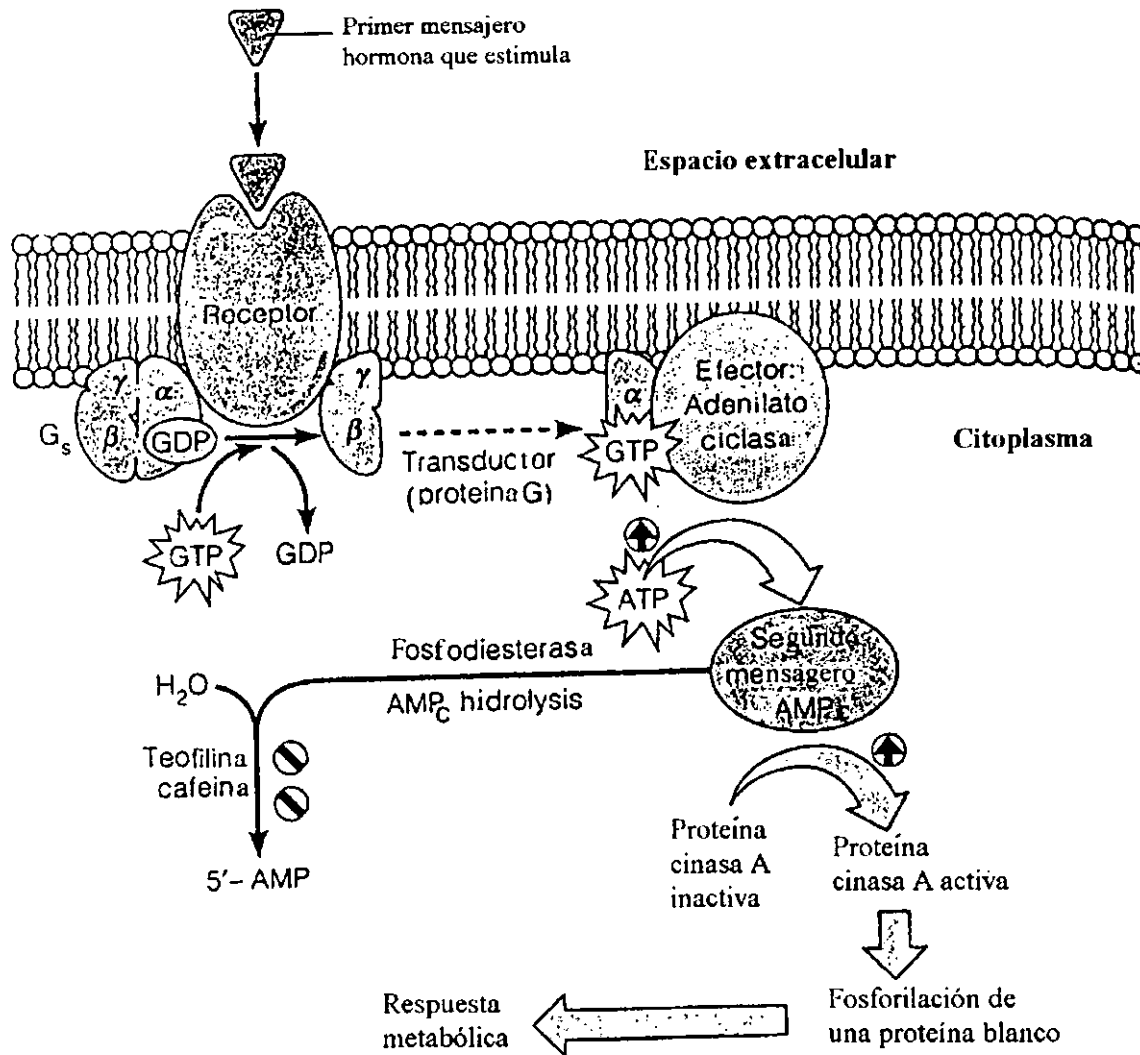


Fig. 15 Transducción de señales. Aquí se puede observar la ruta que se lleva a cabo para transducir una señal: (1) la hormona se une al receptor; (2) el receptor interactúa con la proteína G, la cual se disocia de GDP y se une con GTP; (3) estimulación de la adenilato ciclasa por la unión del GTP con la proteína G y aumento en los niveles de AMPc; (4) estimulación por el AMPc de la enzima que fosforila; (5) estimulación o inhibición de las rutas metabólicas.

El receptor es una proteína de membrana que reconoce y une una hormona específica, el transductor es una proteína G, denominada así por la habilidad que tiene de unir el nucleótido de guanina, y el efector es la enzima adenilato ciclasa que cataliza la conversión de ATP a AMPc, el segundo

mensajero, que activa a una proteína cinasa . Algunas enzimas se activan al ser fosforiladas y otras se inhiben.

En los adipocitos, la unión de la hormona epinefrina en la superficie celular estimula la síntesis de un segundo mensajero, el AMPc, que transfiere un fosfato del ATP a la lipasa sensible a hormonas, la cual de inactiva se convierte en activa e inicia la hidrólisis de los triacilglicéridos dentro de la célula. A su vez el AMPc puede ser degradado por una fosfodiesterasa; cuando ésta se inhibe, ocurre lo mismo que si se activara la adenilato ciclasa . Por lo tanto un aumento en los niveles de AMPc en el adipocito, independientemente de su causa, va seguido de un incremento en la lipólisis y en la liberación de glicerol y ácidos grasos (Laguna y Piña, 1991).

La secreción de una hormona puede tener diversos efectos en diferentes tejidos dependiendo de la naturaleza del receptor y del transductor, así como de la interacción del efector y el sistema de segundos mensajeros. Hay diferentes tipos de receptores de membrana, diferentes tipos de proteínas G, unas que inhiben a la adenilato ciclasa y otras que la activan; hay otros efectores además de la adenilato ciclasa que producen diferentes segundos mensajeros. Por lo tanto un sistema de control como éste tiene muchos puntos de regulación que aseguran una respuesta metabólica adecuada. Otra ventaja es que por tratarse de una cadena, la señal se amplifica en cada eslabón de la cadena, siendo muy eficiente en cuanto a ahorro de energía.

1.4. El etanol.

El etanol o alcohol etílico es el componente activo más abundante de las bebidas alcohólicas. Para la química un alcohol es un derivado del H₂O en el que uno de sus hidrógenos se ha reemplazado por un metilo.



El número de sustituyentes de ese hidrógeno es muy grande así como el número de alcoholes existentes. El etanol es uno de los alcoholes más sencillos, su fórmula química corresponde a:



y dada su abundancia, en la industria y en las bebidas alcohólicas, con frecuencia el nombre del etanol se substituye por el genérico de “alcohol”, y la

enfermedad humana asociada a su consumo exagerado se denomina con mayor frecuencia alcoholismo, si bien también se emplea el de etilismo.

El etanol es el compuesto tóxico más consumido por los humanos (Williams *et al.*, 1988) y su consumo está ligado en la historia del hombre desde sus inicios; pero nunca como ahora, el alcoholismo es el causante de una enorme problemática que afecta las diferentes esferas sociales y económicas. Se sabe que cantidades moderadas de etanol tiene efectos psicotrópicos importantes, es estimulante del apetito, tranquilizante, eufórico y sedante, así mismo induce un aumento transitorio del sentimiento de autoestima y una sobreestimulación de los talentos y habilidades del bebedor (Achord, 1995). Sin embargo, una vez delineados los efectos sobresalientes del alcohol sobre el comportamiento humano hay que mencionar datos preocupantes desde el punto de vista de la salud, ya que el 90% de la gente bebe etanol, entre el 40% y el 50% tienen problemas inducidos por su consumo y el 10% de hombres y del 3 al 5% de mujeres desarrollan problemas de alcoholismo. Las edades más frecuentes en que aparece es entre los 30 y los 50 años y todos los estratos socioeconómicos se ven afectados (Zentella, 1994).

El hígado es el órgano más frecuentemente afectado en la ingestión exagerada de etanol por ser donde se lleva a cabo su metabolismo sin excluir otros órganos y tejidos como por ejemplo: cerebro, estómago, páncreas y la sangre.

Los descubrimientos histológicos de las enfermedades del hígado causadas por etanol, indican que estas aparecen en combinaciones variables y diferentes grados de severidad dependiendo de cada individuo. En un orden aproximado de severidad se incluye una metamorfosis por acumulación de grasa, engrosamiento de la pared de la vena central hepática, infiltración de leucocitos, hinchamiento celular hepático y necrosis, formación de mitocondrias gigantes, mayor aparición de cuerpos de Mallory, infiltración mononuclear y fibrosis (Achord, 1995).

1.4.2. Intoxicación alcohólica experimental

Los resultados de la intoxicación aguda con etanol en animales de laboratorio han sido estudiados en el laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo de tesis (Zentella *et al.*, 1992; Zentella *et al.*, 1993; Zentella, 1994), e involucran un gran número de efectos: entre ellos de interés para este trabajo

es un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo, con repercusiones tales como la instalación de un hígado graso transitorio.

Las funciones biológicas normales del cuerpo pueden ser modificadas por la acción de drogas o compuestos tóxicos produciendo un estado alterado. En este sentido el estado anormal descrito como hígado graso por intoxicación alcohólica es considerado como el resultado de una mayor movilización y transporte de ácidos grasos de cadena larga y de la síntesis de triacilglicéridos en el hígado. Esto puede deberse a un efecto estimulante del etanol sobre la biosíntesis de los ácidos grasos (Lieber y Shmid, 1961). Otra posibilidad es que sean la consecuencia de un aumento en la degradación de la grasa neutra de tejido adiposo periférico (Baraona, 1979) y liberados como ácidos grasos hacia el hígado donde se re-esterifican a triglicéridos. Cabe también otra alternativa relacionada con alteraciones en la síntesis de proteínas y como consecuencia de las lipoproteínas encargadas de la salida de triglicéridos hepáticos (Hyams, 1967). Por último es posible que se relacione con una inhibición en la β -oxidación de los ácidos grasos, acumulación de los mismos y su almacenamiento como triacilglicéridos propuesta por Lieber y colaboradores (Fig. 16). De todas las alternativas mencionadas, la que podría considerarse como la más importante para explicar el hígado graso es la de una movilización exagerada de lípidos del tejido adiposo, en base a los siguientes datos: la acumulación de lípidos en el hígado después de una sola dosis de etanol (5-7 g/kg) es semejante a la del tejido adiposo (Mallov, 1957), además la adrenalectomía, hipofisectomía y los agentes bloqueadores adrenérgicos previenen la acumulación de lípidos en el hígado después de la intoxicación aguda con etanol (Reitz, 1979). Estos resultados indican que las catecolaminas están relacionadas con el mecanismo de producción del hígado graso por el efecto tóxico de una dosis aguda de etanol.

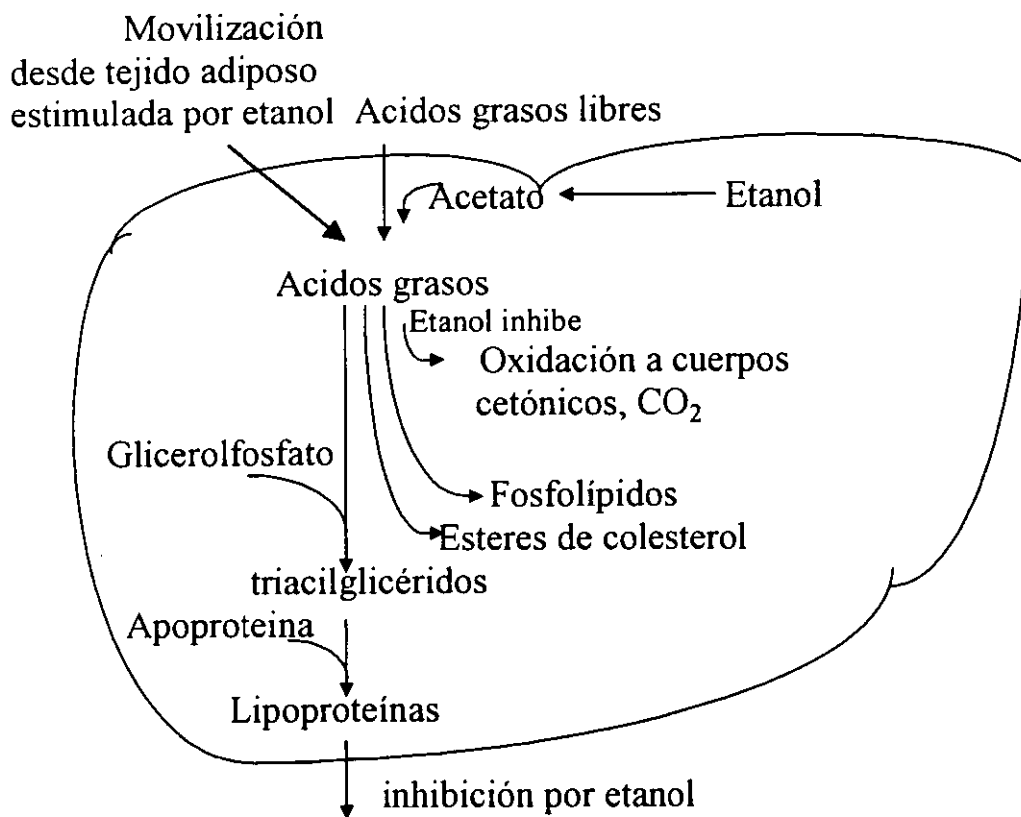


Fig. 16. Mecanismos posibles en la patogenia del hígado graso. La ilustración representa la captación y metabolismo de los ácidos grasos por el hígado, la formación de triglicéridos y la secreción de lipoproteínas. La disponibilidad de ácidos grasos en hígado tanto por movilización desde tejido adiposo como por síntesis a partir del acetato producto del catabolismo del etanol, aunado a una menor secreción de lipoproteínas, puede conducir a la acumulación de triacilglicéridos y al hígado graso.

1.4.3. Efecto del etanol en el metabolismo de los lípidos.

Aún no se conocen con certeza todos los mecanismos moleculares de las alteraciones tisulares provocadas por un abuso en la ingestión del etanol; sin embargo, desde hace algunos años se han asociado dichas alteraciones con los mecanismos de estrés oxidativo, en el cual las defensas antioxidantes son rebasadas por un estrés tóxico, promovido por la oxidación del etanol y como consecuencia hay un aumento en la poza tisular de radicales libres (Lieber *et al*, 1989). El primer acercamiento a este problema fue mediante los experimentos de Di Luzio y Costales en 1964, que mostraron una acción

protectora de antioxidantes sobre el hígado graso por un tratamiento agudo con etanol.

Se sabe que se forman varios tipos de radicales libres derivados del oxígeno o generadores de éstos durante una intoxicación etílica. Entre estas especies se encuentra el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ y su formación se ve notablemente aumentada después de un tratamiento crónico con etanol en ratas (Ekstrom y Ingelman, 1996). El peróxido de hidrógeno H_2O_2 (producido por la dismutación del anión superóxido y catalizado por la enzima superóxido dismutasa) que en presencia de fierro es degradado en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, incrementándose así los radicales libres hidroxilo. Otros radicales libres derivan de la lipoperoxidación o inducen la peroxidación de los ácidos grasos insaturados.

Reacción de Fenton:



Reacción de Haber Weiss:



Durante muchos años se pensó que la extrema reactividad de los radicales libres y la irreversibilidad de las reacciones en las que ellos participan, los excluía para considerar su posible existencia en los organismos vivos, ahora se sabe muy bien que sucede lo contrario (Gershman, *et al.*, 1954).

La peroxidación de los ácidos grasos insaturados conocida como lipoperoxidación, es una reacción de autooxidación que puede ser inducida por radicales hidroxilo, hidroperoxilo y quizá por el oxígeno singulete, pero no por radicales menos reactivos.

La lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas, daña seriamente las membranas plasmáticas y la de los organelos celulares, produciendo pérdida de fluidez, alteraciones en las funciones secretorias y de los gradientes trasmembranales, llegando hasta la muerte celular (Donohue *et al.*, 1983).

Los productos finales de la reacción de peroxidación sobre los ácidos grasos insaturados son: aldehídos, gases hidrocarburos (etano, pentano) y varios residuos químicos como el malondialdehído (Barber y Berhein, 1967).

Estos productos difunden del sitio de producción originando edema celular y cambios en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Además algunos pueden cambiar la actividad de la fosfolipasa e inducir la salida de ácido araquidónico y la formación de prostaglandinas y varios endoperóxidos.

En la figura 17 se señala la secuencia de la fisiopatología en el daño hepático por etanol.

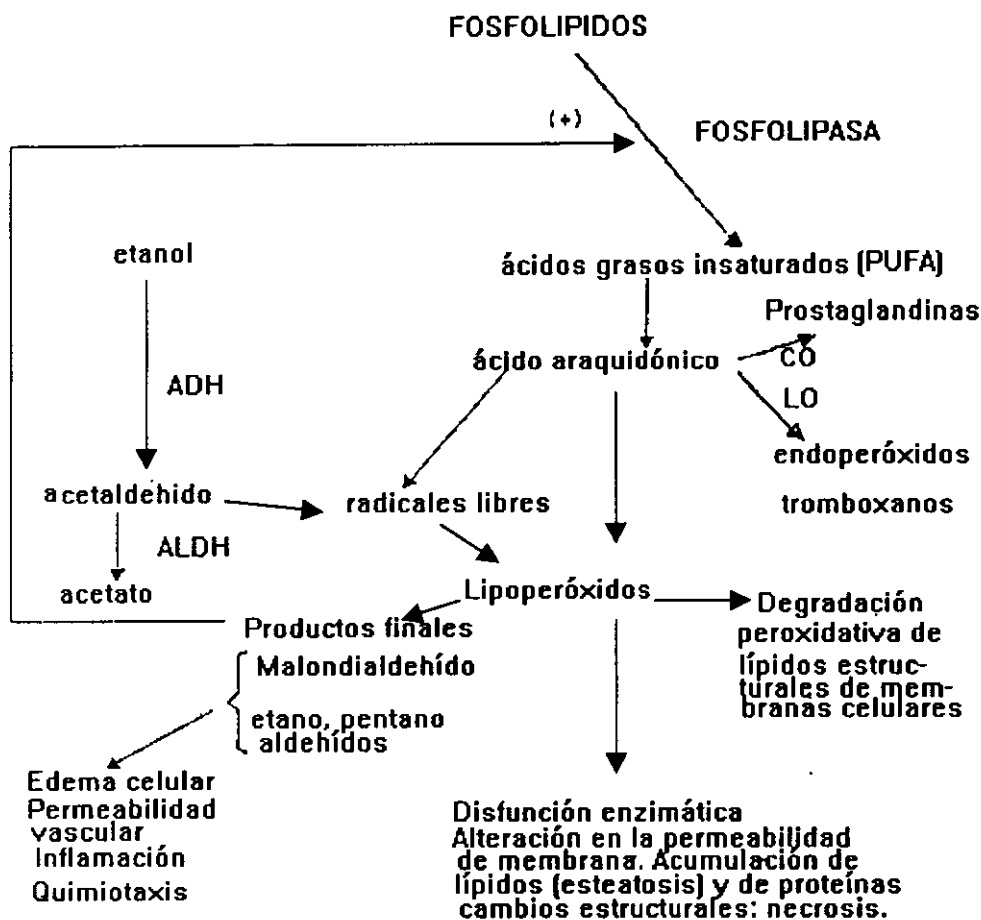


Fig. 17 Secuencia de Mendenhall modificada para explicar la fisiopatología en el daño hepático por etanol (Modificada de Mendenhall, 1987).

Todos los seres vivos están confrontados continuamente por intrusiones del medio ambiente. Para sobrevivir han tenido que desarrollar mecanismos de resistencia o inmunidad. La inflamación es uno de esos mecanismos de defensa desarrollado por los organismos, es un proceso complejo que comprende varios eventos, desencadenados por un daño causado por un factor endógeno, como factor endógeno hay mecánico, físico, químico, biológico, etc.

Minutos después de la agresión por cualquier factor endógeno, el proceso de inflamación empieza con la liberación de sustancias como las prostaglandinas que, por medio de vasodilatación, regulan el flujo sanguíneo a órganos particulares aumentando la permeabilidad capilar (Stryer, 1995).

En respuesta al estímulo de inflamación se lleva a cabo fagocitosis, considerada como la ingestión y destrucción de células individuales a partículas extrañas. Estas células individuales se transforman en células secretoras capaces de provocar daño celular (Abramson y Weissman, 1989); Por ejemplo los granulocitos producen radicales peróxido y superóxido que son tóxicos para muchos microorganismos.

Los neutrófilos tienen en la membrana celular receptores que al unirse con el ligando se desencadena una respuesta, transformándose el neutrófilo en una célula secretora. La unión del ligando promueve la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol membranar por la acción de la fosfolipasa C en una reacción regulada por al menos una proteína G (Fig. 18). Los productos de la hidrólisis son 1,4,5- trifosfato de inositol (IP_3) y *sn*-1,2-diacilglicerol (DG), señales que activan canales de calcio y a la proteína cinasa C, la cual desencadena una serie de respuestas como se observa en la figura 18.

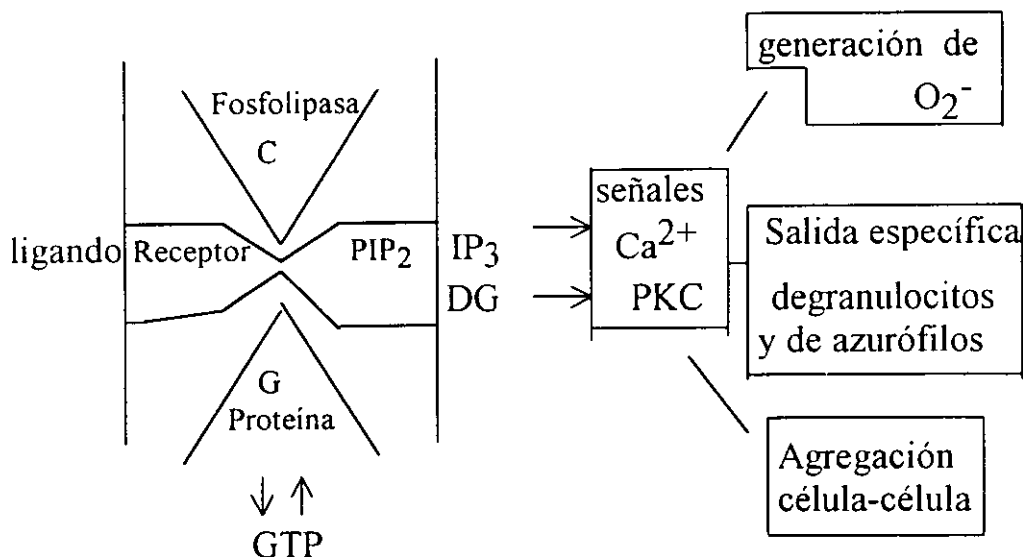


Fig. 18 Señales que se desencadenan en el neutrófilo al ser activado por la unión ligando-receptor.

En relación al efecto del etanol sobre el daño hepático se puede resumir de la siguiente manera:

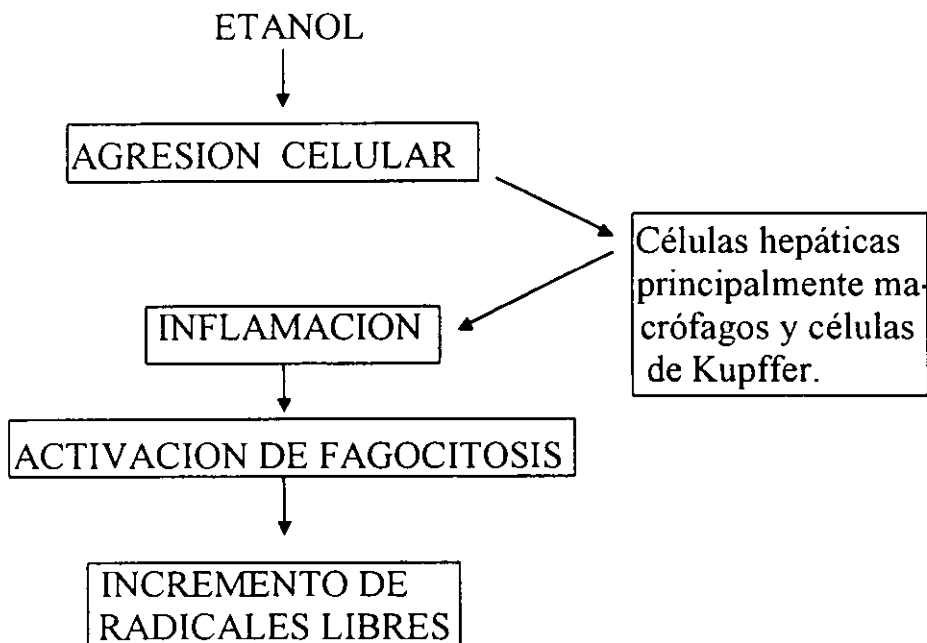


Fig. 19. El etanol, como agresor celular, desencadena la reacción de inflamación en los hepatocitos y la formación de radicales libres.

Cuando por alguna razón aumenta en exceso la producción de radicales libres en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser insuficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidativo, en la cual existe daño celular que puede ser muy severo y conducir a la muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1989) (Fig. 20).

Normalmente en las células y en los organismos en condiciones naturales, se mantiene en equilibrio la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes de manera que la toxicidad del oxígeno solo aparece en los estados patológicos o en el envejecimiento.

La intoxicación etílica produce un aumento en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), en hepatocitos este aumento, se genera como una consecuencia del metabolismo del etanol y en el retículo endoplásmico existe el sistema microsomal oxidante con la participación del citocromo P-450. Existen otros mecanismos en estas células que generan ROS y radicales libres a partir del etanol (Sayed *et al.*, 1996) o por medio del proceso de inflamación. Esto último ha inducido a algunos grupos de investigación a emplear con éxito antiinflamatorios no esteroideos para revertir al menos parte de los efectos tóxicos inducidos por el etanol (Zentella, *et al.* 1992; Zentella, *et al.* 1993; Saldaña, *et al.* 1996).

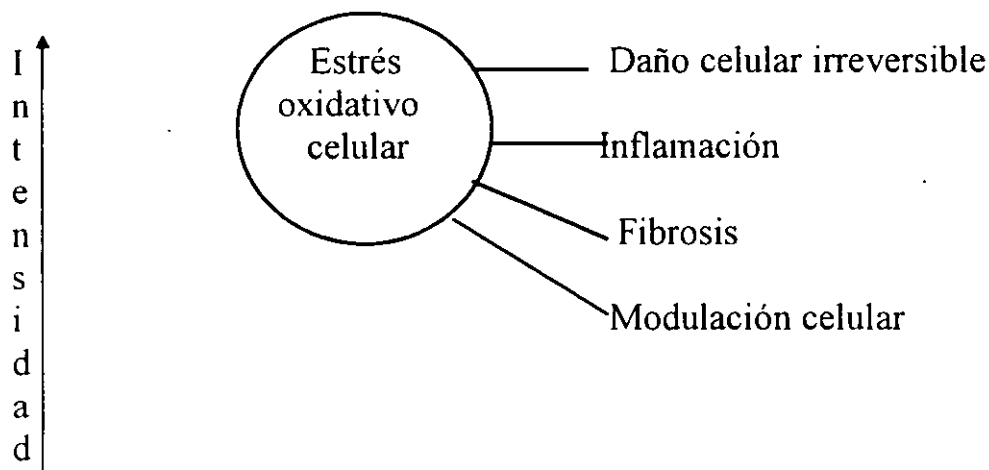


Fig. 20. Dependiendo de la intensidad del estrés oxidativo se compromete proporcionalmente la viabilidad celular.

1.5. AINEs: Los antiinflamatorios no esteroideos.

Los antiinflamatorios no esteroideos son una serie de compuestos que no presentan una similitud química, pero sí comparten acciones terapéuticas y efectos moleculares. Tienen tres acciones principales son: antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos, también disminuyen las constricciones bronquiales y musculares y manifiestan una tendencia a producir irritaciones gastrointestinales (Vane, 1971).

En los Estados Unidos los AINEs son los agentes terapéuticos más prescritos ya que representan el 4.5 % del total de prescripciones y los de uso más común son: aspirina, naproxen, ibuprofen, piroxicam, sulindac e indometacin (Bilodeau *et al*, 1995).

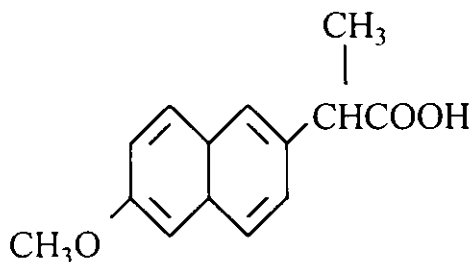
1.5.1. Mecanismos de acción.

Los AINEs actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, sin embargo este hecho no explica todos sus efectos. Las hormonas eicosanoides provienen de ácidos grasos poliinsaturados y se llaman así por tener 20 átomos de carbono y cuatro insaturaciones en la molécula. Se consideran hormonas locales ya que son de vida media corta y alteran actividades de las células donde se encuentran y células adyacentes, dentro de éste grupo se encuentran las prostaglandinas, las prostaciclina, los leucotrienos y los tromboxanos. En general es aceptado que los AINEs inhiben la actividad de las dos ciclooxigenasas (COX-1 constitutiva) y (COX-2 inducible) (Frölich, 1997) y en consecuencia la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Otros tienen acción dual e inhiben también la actividad de la lipooxigenasa y con ello impiden la formación de leucotrienos (Brogden, 1984) (Fig.21).

estimulado (Sagone *et al.*, 1987). Esto sugiere que los AINEs podrían actuar de manera similar reaccionando rápidamente con los radicales, lo cual haría más entendible sus conocidas propiedades antiinflamatorias.

1.5.2. Naproxen.

El ácido 6 metoxi-1-metil-2- naftaleno-acético o naproxen es un antiinflamatorio sistémico muy potente, cuya actividad consiste en la habilidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas (Windholz, 1983). Su fórmula química es la siguiente:



La actividad analgésica del naproxen se ha encontrado siete veces más potente que la de la aspirina en ensayos de laboratorio (Runkel, *et al.* 1972).

El naproxen se absorbe totalmente cuando es administrado por vía oral y la velocidad de absorción depende de la presencia de comida en el estómago.

Las concentraciones pico en plasma ocurren entre 2 y 4 horas después de su administración y su vida media es de 14 horas. La dosis habitual varía de 250 a 500 mg dos veces por día, y se ajusta según la respuesta clínica, el padecimiento y la edad del paciente (Insel, 1990).

Con la administración de 500 mg de naproxen se alcanza una concentración plasmática máxima de 2×10^{-4} M y mínima 6.5×10^{-5} M (Todd y Clissold, 1990).

2. INTRODUCCION

2.1 Planteamiento del problema.

Dos de las características más llamativas de toda materia viviente son el estado dinámico de sus procesos bioquímicos, su metabolismo a nivel subcelular y molecular y su alto grado de organización estructural. Los procesos de evolución han seleccionado y preservado las reacciones y características estructurales que son más útiles y eficientes para permitir que el organismo haga frente y se adapte mejor al medio ambiente (Orten y Neuhaus, 1984).

Los procesos metabólicos en las células normales no ocurren al azar sino que están rigidamente controlados por una serie de frenos y equilibrios intrínsecos y extrínsecos estrechamente interrelacionados. La regulación del estado dinámico del metabolismo se efectúa mediante mecanismos de control genético (grueso) y modulación de actividades enzimáticas celulares (fino) (Orten y Neuhaus, 1984).

Muchas de las reacciones de los organismos vivos tienen por objetivo contrarrestar las alteraciones del medio ambiente. Cualquier modificación es compensada por una serie de mecanismos que tratan de regresar el sistema al estado previo. Estos fenómenos de regulación interna reciben el nombre de homeostasis y se caracterizan, no por la ausencia de cambios, sino por la tendencia hacia el equilibrio a través del control de los cambios (Laguna y Piña, 1991).

Desde hace 30 años los científicos observaron que inmediatamente después de un aumento de temperatura, todas las células, desde las simples bacterias hasta las muy diferenciadas neuronas, aumentan la producción de cierta clase de moléculas que las amortiguan del calor. Estudios posteriores revelaron que ocurría la misma respuesta cuando las células eran expuestas a metales tóxicos, alcohol y algunos venenos metabólicos o en tejidos de niños con fiebre, o en órganos como el corazón en víctimas con ataque cardíaco, o en pacientes con cáncer expuestos a quimioterapia (Welch, 1993). Ya que estímulos tan distintos tienen el mismo tipo de respuesta celular, los científicos se refieren a ella, como respuesta al estrés, en general.

Además se sabe que en un organismo, las interacciones entre los órganos para mantener el balance de energía apropiadamente bajo condiciones de estrés, están controladas en gran parte por señales hormonales (Mathews y Van Holde, 1995).

Una de las respuestas al estrés que produce la administración aguda de

etanol, a la dosis de 5g/kg de peso, es la formación de un hígado graso, debido a una mayor movilización y transporte de ácidos grasos de cadena larga, este proceso es mediado por hormonas como la epinefrina.

Los conceptos generales revisados en esta introducción, son aplicables al presente trabajo experimental en el cual se intenta precisar la posible participación de un antiinflamatorio no esteroideo, el naproxen, al modificar algunas de las respuestas metabólicas al estrés consecutivas a la intoxicación aguda con etanol como es el aumento de la lipólisis del tejido adiposo periférico.

Como se mencionó en los antecedentes el almacenamiento de lípidos, o el uso de los lípidos almacenados (la lipogénesis o la lipólisis) en el seno del tejido adiposo son uno de los fenómenos de regulación interna mejor adaptados para contrarrestar las alteraciones del medio ambiente. Como alteraciones del medio ambiente existen factores nutricionales, nerviosos y químicos que modifican la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo (Tabla 4), entre ellos, la participación de la epinefrina es de primordial importancia.

Uno de los antecedentes a esta tesis se refiere al uso del piroxicam, un AINE, el cual al ser administrado simultáneamente con el etanol, ocasiona un decremento en los principales indicadores característicos de la intoxicación aguda como son: (1) establecimiento de hígado graso debido al acúmulo de triacilglicéridos, (2) aumento de la lipoperoxidación como un indicador de la acción de especies reactivas del oxígeno (ROS) responsables del estrés oxidativo, y (3) descenso de glutatión hepático (Zentella *et al*, 1992; Zentella *et al*, 1993).

El naproxen al ser administrado simultáneamente con el etanol en el animal íntegro es muy efectivo para disminuir los valores de TAG's y TBARS en el hígado de rata comparados con el control a las 8 y 12 horas después del tratamiento (Zentella *et al*, 1993).

Otros experimentos importantes son los que se llevaron a cabo en hepatocitos aislados de rata, en este modelo se evita el flujo de lípidos del tejido adiposo periférico hacia el hígado que sí sucede en el animal íntegro. En hepatocitos aislados incubados con lactato y etanol, el piroxicam de manera dosis-dependiente por si solo aumenta la poza de TAGS y disminuye el contenido de TBARS en células incubadas con etanol, pero no con lactato. La epinefrina bloquea las acciones del piroxicam excepto la disminución del contenido de TBARS. Se puede concluir que el piroxicam ayuda al control del estrés oxidativo en el hepatocito aislado y tiene un efecto opuesto sobre la poza de triacilglicéridos al que se observa en el animal íntegro (Saldaña-Balmori, *et al*, 1996).

Con estos resultados surgió la duda acerca del posible efecto que pudiera tener el piroxicam sobre la lipólisis en adipocitos aislados de rata previamente estimulada con epinefrina. Con ello se fragmentó y simplificó el modelo experimental y se llevó otra vez del animal íntegro a estudios *in vitro*. Estos experimentos ayudan a esclarecer el mecanismo mediante el cual el piroxicam protege al hígado del arribo de triacilglicéridos durante la intoxicación aguda con etanol.

El antecedente inmediato a este trabajo de tesis es el efecto del piroxicam en adipocitos aislados de rata (Pimentel, *et al*, 1996). Los adipocitos fueron incubados en presencia de epinefrina a diferentes concentraciones y una dosis fija de piroxicam y a concentraciones crecientes de piroxicam y una dosis fija de epinefrina. Con estos experimentos se pudo concluir que el piroxicam inhibe el efecto lipolítico mediado por epinefrina.

En consecuencia, en este trabajo de tesis se pretende conocer la eficacia del naproxen, antiinflamatorio no esteroideo representante del grupo de los que tienen ácido propiónico, sobre la lipólisis en adipocitos aislados de rata previamente estimulados con epinefrina, en los cuales se puede tener una respuesta metabólica cuantitativa y muy reproducible. Es importante señalar que los AINEs son un grupo heterogéneo y probablemente presentan diferencias importantes en cuanto a sus efectos y mecanismos de acción, por lo tanto el hecho de que el piroxicam presentara un efecto inhibitorio en la respuesta lipolítica a epinefrina no aseguraba que el naproxen también. Con este modelo se permitirá un estudio más sencillo acerca del posible papel del naproxen interfiriendo con la acción de la epinefrina en la respuesta al estrés oxidativo promovida por el etanol y también ayudará a esclarecer cuál es el mecanismo mediante el cual los AINEs ocasionan un decremento en los principales indicadores de daño característicos de la intoxicación aguda con etanol al ser administrados simultáneamente en el animal íntegro. Se escogió al naproxen por ser un AINE de uso muy extendido y se ha encontrado 7 veces más potente en ensayos de laboratorio que la aspirina (Insel, 1996). Tiene una vida media de 14 horas y al ser administrado por vía oral resulta ser poco agresivo con la mucosa gástrica.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Aislamiento de adipocitos

Se obtuvo tejido adiposo a partir del paquete graso del epidídimo de ratas Wistar, cuyos pesos corporales oscilaban entre 200-240g. Se decapitaron 3 ratas y se les extrajo el paquete graso, se reunieron y se pesaron para obtener el peso húmedo 1.8-2.5 g) y se suspendieron en 2.5 ml de amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato y albúmina al 1%, con un pH de 7.37. Se cortaron en pequeños trozos y se incubaron a 37°C durante 60 minutos en colagenasa tipo 1 de Sigma (1mg/ml). Una vez disgregados los adipocitos se filtraron a través de una doble capa de gasa y se centrifugaron 3 veces durante 2 minutos a 1000 rpm cambiando cada vez de amortiguador y al final, se determina nuevamente el peso húmedo y se lleva a un volumen conocido.

3.2. Soluciones.

1.- Soluciones de epinefrina y naproxen a diferentes concentraciones

Se preparó una solución 10^{-2} M de epinefrina y a partir de esta solución stock se hicieron las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} M.

Se preparó una solución 10^{-2} M de naproxen, disuelto en amortiguador de glicil/hidrazina/MgCl₂ pH 9.8. A partir de esta solución stock se hicieron las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} M.

2.- Amortiguador glicil/hidrazina/MgCl₂

Se prepararon 100 ml de una solución 0.2 M de glicina, 1M de hidrazina y 2 mM de MgCl₂, a la cual se le ajustó el pH a 9.8 con KOH.

3.- Solución 50mM de ATP de Sigma.

4.- Solución 20mM de NAD de Sigma.

5.- Solución Ringer-Krebs con albúmina al 3%.

Se toman 100 ml de NaCl al 4.5% , 4ml de KCl al 7% , 1ml de

KH_2PO_4 al 10.5% , 1 ml de MgSO_4 al 19.1% , 5 ml de NaHCO_3 al 6.5%.

Se llevó la solución a un volumen de 625 ml con agua destilada y se adicionó CaCl_2 1.2 mM. Se aereó 15 minutos con carbógeno (O_2 95% CO_2 5%) a 37°C y después se ajustó el pH entre 7.35-7.4 con la solución de NaHCO_3 . Se le agregó el peso correspondiente al 3% de albumina.

3.2.1. Enzimas.

- 1.- Glicerolcinasas (*Candida micoderma*) 0.85 kU/l de Sigma
- 2.- Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (músculo de conejo) 17 kU/l de Sigma

3.3. Procedimiento.

Se hicieron cuatro diferentes series de experimentos:

1.- La primer serie se hizo con concentraciones crecientes de epinefrina, obteniéndose así una curva dosis-respuesta de epinefrina como se ejemplifica en la figura 22. A partir de la cual se pudo determinar la dosis efectiva media (DE50).

2.- La segunda serie se hizo con concentraciones crecientes de naproxen, obteniéndose así una curva dosis-respuesta de naproxen como se ejemplifica en la figura 23. A partir de la cual se pudo determinar la DE50.

Con las DE50 de naproxen y epinefrina como hicieron las otras dos series de experimentos.

3.- Se hizo la misma curva dosis-respuesta de epinefrina como en la serie 1 y, a cada tubo, se le adicionó la DE50 de naproxen, incluyendo el control (Fig.24).

4.- Se hizo la misma curva dosis-respuesta de naproxen que en la serie 2 y, a cada tubo, se le adicionó la DE50 de epinefrina, incluyendo el control (Fig.25).

Para cada serie de experimentos se llevo a cabo el mismo procedimiento con el fin de conocer el efecto sobre la lipólisis en adipocitos aislados de epidídimo de rata tratados con epinefrina y/o naproxen.

Se incubaron en un volumen final de 2 ml de solución Krebs-Ringer con albúmina al 3% y pH = 7.37, 200 μ l de solución de adipocitos, (estos 200 μ l contienen adipocitos con un peso determinado por el peso húmedo y el volumen final al cual fueron llevados) y 20 μ l de epinefrina y/o naproxen según sea el caso. Se incubaron durante 90 minutos a 37°C.

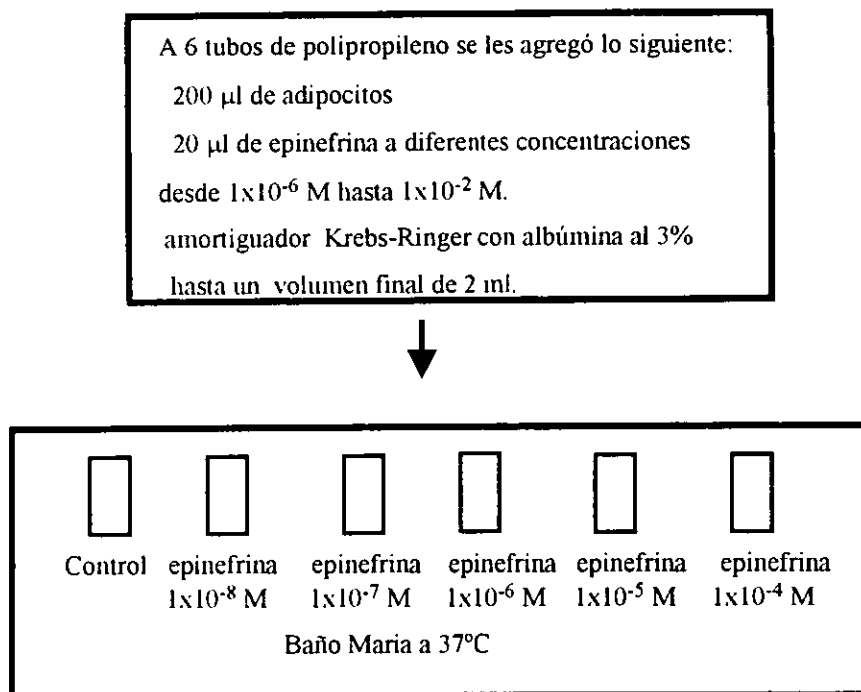


Fig. 22 Diseño experimental de la curva dosis-respuesta epinefrina.

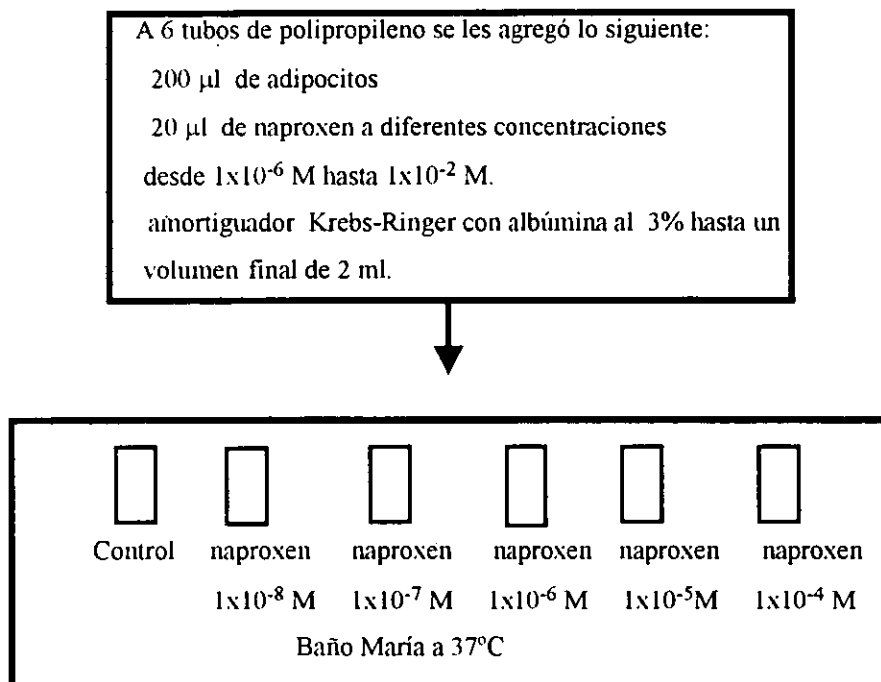


Fig. 23 Diseño experimental de la curva dosis-respuesta naproxen.

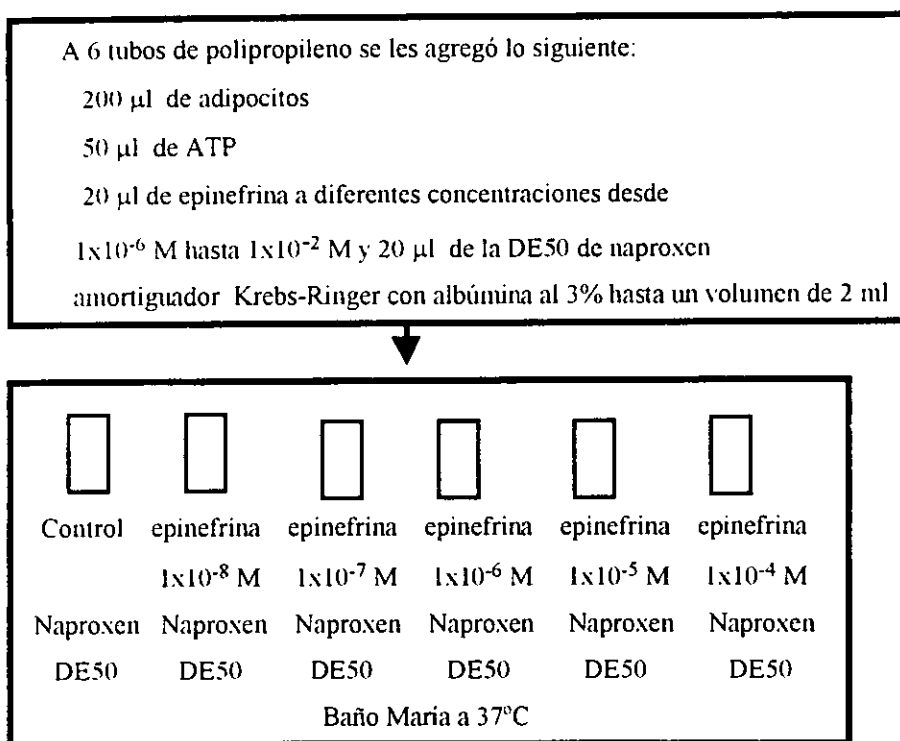


Fig. 24 Diseño de la curva dosis-respuesta epinefrina y la E50 de naproxen.

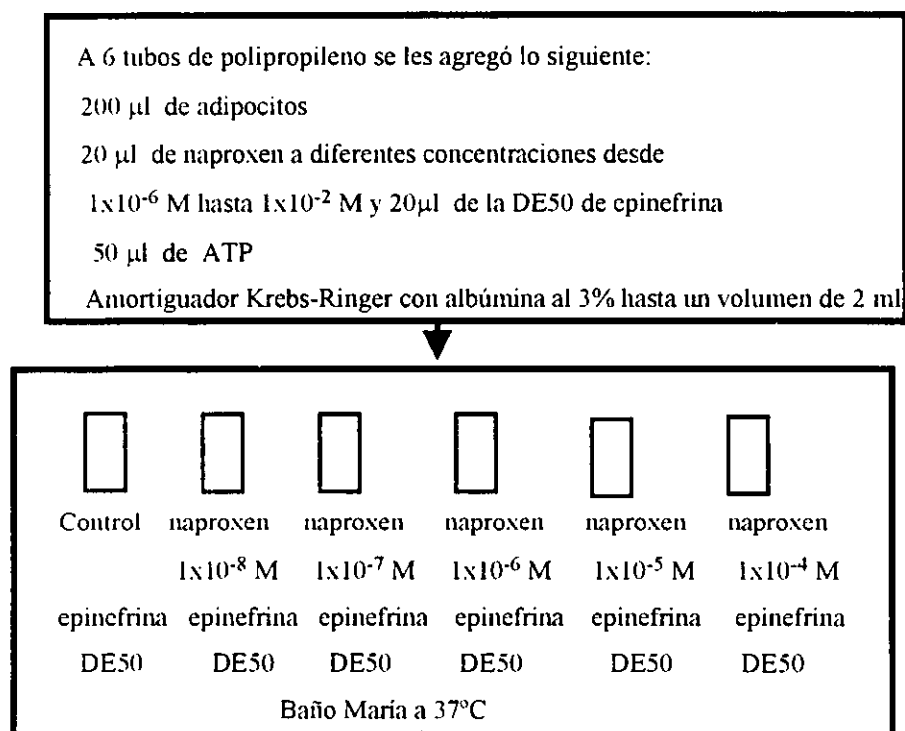


Fig. 25 Diseño de la curva dosis-respuesta naproxen y la E50 de epinefrina.

3.4. Determinación de la cantidad de glicerol

Para cada experimento se midió la formación de glicerol siguiendo la técnica de Otto H. Wieland (Wieland, 1984). Los 6 tubos con las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm durante 10 minutos. A 6 celdas de cuarzo se les agregaron 7.3 μl de glicerolcinasasa, 4 μl de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, 50 μl de ATP, 100 μl de la muestra correspondiente y se llevó a un volumen de 950 μl con amortiguador de glicina/hidrazina/ MgCl_2 . Se agitó por inversión y se leyó en el espectrofotómetro a 339 nm obteniendo el tiempo ($t_1=0$). Se agregan 50 μl de NAD y se leyó a los 60 minutos ($t_2=60\text{min.}$) (Fig 26). Los datos de densidad óptica corresponden al incremento en la formación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y se interpolaron en una curva estándar de glicerol para conocer las cantidades de glicerol que se formaron durante los 90 minutos de incubación con los diferentes tratamientos.

Posteriormente se hicieron los cálculos necesarios para expresar las unidades en μmol de glicerol por gramo de peso húmedo de adipocitos y por hora de incubación (ver apéndice).

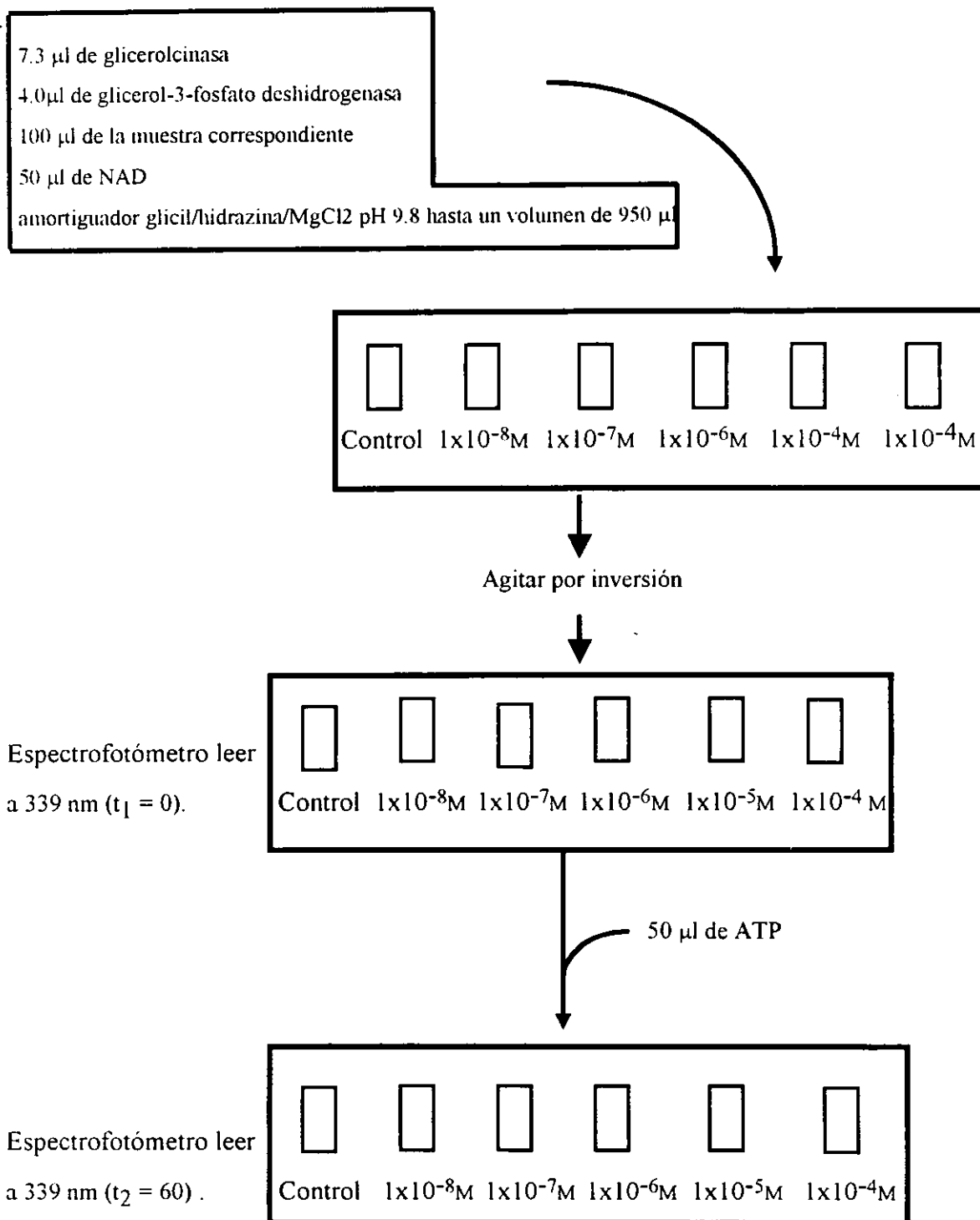
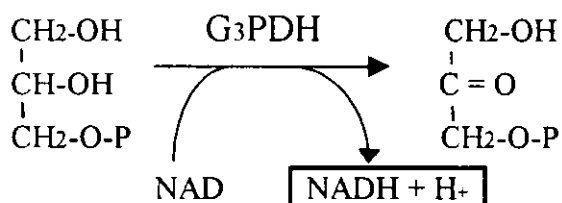
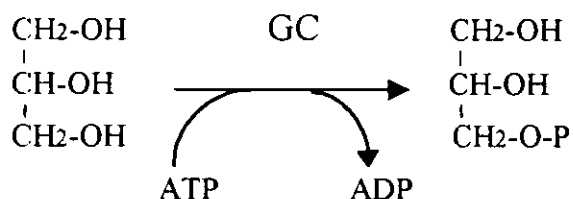


Fig. 26 Diseño experimental para determinar la cantidad de glicerol que se formó durante una hora de incubación dependiendo de cada tratamiento.

3.5. Curva estándar de glicerol

La determinación de glicerol proporciona una medida de la lipólisis; el glicerol formado durante este proceso es un indicador de la actividad de la lipasa sensible a hormonas, en este caso a la epinefrina, ya que esta enzima actúa sobre los triacilglicéridos formándose glicerol y ácidos grasos.

De acuerdo a las siguientes reacciones:



A partir de glicerol por medio de la actividad de la glicerolcinas (GC) se forma glicerol -3-fosfato, el cual por medio de la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa forma dihidroxiacetona fosfato. En esta última reacción se forma $\text{NADH} + \text{H}^+$. Lo que se mide en el espectrofotómetro a 339 nm es la absorbancia del $\text{NADH} + \text{H}^+$.

En celdas de cuarzo de 1 ml se agregaron 7.3 μl de glicerolcinas, 4 μl de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, 50 μl de NAD, glicerol 1×10^{-3} M (20 μl , 30 μl , 50 μl , 100 μl) buffer de glicil/hidrazina/ MgCl_2 hasta completar un volumen de 950 μl y se agitó por inversión. Se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 339 nm obteniéndose así el tiempo ($t_1=0$). Se agregaron 50 μl de ATP y se leyó después de una hora ($t_2=60\text{min}$) (Fig. 27). Se restó la lectura $t_2 - t_1$ para cada cantidad conocida de glicerol y se obtuvo así el incremento en la formación de NADH.

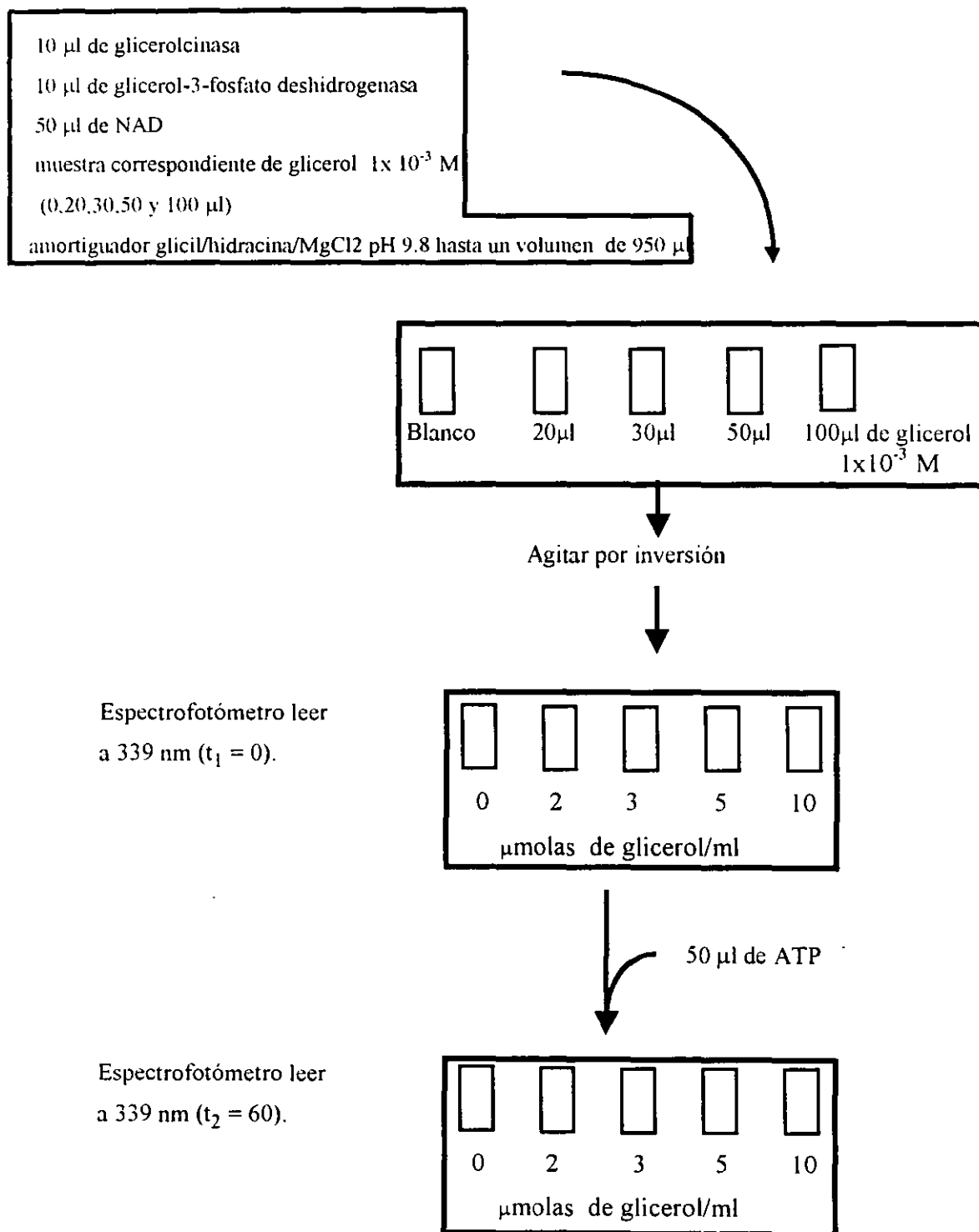


Fig 27. Diseño experimental para la elaboración de la curva estándar de glicerol donde se muestran las concentraciones finales para cada muestra.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de la curva estándar de glicerol.

Los datos obtenidos de la curva estándar de glicerol (Fig. 28) muestran que a mayor cantidad de glicerol 0.01M mayor es la absorbancia por el NADH. A partir de esta curva por interpolación se calcularon las cantidades de glicerol presentes en las muestra analizadas.

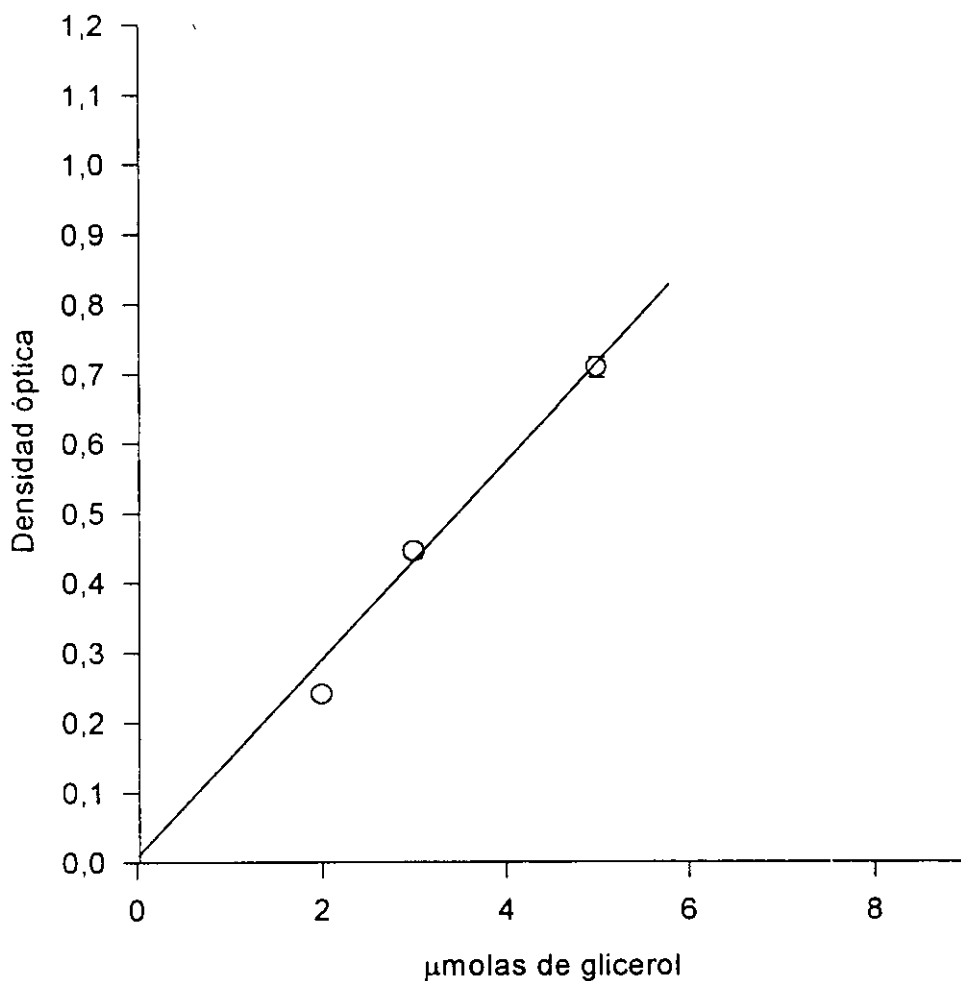


Fig. 28 Curva estándar representativa de glicerol con una $r^2 = 0.98$

4.2. Obtención de la curva dosis-respuesta de epinefrina

La epinefrina es una hormona que se libera como respuesta fisiológica en una situación de estrés, el efecto de la epinefrina, es entre otros, estimular vías metabólicas productoras de substratos energéticos como por ejemplo: glucogenólisis y lipólisis. La magnitud del estímulo se mide para el caso de la glucogenólisis por una mayor disponibilidad de glucosa en sangre y para la lipólisis por una mayor producción de ácidos grasos y glicerol. Los resultados de cada experimento (Tabla 1 del apéndice) muestran que entre mayor sea la concentración de epinefrina habrá más liberación de glicerol. Con estos datos se elaboró una curva dosis-respuesta de epinefrina (fig. 29). El control no tiene epinefrina y se emplea como referencia de la lipólisis basal.

A partir de esta curva se determinó la dosis efectiva 50 de la epinefrina, la cual es de $3 \times 10^{-6} \text{M}$.

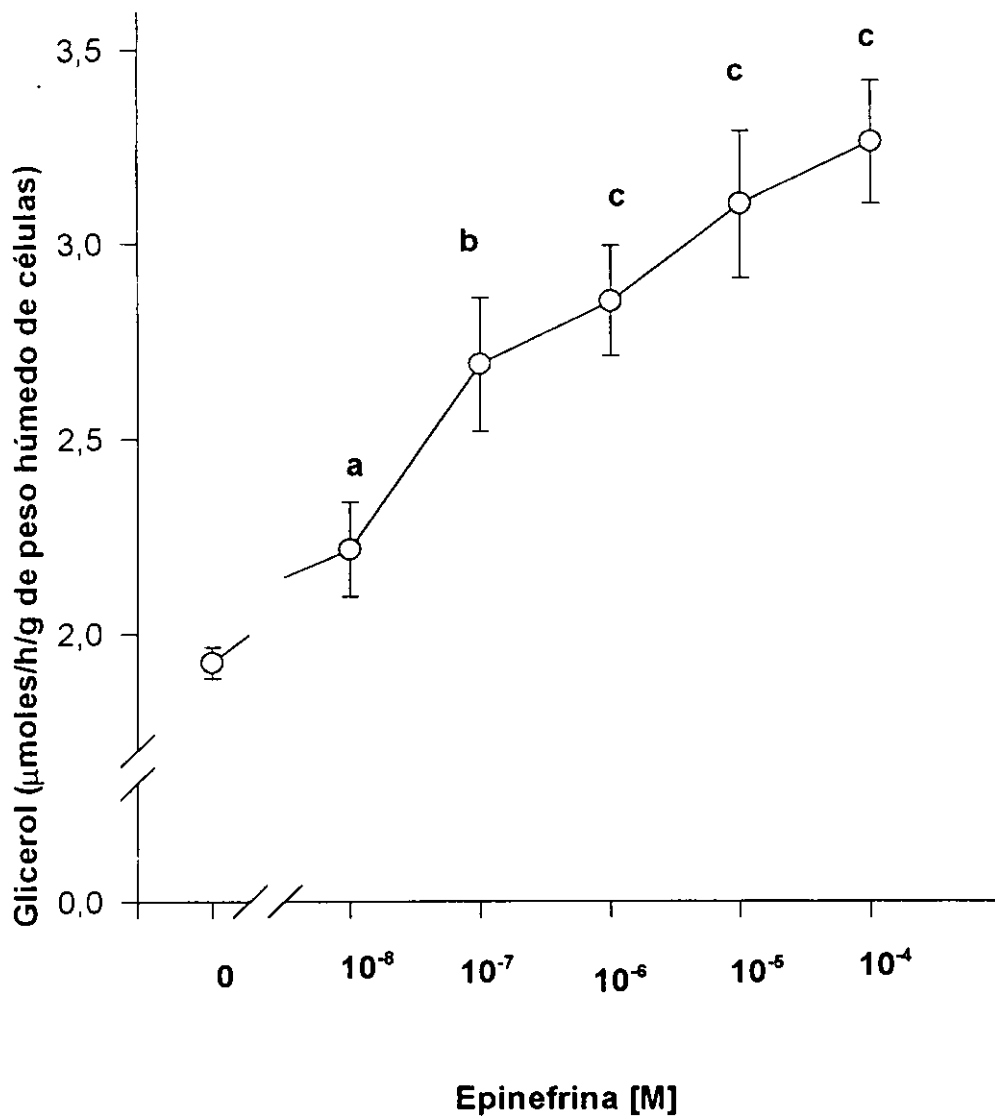


Fig 29. Efecto de diferentes concentraciones de epinefrina en la liberación de glicerol en adipocitos aislados de epidídimo de rata. El grupo control está marcado como (0). Los adipocitos fueron incubados 90 minutos a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina. Las barras verticales representan el error estándar (ES) para 9 experimentos. Comparando con el grupo control $^a p < 0.05$, $^b p < 0.01$, $^c p < 0.001$.

4.3. Obtención de la curva dosis-respuesta de naproxen

Se realizaron una serie de experimentos con el fin de conocer si el naproxen tiene algún efecto de inhibir o estimular la lipólisis en adipocitos asilados de epidídimo de rata. Estos experimentos (Tabla 3 del apéndice) indican que el naproxen por sí solo tiene efecto sobre la lipólisis. En la curva dosis-respuesta de naproxen (Fig. 30) se muestra el comportamiento dual a concentraciones bajas estimula y a concentraciones elevadas inhibe el efecto, siendo el valor de la concentración $1 \times 10^{-7} \text{M}$ el más elevado.

Con estos resultados se pretendía determinar la DE50 del naproxen, pero en vista del comportamiento de la curva se seleccionó el valor $3 \times 10^{-7} \text{M}$, por ser una concentración en donde probablemente estén operando los dos mecanismos sin bloquearse totalmente uno a otro, el de estimulación y el de inhibición de la estimulación.

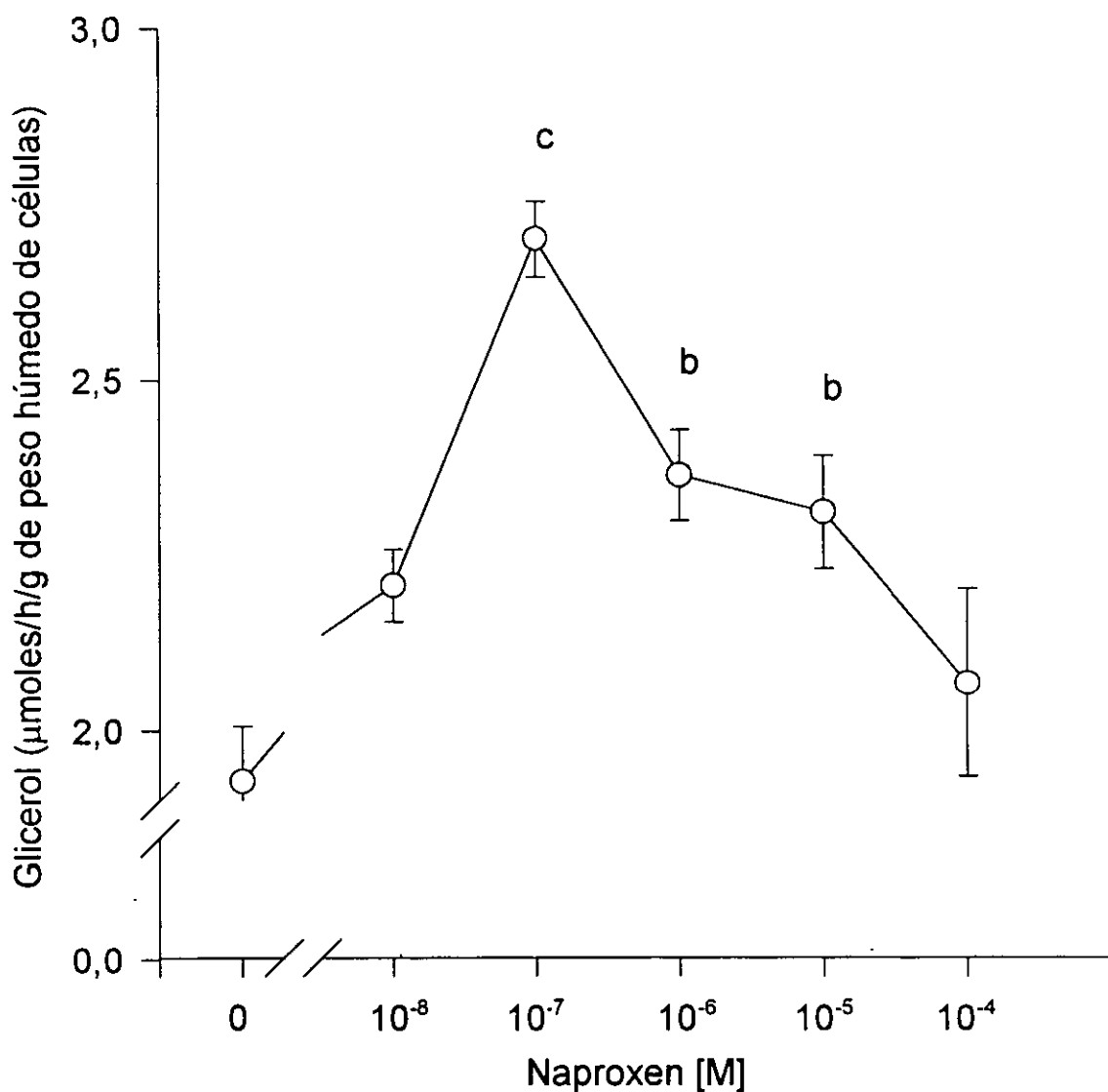


Fig. 30. Efecto de diferentes concentraciones de naproxen en la liberación de glicerol en adipocitos aislados de epidídimo de rata. El grupo control está indicado como (0). Los adipocitos fueron incubados 90 minutos a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de naproxen. Se realizaron cuatro experimentos y las barras verticales representan el error estándar (ES). Comparando con el grupo control ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$.

4.4. Adipocitos incubados con epinefrina a diferentes concentraciones y una concentración fija de naproxen.

Al incubar adipocitos con epinefrina ocurre la respuesta fisiológica que se da después de cualquier situación que estimula al eje pituitario-adrenal como sucede en situaciones de estrés.

Considerando las evidencias que apoyan la eficacia del piroxicam para evitar la respuesta fisiológica a epinefrina y con ello el aumento de grasa hepática (Zentella *et al*, 1993) se hicieron una serie de experimentos con adipocitos incubados en presencia de epinefrina a concentraciones crecientes y una concentración constante de naproxen ($3 \times 10^{-7} \text{M}$) (Tabla 3 del apéndice) para saber si el naproxen es capaz de inhibir la lipólisis previamente estimulada con epinefrina, los datos graficados en la (Fig. 31), muestran que a concentraciones altas de epinefrina hay una tendencia a incrementar la inhibición. En la figura 32 se comparan las dos curvas de epinefrina con y sin naproxen $3 \times 10^{-7} \text{M}$ y se observa que hay una inhibición de la lipólisis estimulada con epinefrina en la concentración más alta de epinefrina.

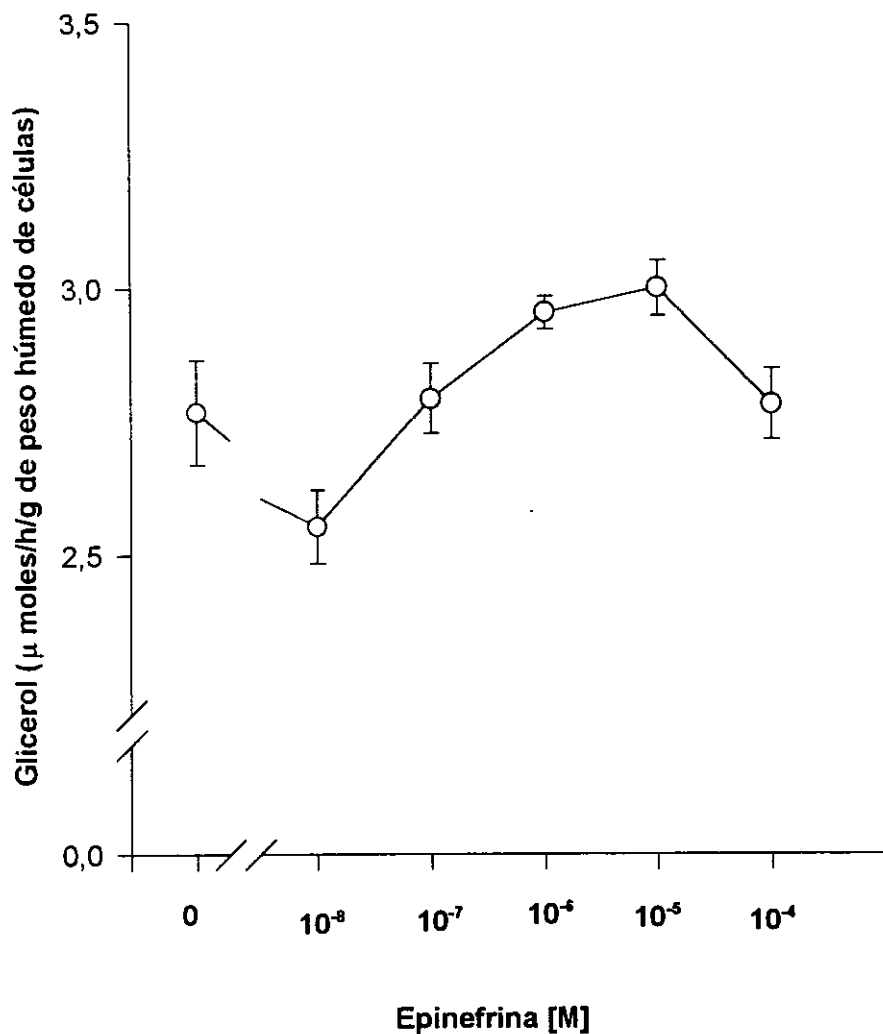


Fig 31. Efecto de diferentes concentraciones de epinefrina en la liberación de glicerol en adipocitos aislados de epidídimo de rata. El grupo control está marcado como (0). Los adipocitos fueron incubados 90 minutos a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina y la dosis de naproxen $3 \times 10^{-7} M$. Se realizaron cuatro experimentos y en ninguna concentración las diferencias fueron significativas cuando se compara con el control.

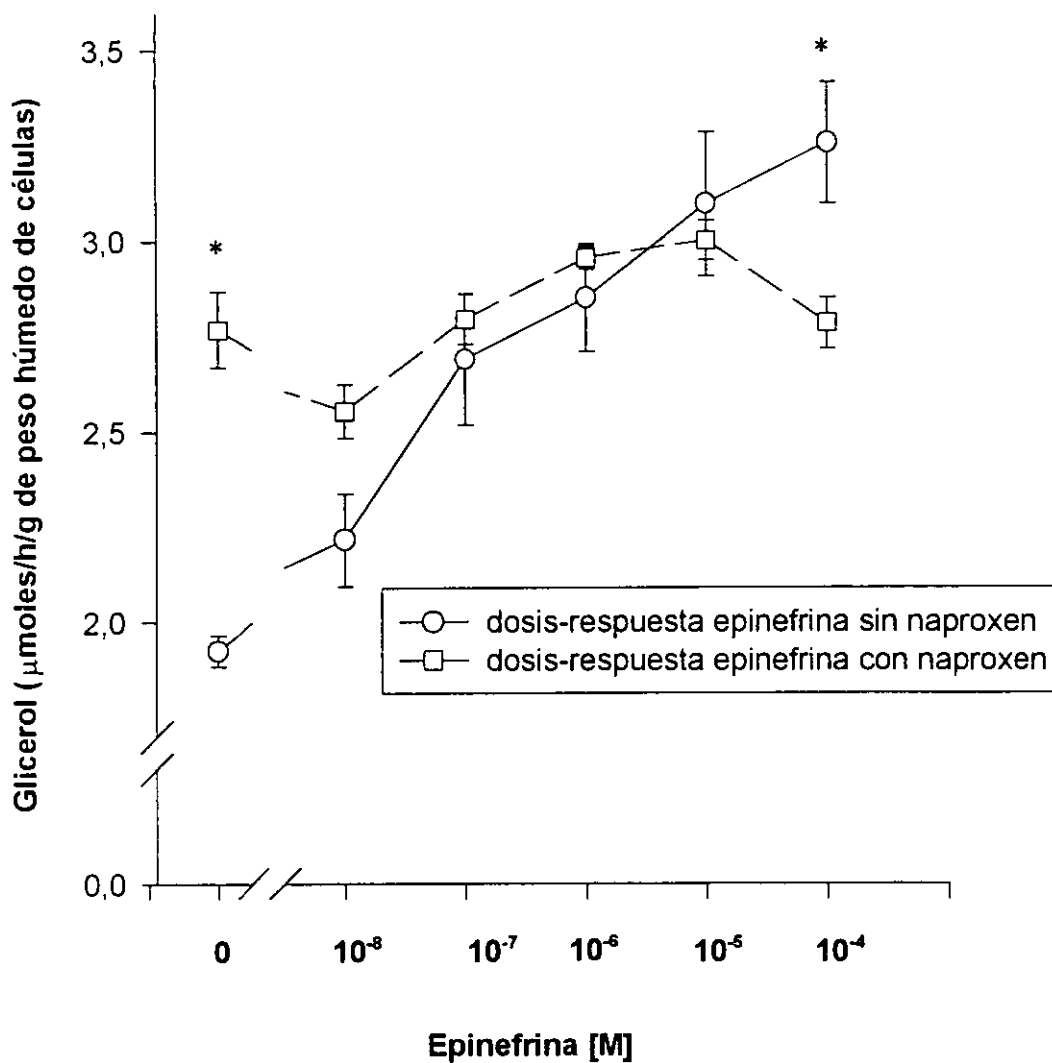


Fig. 32. Comparación del efecto de las diferentes concentraciones de epinefrina con y sin naproxen en la liberación de glicerol en adipocitos aislados de rata. Los adipocitos fueron incubados 90 minutos a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina (-o-) y concentraciones crecientes de epinefrina y la dosis de naproxen = $3 \times 10^{-7} M$ (-□-). * $p < 0.05$ al comparar las dos curvas.

4.5. Adipocitos incubados con naproxen a diferentes concentraciones y una concentración fija de epinefrina.

Para conocer la eficacia del naproxen en relación a su concentración en presencia de epinefrina, se hicieron experimentos incubando adipocitos a diferentes concentraciones de naproxen y la DE 50 de epinefrina = $3 \times 10^{-6} \text{M}$ (tabla 4 del apéndice). Con los valores obtenidos se hizo una gráfica (fig.33) donde se puede apreciar un comportamiento semejante al de la curva dosis-respuesta de naproxen, sólo que en este caso, el control presenta una mayor liberación de glicerol y las diferencias son significativas para los valores correspondientes a las concentraciones $1 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-6} \text{M}$. En la figura 34 se comparan las curvas de naproxen con y sin epinefrina.

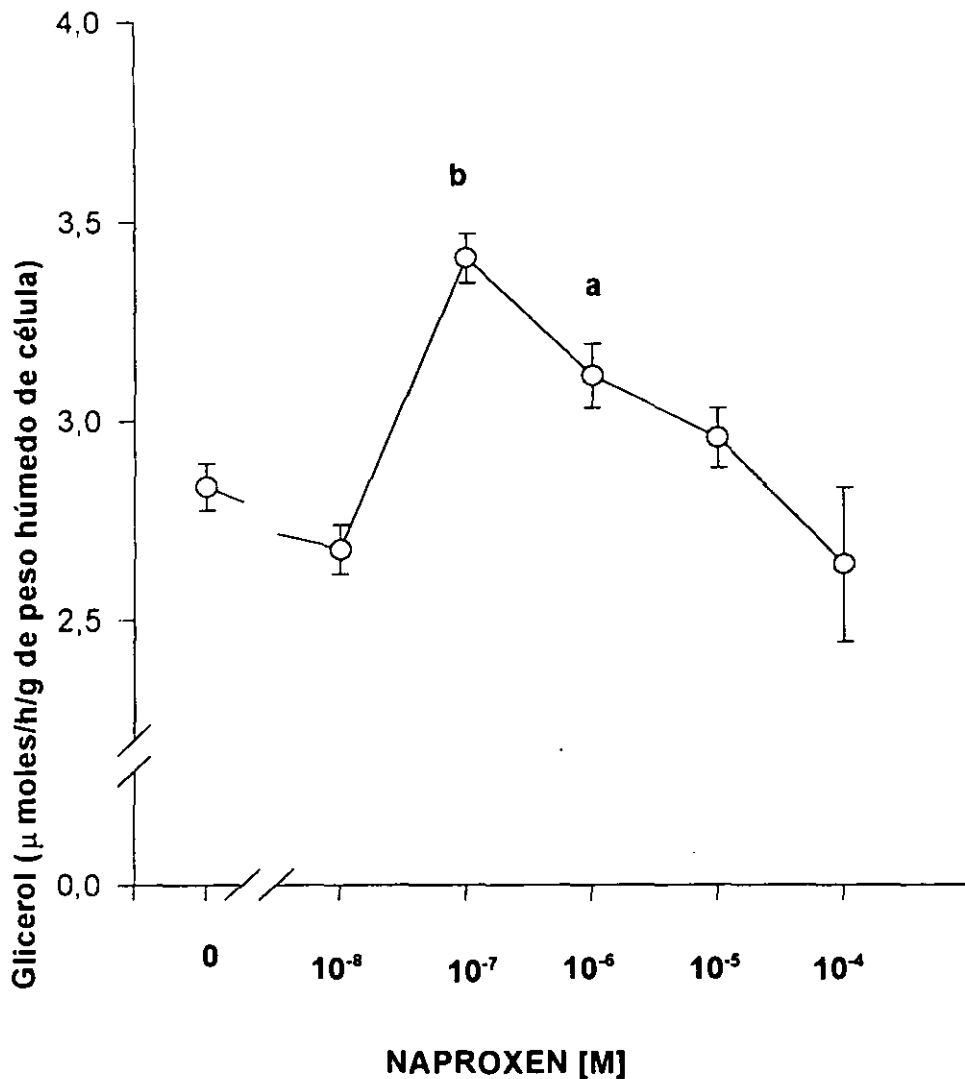


Tabla 33. Curva dosis-respuesta de naproxen sobre la lipólisis de adipocitos aislados de epidídimo de rata incubadas con epinefrina ($DE50$ $3 \times 10^{-6} M$) y concentraciones crecientes de naproxen expresadas como μ moles de glicerol liberadas por gramo de peso húmedo por hora de incubación (μ moles de glicerol /g/h). Las barras verticales representan el error estándar (ES) para 4 experimentos. $a p < 0.05$, $b p < 0.01$ con respecto al control.

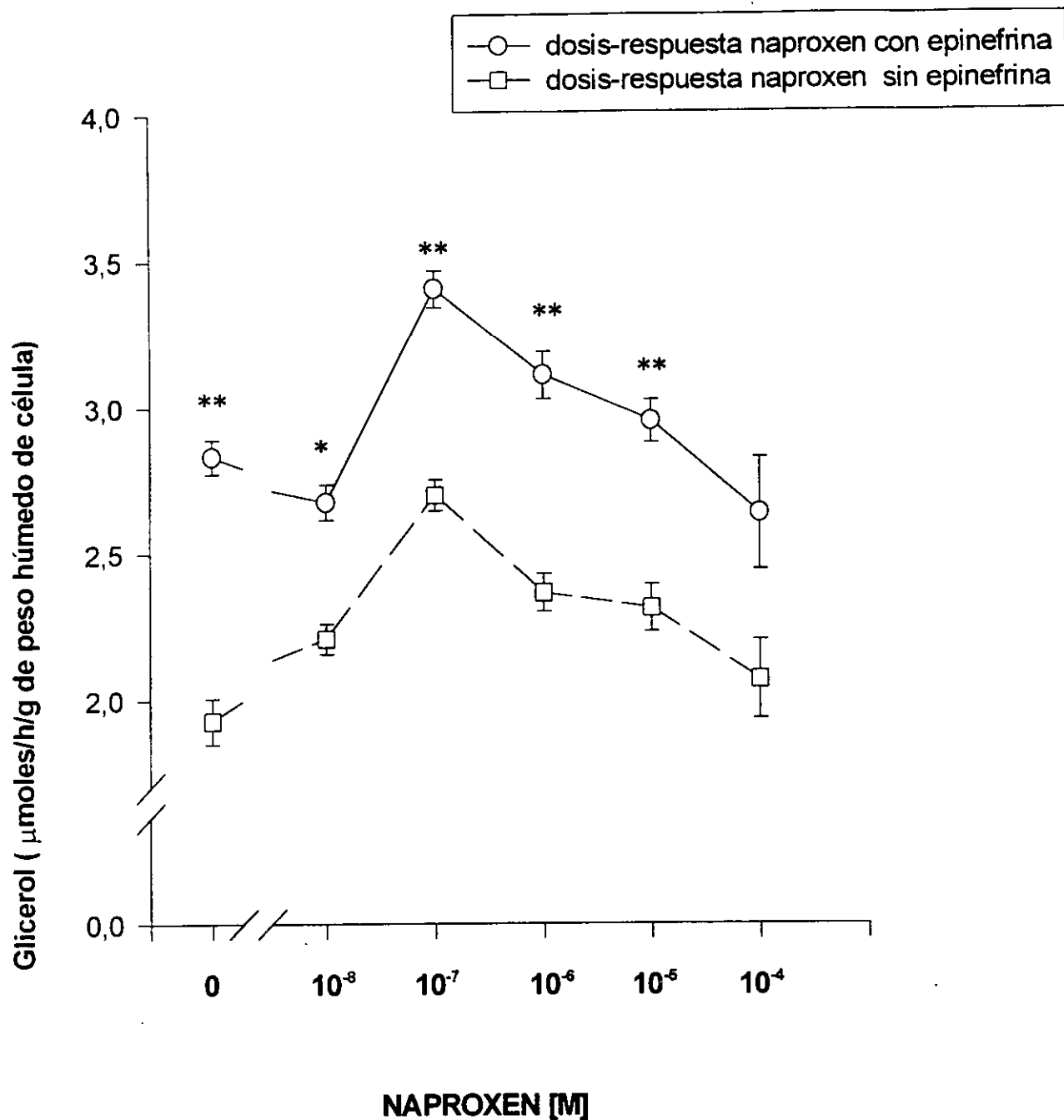


Fig 35. Efecto de diferentes concentraciones de naproxen en la liberación de glicerol en adipocitos aislados de epidídimo de rata. Los adipocitos fueron incubados 90 minutos a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de naproxen (-o-) y en presencia de concentraciones crecientes de naproxen y la DE50 de epinefrina = $3 \times 10^{-6} M$ (-□-). Se realizaron cuatro experimentos por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ al comparar las dos curvas.

5. DISCUSION

En la literatura biomédica existen datos desde el año de 1965 (Lieber, *et al.* 1966) (Poggi y Di Luzio, 1964), sobre la producción de hígado graso después de una dosis elevada de etanol (más de 5 g por kg de peso corporal), también existen datos sobre la inhibición de este efecto cuando se administra en forma simultánea el etanol con algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Zentella, *et al.* 1992; Zentella, *et al.* 1993). Por otro lado la composición de los lípidos acumulados en el hígado después de una intoxicación aguda con etanol es semejante a la de los lípidos de tejido adiposo periférico (Mallov, 1957). Entre las diversas explicaciones, la más viable en este caso, es considerar la administración aguda de etanol, como una situación de estrés tóxico y como es de esperarse una situación de este tipo va acompañada de una descarga adrenérgica que estimula varios caminos metabólicos, entre ellos la lipólisis en tejido adiposo. Como resultado se tiene una liberación de glicerol y ácidos grasos que viajan hacia el hígado en donde se reesterifican y aumenta el contenido de triacilglicéridos hepáticos. De todo lo anterior puede desprenderse que algunos AINEs tendrían como posible mecanismo de acción una inhibición de la lipólisis estimulada por epinefrina en tejido adiposo periférico. Para el piroxicam esta hipótesis ha sido comprobada (Pimentel, *et al.* 1996), mientras que para el naproxen se analizarán a continuación los resultados de esta tesis para establecer su comportamiento

Los resultados de esta tesis muestran que la estimulación de la lipólisis medida como glicerol liberado, se lleva a cabo en forma dosis-dependiente a las concentraciones de epinefrina empleadas (1×10^{-8} hasta 1×10^{-4}). Estos datos son comparables a los registrados por otros autores (Rodbell, 1964). Puede observarse un estímulo inicial del 15% a la dosis 1×10^{-8} M de epinefrina, este estímulo es significativo con una $p < 0.05$. A la concentración de 1×10^{-7} M la estimulación registrada corresponde a un 40% con una $p < 0.01$. Las concentraciones de 1×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M no representan diferencias significativas entre ellas pero cuando se comparan con el control se obtiene una $p < 0.001$ (fig. 29)

Esta primera parte de los experimentos es la que permite asegurar la confiabilidad de los resultados experimentales obtenidos, ya que demuestra que el sistema funciona, es decir, que los receptores membranales de los adipocitos reconocen a la epinefrina y se lleva a cabo la cadena de reacciones descrita en la figura 15, obteniéndose a partir de triacilglicéridos: glicerol y ácidos grasos, los cuales salen al medio de incubación y pueden ser medidos.

En relación a la acción del naproxen sobre la lipólisis, a concentraciones crecientes de 1×10^{-7} hasta 1×10^{-5} M, puede observarse un

efecto estimulante sobre la lipólisis basal, con un máximo a la dosis de 1×10^{-7} M. El efecto estimulante no se observa a las concentraciones 1×10^{-4} y 1×10^{-8} M. Existen diferencias significativas a las dosis de 1×10^{-7} , 1×10^{-6} y 1×10^{-5} cuando se comparan con el control ($p < 0.001$, 0.01 y de 0.01 respectivamente) (fig.30). Al obtener los resultados de la curva dosis respuesta de naproxen, se observó un comportamiento bifásico a bajas concentraciones estimula y a altas inhibe el estímulo, debido a esto, se seleccionó una concentración intermedia entre los dos efectos sin que se bloqueen totalmente uno al otro (3×10^{-7} M), a pesar de que no corresponde a la DE50.

Cuando se incuban los adipocitos con concentraciones crecientes de epinefrina y una dosis fija de naproxen 3×10^{-7} M, se observó que en ninguna concentración utilizada la diferencia es significativa (Fig. 31). Así, la estimulación inicial de la lipólisis inducida por naproxen (3×10^{-7} M), no se incrementa por la presencia de dosis crecientes de epinefrina, e inclusive a la concentración más alta de epinefrina (1×10^{-4} M), se observa una inhibición significativa en comparación a la respuesta obtenida en ausencia de naproxen.

El mecanismo mediante el cual el naproxen inhibe el efecto de la epinefrina a altas concentraciones no se puede explicar con este sistema. Son necesarios otro tipo de estudios para poder contestar la pregunta antes planteada y llegar a dilucidar si el naproxen actúa a nivel del receptor adrenérgico o del segundo mensajero o si su acción es directa en la lipasa hormona-sensible y, saber, por qué depende de la concentración de epinefrina para llevar a cabo la inhibición del estímulo.

Al incubar adipocitos con naproxen a diferentes concentraciones (1×10^{-8} hasta 1×10^{-4} M) y la dosis efectiva media de epinefrina 3×10^{-6} M, se trataba de conocer el comportamiento del naproxen a diferentes concentraciones en presencia de la misma concentración de epinefrina (Fig. 34). Lo que se observa es que en la concentración 1×10^{-7} M se suman los efectos de estimulación tanto de la epinefrina como del naproxen, hay un efecto aditivo y a partir de ese punto a mayor concentración de naproxen menor es la lipólisis hasta regresar a los valores del control, que si tiene epinefrina. Comparando los valores control con y sin epinefrina hay una diferencia significativa $p < 0.01$. Con lo cual se puede concluir que el efecto del naproxen es aparentemente independiente del efecto de la epinefrina. A concentraciones bajas de naproxen hay una doble estimulación por la presencia de epinefrina y a concentraciones altas de naproxen sólo se observa la estimulación inducida por la epinefrina.

En esta tesis se presentan datos que permiten establecer que sólo a concentraciones muy elevadas de epinefrina, iguales a las que se podrían presentar en situaciones de estrés, el naproxen bloquea parcialmente la lipólisis estimulada por epinefrina en adipocitos aislados de rata. En reposo

la concentración de epinefrina es $0.38 \times 10^{-9}M$ y durante el ejercicio fuerte es de $2.3 \times 10^{-6}M$ y durante un trauma o ejercicio prolongado puede aumentar de 10 a 20 veces (Kraenzlin, 1989).

Resulta interesante constatar que mientras que para el piroxicam se observa la inhibición a concentraciones bajas identificadas como fisiológicas de epinefrina, para el caso de naproxen no es sino hasta la concentración $1 \times 10^{-4}M$, en la cual el resultado es significativo ($p < 0.05$).

Para el caso de la aspirina (ácido acetilsalicílico) solamente se tienen datos de la sal sódica del ácido salicílico y su interacción con agentes lipolíticos diferentes a la epinefrina como son el glucagon, dexametasona, hormona corticotrópica (ACTH), dibutilil AMPc, teofilina y DL-arterenol (Stone, *et al.* 1969). En este estudio los autores concluyen que el salicilato de sodio disminuye la lipólisis estimulada con LD-arterenol, glucagon, ACTH, teofilina y altas y bajas concentraciones de dibutilil AMPc más teofilina. De manera semejante a la adenosina, insulina, tolbutamida y fenformin, el salicilato de sodio inhibe la lipólisis estimulada.

Hasta aquí es posible concluir que el efecto inhibitorio de los AINEs sobre la lipólisis estimulada en adipocitos aislados es característico del AINE estudiado.

Las diferencias entre los tres AINEs arriba mencionados puede asociarse a otros resultados registrados en el laboratorio en relación al consumo de oxígeno por la mitocondria, en donde el piroxicam por ejemplo estimula el estado basal (estado 4) en un 90%, mientras que el naproxen no tiene ningún efecto sobre el consumo de oxígeno mitocondrial en estado 4 y la aspirina a concentraciones de $1 \times 10^{-3}M$ lo estimula en un 173% (Riveros-Rosas, 1996).

6. CONCLUSIONES

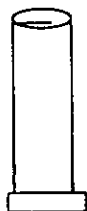
- El sistema de adipocitos aislados funciona, ya que la curva dosis-respuesta de epinefrina está dentro de los valores reportados en la literatura.

- El naproxen inhibe la lipólisis estimulada por epinefrina en adipocitos aislados de rata a concentraciones elevadas de epinefrina, iguales a las que se podrían presentar en situaciones de estrés. A diferencia del piroxicam que su efecto se observa desde concentraciones bajas conocidas como fisiológicas. Esto sugiere que cada AINE (naproxen y piroxicam) actúa de forma distinta en cuanto al control del hígado graso cuando se administra simultáneamente con el etanol en el animal integro, pero el resultado final es el mismo: un efecto hepatoprotector.

- El efecto inhibitorio de la lipólisis estimulada en adipocitos aislados tiene su particularidad para cada AINE estudiado.

7. APENDICE

7.1. Apéndice de material y método.



adipocitos con Ringer-Krebs en un volumen de 2 ml.

El peso de los adipocitos es conocido y el volumen en el que se encuentran también, de ahí, se determinan los gramos de adipocitos que hay en los 200 ml de alicuota que se ponen por tratamiento.



adipocitos suspendidos en Ringer-Krebs y epinefrina y/o naproxen en un volumen de 2 ml.

Con el peso anteriormente determinado y el nuevo volumen en el que se encuentran los adipocitos, se calculan cuantos gramos (x) hay en los 100 μ l de alicuota que se ponen por cuveta de cuarzo.

El valor de densidad óptica se interpola en la curva estándar de glicerol y se determinan las μ molas de glicerol. Conociendo el peso de los adipocitos que hay por cuveta de cuarzo y las μ molas de glicerol se puede conocer cuántas μ molas de glicerol hay por gramo y por hora de incubación.

7.2. Apéndice de resultados.

Tabla 1. Curva dosis-respuesta de epinefrina sobre la lipólisis en adipocitos de epidídimo incubados con concentraciones crecientes de epinefrina. μmol de glicerol liberadas por gramo de peso húmedo por hora de incubación (μmol de glicerol/g/h).

	μmol de glicerol/g/h	μmol de glicerol/g/h	μmol de glicerol/g/h	μmol de glicerol/g/h	μmol de glicerol/g/h
Control	1.94	2.20	1.90	1.86	1.96
$1 \times 10^{-8}\text{M}$	2.55	1.21*	2.42	2.49	3.25
$1 \times 10^{-7}\text{M}$	2.80	3.02	3.40	2.55	3.44
$1 \times 10^{-6}\text{M}$	3.18	3.25	3.14	3.27	3.08
$1 \times 10^{-5}\text{M}$	2.32	3.83	3.65	3.80	3.02
$1 \times 10^{-4}\text{M}$	3.36	3.99	2.72	3.38	3.34

	μmol de glicerol/g/h	μmol de glicerol/g/h	μmol de glicerol/g/h	μmol de glicerol/g/h	$\bar{X}_{n=9}$
Control	1.92	1.96	1.72	1.8	1.92
$1 \times 10^{-8}\text{M}$	1.65	2.3	2	2.09	2.21
$1 \times 10^{-7}\text{M}$	2.27	2.45	1.98	2.27	2.68
$1 \times 10^{-6}\text{M}$	2.66	2.56	2.22	2.27	2.84
$1 \times 10^{-5}\text{M}$	3.12	2.95	2.66	2.48	3.09
$1 \times 10^{-4}\text{M}$	3.58	2.56*	2.73	2.9	3.25

**estos valores no fueron incluidos en el promedio por estar más de dos desviaciones estándares lejos del valor promedio.*

Tabla 2. Curva dosis-respuesta de naproxen sobre la lipólisis en adipocitos de epidídimo incubados con concentraciones crecientes de naproxen. μ molas de glicerol liberadas por gramo de peso húmedo por hora de incubación (μ molas de glicerol/g/h).

	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	$X_{n=4}$
Control	1.98	1.76	2.12	1.85	1.93
$1 \times 10^{-8}M$	2.30	2.27	2.07	2.19	2.21
$1 \times 10^{-7}M$	2.61	2.64	2.85	2.69	2.70
$1 \times 10^{-6}M$	2.27	2.30	2.55	2.33	2.38
$1 \times 10^{-5}M$	2.40	2.17	2.49	2.20	2.31
$1 \times 10^{-4}M$	2.44	1.82	2.07	1.94	2.07

Tabla 3. Curva dosis-respuesta de epinefrina sobre la lipólisis en adipocitos de epidídimo de rata incubados en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina con naproxen a la dosis $3 \times 10^{-7}M$. μ molas de glicerol liberadas por gramo de peso húmedo por hora de incubación (μ molas de glicerol/g/h)

	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	$X_{n=4}$
Control	2.55	2.72	3.03	2.77	2.76
$1 \times 10^{-8}M$	2.45	2.46	2.55	2.75	2.55
$1 \times 10^{-7}M$	2.72	2.66	2.83	2.96	2.79
$1 \times 10^{-6}M$	2.91	3.03	2.90	2.97	2.95
$1 \times 10^{-5}M$	3.01	3.05	3.08	2.85	2.99
$1 \times 10^{-4}M$	2.86	2.73	2.66	2.70	2.78

Tabla 4. Curva dosis-respuesta de naproxen sobre la lipólisis en adipocitos de epidídimo de rata incubados en presencia de concentraciones crecientes de naproxen con epinefrina a la $DE_{50} = 3 \times 10^{-6} M$. μ molas de glicerol liberadas por gramo de peso húmedo por hora de incubación (μ molas de glicerol/g/h)

	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	μ molas de glicerol/g/h	$X_{n=4}$
Control	2.87	2.98	2.73	2.75	2.83
$1 \times 10^{-8} M$	2.76	2.62	2.79	2.53	2.68
$1 \times 10^{-7} M$	3.55	3.35	3.26	3.45	3.40
$1 \times 10^{-6} M$	3.34	3.08	3.00	3.00	3.10
$1 \times 10^{-5} M$	3.05	2.74	3.06	2.94	2.94
$1 \times 10^{-4} M$	2.26	2.38	3.09	2.80	2.80

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

8.1. Bibliografía citada

- Abramson, S.B. y Weissmann, G. 1989. The mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis and Rheumatism*. 32(1): 1-9.
- Achord, L., 1995. Alcohol and the Liver. *Sci. Am. Scie. Med.* No. marzo/abril p. 16-25.
- Baraona, G. 1979. Effects of ethanol on lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 20: 289-292,
- Barber, A.A., y Berhein, F., 1967. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *Adv. Gerontol. Res.* 2: 355-403.
- Bilodeau, J.F., Wang, M., Chung, F.L. y Castonguay, A. 1995. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on oxidative pathways in A/J mice. *Free Rad. Biol. & Med.* 18(1): 47-54.
- Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M. y Avery, G.S. 1984. Piroxicam. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 28: 292-323.
- Curtis, H., 1986. "Lípidos" en: *Biología*. Editorial Panamericana. Cuarta edición. Buenos Aires, Argentina. 83-85.
- Devlin, T. M. 1989. "Digestión y absorción de los constituyentes básicos de la nutrición". *Bioquímica*. Editorial Reverté. Segunda edición. Barcelona, España. 1181-1189.
- Di Luzio, N. R. y Costales, F. 1964. Inhibition of the ethanol and carbon tetrachloride-induced fatty liver by antioxidants. *Exp. Mol. Pathol.*, 4: 141-149.
- Donohue, T.M., Tuma, D.J. y Scorrell, M.F. 1983. Acetaldehyde adducts with proteins: binding of C¹⁴ acetaldehyde to serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 220: 239-246.
- Egan, J. J., Greenberg, A.S., Chang, M., Wek, S.A., Moos, M.C. y Londos, C. 1992. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 8537-8541.
- Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M. 1989, Rat liver NADH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P₄₅₀ (P₄₅₀ IIE1). *Biochem. Pharmacol.* 38: 1313-1318.
- Espinosa, T., 1995. "Nutrición del adulto" en: *Nutriología Médica*. Fundación mexicana para la salud, México D.F., México. 86-87.

- Frölich, J.C., 1997. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends. Pharmacol. Sci.* 18: 30-34.
- Gershman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyen, P. y Fenn W.O. 1954. Oxygen poisoning and irradiation: A mechanism in common. *Science.* 119: 623-626.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M.C. 1989. "Free radicals and toxicology" en: *Free radicals in Biology and Medicine*. Segunda edición. Claredon Press Oxford. 299-310.
- Halpers, D.H. y Sobesin, S.M. 1987. "Fatty liver" en: *Diseases of the Liver*. (Ed. Leon Schiff and Eugene R. Schiff). Sexta edición. J.B. Lippincott company. Philadelphia, U.S.A. 925-942.
- Herrera, E., 1986. "Formación de grasas y triacilglicéridos" en: *Bioquímica*. Editorial Hemalsa. Madrid, España. 541-561.
- Hyams, D.E. 1967. The prevention of fatty liver by administration of adenosine triphosphate. *Lab. Invest.* 16: 604-608.
- Insel, P.A., 1990. "Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents; drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout" en: *Goodman and Gilman's. The Pharmacological basis of therapeutics* (Ed. Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S. y Taylor, P). Octava edición. Pergamon Press. New York. U.S.A. p 638-651.
- Kreaenzlin, M.E., Keller, U., Thélin, A., Arnaud, M.J. y Stauffacher, W. 1989. Elevation of plasma epinephrine concentrations inhibits proteolysis and leucine oxidation in man via β -adrenergic mechanisms. *J. Clin. Invest.* 84: 388-393.
- Laguna, J. y Piña, E., 1990. "Metabolismo de los lípidos" en: *Bioquímica*. Cuarta edición. Editorial Salvat. México D.F., México. 249-299.
- Lieber, C. S. y Shmid, R. 1961. The effect of ethanol on fatty acid metabolism: stimulation of hepatic fatty acid synthesis in vitro. *J. Clin. Invest.* 49: 394-399.
- Lieber, C. S. 1966. Role of dietary, adipose, and endogenously synthesized fatty acids in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. *J. of Clin. Invest.* 45(1): 51-62.
- Lieber, C. S. 1991. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15(4): 573-592.
- Mallov, S. 1957. Effect of adrenalectomy on ethanol and fat metabolism in the rat. *Am. J. Physiol.* 189: 428-432,
- Mathews, C. y Van Holde, K. 1995. "Introduction to metabolism" en:

Biochemistry. Benjamin Cummings Publishing Co. California, U.S.A. 415-443.

- Mayes, P.A., 1988. "Nutrición, digestión y absorción" y "Lípidos de importancia fisiológica" en: Bioquímica de Harper. 21ª edición. Editorial El Manual Moderno. México D.F., México. 130-133; 570-576.
- Mendenhall, C.H.L. 1987. "Alcoholic hepatitis" en: Diseases of the Liver. (Ed. Schiff L. y Schiff E). Sexta edición. J.B. Lippincott Co. Philadelphia, U.S.A. p 669-681.
- Newsholme, E.A. y Leech, A.R. 1983. "Catabolism of lipids" en: Biochemistry for the Medical Sciences. Wiley & Sons Ltd. New York, U.S.A. 246-293.
- Orten, J.M. y Neuhaus, O.W. 1984. "Naturaleza y alcance de la bioquímica" y "Estado dinámico del metabolismo" en: Bioquímica Humana. Décima edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 14-15; 34-43.
- Palatt, P.J., 1982. "Principios físicos" y "Metabolismo" en: Fisiología comparada. (Ed. Leon Goldstein). Nueva Editorial Interamericana S.A., México D.F., México. 1-19; 314-319.
- Pimentel-Velázquez, L., Ramírez Gonzalez, M.D. y Zentella de Piña, M. 1996. Piroxicam inhibits epinephrine-induced stimulation of glicerol production in isolated rat adipocytes. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 39: 31-32.
- Reitz, R.C. 1979. The effect of ethanol ingestion on lipid metabolism. *Prog. Lipid. Res.* 18: 87-115.
- Riveros-Rosas, H., 1996. Efecto de algunos anti-inflamatorios sobre el metabolismo del etanol. Tesis de Maestría. División de estudios de posgrado e investigación Depto. de bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México.
- Rodbell, M., 1964. Metabolism of isolated fat cells, 1. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239(2): 375-380.
- Poggi, M. y Di Luzio, N.R. 1964. The role of liver and adipose tissue in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. *J. Lipid. Res.* 5: 437-441.
- Sagone, A.L. y Husney, R. M. 1987. Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that this drugs act as free radical-scavengers in biological systems. *J. Immunol.* 138: 2177-2183.
- Saldaña-Balmori, Y., Zentella de Piña, M., Guinzberg, R., Rocha Hernandez, A. y Piña, E. 1996. Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 317: 225-229.
- Sayed, A. A., Dunstan, R.H., Dunkley, P. R. y Murdoch, R.N. 1996. Oxidative stress and the fetotoxicity of alcohol consumptions during pregnancy. *Free Rad. Biol. Med.* 21(3): 357-365.

- Stone, D.B., Brown, J.D. y Steele, A.A. 1969. Effect of sodium salicylate on induced lipolysis in isolated rat cells of the rat. *Metabolism*. 18(7): 620-624.
- Stryer, L. 1995. "Metabolismo de los ácidos grasos" en: Bioquímica Editorial Reverté. Bilbao, España. 604-628.
- Todd, P.A. y Clissold, S. P. 1990. Naproxen. A Reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states. *Drugs* 40 (1): 91-137.
- Vane, J.R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 231: 232-235.
- Welch, W.J. 1993. How cells respond to stress. *Sci. Am.* 268(5): 56-64
- Wieland. O.H. 1984. Glycerol en: Methods of Enzymatic Analysis Volumen VI: Metabolites 1: Carbohydrates. (Ed. Hans Ulrich Bergmeyer). Tercera edición. Editorial Verlag Chemie. Weinheim, Alemania. 504-510.
- Windholz, M., 1983. The Merck-Index.. Décima edición. Merck & CO. Rahway, U.S.A.
- Zentella de Piña, M., Hernández-Tobías, Y. A., Saldaña-Balmori, Y., Díaz-Belmont, A. y Piña, E. 1992. Biochemical ethanol effects affected by non-steroidal anti-inflammatory drug, *FEBS . Lett.* 298: 123- 128..
- Zentella de Piña, M., Saldaña-Balmori, Y., Hernández-Tobías, 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: 1228-1234.
- Zentella de Piña, M. 1994. Daño celular por alcoholismo: papel de un anti-inflamatorio. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, División de Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México.

8.2. Bibliografía consultada

- Bizz, A., et al. 1966 Triglyceride accumulation in liver . *Nature*. 205: 1025-1026.
- Bondy, S.C. y Pearson, K. R. 1993. Ethanol induced oxidative stress and nutritional status. *Alcohol Clin. Exper. Res.* 17(3): 651-655.
- Carlson, L.A. and Östman, J. 1961. Effect of salicylate on plasma-free fatty acid in normal and diabetic subjects. *Metabolism* 10: 781-787.
- 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.

- Grunnet, N. y Kondrup, J. 1986. The effect of ethanol on the β -Oxidation of fatty acid. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10(6): 64-68.
- Lafontaine M. y Berlan, M.J. 1993. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Lipid Res.* 34: 1057-1091,
- Maickel, R.P. y Yamada, K. 1963. Dynamic biochemical processes involved in the production of a fatty liver en: *Advances in Enzyme Regulation* (Ed. Weber G.) Pergamon Press, New York, U.S.A. Vol 1. 235-245
- Nordmann, R., Ribiere, C. y Rouach, H. 1992. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad. Biol. Med.* 12: 219-240.
- Razdan, B.K. y Ngaraja, N.V. 1998. Evaluation of dosage forms: studies on commercial tablet dosage forms of naproxen. *Pharm. Pharmacol Commun.* 4: 253-256.
- Runkel, R., Chaplin, M., Boost,G., Segre, E. y Forchielli, E., 1972. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of naproxen in various laboratory animals and human subjects. *Chem. Pharm. Bull.* 61(5): 703-716.