

93



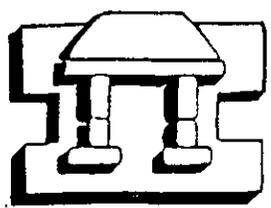
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS " I Z T A C A L A "

CUANTIFICACION DE LA PROTEOLISIS EN EL ERITROCITO DE RATA DURANTE LA INTOXICACION AGUDA POR ETANOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
ALVARO ADRIAN SANDOVAL MONTIEL



IZTACALA

ASESORA: DRA. MARTHA ZENTELLA DE PIÑA

273611

MARZO DEL 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alvaro y Ana Maria por su cariño, amor y paciencia, mis hermanos, cuñadas y sobrinos (los quiero mucho!)

Quiero agradecer todo el apoyo y entusiasmo de la Doctora Martha Zentella para llevar a cabo esta tesis en su laboratorio.

Al Doctor Enrique Piña por apoyarme con sus observaciones y consejos en la elaboración de esta tesis.

A todos los miembros del Laboratorio 5 del Departamento Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A Héctor, por su apoyo y observaciones, a Enrique por su ayuda en el tratamiento de los animales, a la Dra. Yolanda Saldaña por sus atinadas observaciones, a Ivonne por sus sugerencias y apoyo, a Aaron, pero sobre todo gracias a todos por su amistad.

A Nora por su gran amistad, sugerencias y apoyo durante estos meses.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de la beca otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI), gracias a la intermediación del Dr. Enrique Piña Garza, expediente número 4594.

A todos los compañeros de Iztacala que compartimos tantas experiencias buenas y malas, aventuras en las practicas de campo, apoyo en todo momento pero sobre todo por su amistad.

A Cynthia por su gran amistad y apoyo, a su familia por su cariño.

A Jorge por su increíble amistad y ayuda en la elaboración de mis presentaciones.

A toda la banda de cinéfilos y comensales, de Samborns, gracias por su amistad, (Nayeli, Jorge, Susana, Ericka, Rafael, Miguel, Judith, Ernesto, Arcelia, Salomon, Fabiola y todos los que me llegaran a faltar).

A todos los profesores de Iztacala que me ayudaron a formarme como profesionista y aquellos que me brindaron su amistad aun sin ser su alumno. A todos los amigos de otras generaciones que he conocido y que me han brindado su amistad. A los amigos del Laboratorio de Biorregulación. A Iztacala en general ya que es la mejor escuela de Biología del País. A la UNAM a pesar del terrible momento pasado.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| Indice | 1 |
| Resumen | 2 |
| Introducción | 4 |
| Aspectos históricos | 4 |
| Metabolismo del etanol | |
| Absorción | 9 |
| Oxidación del etanol | 11 |
| Oxidación del acetaldehído | 12 |
| Generación de RL durante el met. del etanol | 15 |
| El eritrocito | 19 |
| Proteosoma | 22 |
| Antecedentes | 23 |
| Objetivo | 26 |
| Materiales y métodos | 27 |
| Determinación de alanina | 28 |
| Determinación de tirosina | 29 |
| Resultados | 31 |
| Discusión | 37 |
| Conclusiones | 41 |
| Bibliografía | 43 |

Resumen

Se ha reportado que el metabolismo del etanol genera radicales libres (RL). El estudio de los efectos de los RL en las moléculas orgánicas se ha enfocado principalmente al daño que ocasiona en los lípidos, mientras que los efectos que produce en las proteínas han sido poco estudiados; se ha encontrado que los agentes oxidantes alteran la estructura de las proteínas y así incrementan su susceptibilidad a los sistemas proteolíticos celulares, Observando esto se decidió determinar si la intoxicación aguda por etanol aumentaba la proteólisis en el eritrocito de rata, ocasionada por el metabolismo del alcohol en organismos *in vivo*.

El eritrocito, a pesar de no ser una célula completa, puede ser un modelo viable para estudiar las alteraciones en las proteínas, provocadas por la ingestión aguda de etanol.

Se sabe que la cuantificación de aminoácidos es un índice para determinar la proteólisis, en nuestro caso se consideran como indicadores de la misma a la Alanina (Ala) y Tirosina (Tir) en eritrocito, en plasma los aminoácidos fueron considerados como indicadores de la poza de alanina y tirosina, de manera que sus concentraciones son el resultado de la liberación y de la captación de alanina y tirosina por todos los tejidos.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 200 g \pm 20 se mantuvieron en ayuno por 12 horas antes de la intoxicación. Los animales recibieron una dosis única de etanol (5 g/kg de peso corporal de una solución al 60% v/v).

Los animales fueron sacrificados por decapitación y la sangre se colectó en tubos heparinizados separando el paquete globular del plasma por centrifugación. Se agruparon lotes de 5 animales por cada tratamiento. A un grupo único se le midieron los valores antes mencionados en ayuno y sin tratamiento. Los resultados fueron interpolados en curvas estándar de los mencionados aminoácidos.

Nuestros resultados indican contrariamente a lo esperado, que el etanol determina una disminución en la proteólisis en eritrocitos ya que se presenta un decremento en la concentración de aminoácidos, tanto de Tir como de Ala, esto con respecto al basal; en relación al plasma la alanina y tirosina también descienden, presentan diferencias significativas con respecto a los controles y al basal.

El efecto antiproteolítico del etanol podría estar mediado por una descarga adrenérgica, ya que se ha demostrado que la ingestión de etanol produce una elevación de las catecolaminas, a su vez el etanol inhibe el catabolismo de estas hormonas.

El estudio de otros indicadores de daño proténico se sugiere para conocer con precisión el efecto de una dosis elevada de etanol sobre las proteínas.

INTRODUCCIÓN

Aspectos Históricos

El etanol es una molécula que se encuentra presente en los procesos de fermentación de granos y frutos debido a la acción metabólica de las levaduras. Tiene un alto valor energético de 7 kcal/mol, ligeramente menor al proporcionado por los lípidos que es de 9 kcal/mol. A excepción de ciertos microorganismos que la utilizan como fuente de carbono (bacterias), éste no es producido por otros organismos en cantidades importantes, incluyendo a los mamíferos (entre ellos el hombre) y en situación natural no constituye una fuente importante de nutrimento. Sin embargo, se han detectado numerosas enzimas que se encargan de su metabolismo, en el caso de los mamíferos se han localizado en la mayoría de los tejidos. De lo anterior surge la pregunta: ¿por qué una molécula que no es propia del metabolismo animal, a excepción de los rumiantes cuya flora intestinal lo produce en cantidades micromolares cuenta con más de 200 diferentes enzimas e isoenzimas para ser metabolizada? (Zentella *et al*, 1993)

Es muy probable que el hombre comenzara a ingerir alcohol, desde la mas remota antigüedad, procedente de los frutos que encontrara tirados en estado parcial de descomposición, lo mismo sucedería con los granos al comenzar a almacenarlos y consumirlos en estado fermentativo (Velasco, 1992). Una vez que el hombre razonó sobre los procesos naturales por los que era posible imitar a la naturaleza comenzó a elaborar bebidas alcohólicas, hay indicios de la elaboración de cerveza y vino por parte de los

egipcios (Kricka and Clark, 1979), fenicios y chinos a partir de granos, o pulque en el caso de los aztecas obtenido de la savia del maguey (Milke, 1995). La Biblia se encuentran citas con referencia a bebidas alcohólicas, principalmente vino (Kricka and Clark, 1979). Sin embargo es de notar que estas bebidas tenían un uso en festividades religiosas, ya que sus propiedades: efervescencia del bebedor y desinhibición, eran considerados como un modo de acercarse a las divinidades, por eso no es de extrañar que su uso se limitara a las clases superiores como la realeza y sacerdotes, y que se castigara incluso con la muerte a los que osaran desafiar las leyes. Es muy probable que el consumo de bebidas alcohólicas se desarrollara dentro de los ejércitos y las clases más pobres como un medio para olvidar sus penas, y este hábito se extendería hacia otros grupos sociales y otros territorios, sin embargo también existieron obstáculos que impidieron su diseminación como lo fue y es la religión musulmana que prohíbe el consumo de cualquier bebida alcohólica aun en las castas sociales mas privilegiadas (Dwight, 1976).

Es notable que en algunas civilizaciones el uso del alcohol fuera un rasgo de la vida diaria. Tal es el caso de la antigua Inglaterra Victoriana, donde el consumo de bebidas alcohólicas aumentó su prevalencia a mediados de 1870, en la actualidad el abuso de las bebidas alcohólicas es uno de los mayores problemas de salud pública en un número cada vez mayor de sociedades (Kricka and Clark, 1979).

El etanol o alcohol etílico es una molécula que en los mamíferos está presente en el intestino a bajas concentraciones debido a su producción normal durante la actividad fermentativa de la flora gastrointestinal, por eso no es de extrañar que se descubriera en varios tejidos la habilidad de oxidar etanol a acetaldehído y ácido acético y se realizara la subsecuente purificación de las alcohol y aldehído deshidrogenasas en los tejidos animales.

El alcohol etílico se consume en grandes cantidades en forma de diversos tipos de bebidas alcohólicas, tales como cerveza, vino, licores, etc. Sin embargo, se debe notar que excepto los humanos, los animales superiores ni consumen ni producen suficientes cantidades de alcohol para justificar la presencia de tantas isoenzimas capaces de oxidar etanol a acetaldehído (Zentella *et al*, 1993). Hay que hacer notar que existen variaciones genéticas que influyen en el polimorfismo de las enzimas responsables del metabolismo del etanol, además de otros factores como la edad, sexo, estado de ayuno o alimentación, etc., que contribuyen a la absorción, la distribución y el metabolismo del alcohol (Riveros, 1997).

Aunque la mayoría de la gente consume alcohol (en cantidades moderadas), no presentan problemas; sin embargo pueden presentarse problemas agudos o crónicos debido a la ingesta de etanol, principalmente en función de la cantidad de etanol ingerida y el período de consumo. Cada individuo responde de forma diferente al consumo de etanol, desde modificaciones de conducta al ingerir cantidades moderadas, o bien

ingieren cantidades considerables de etanol y casi no modifican su conducta (*tabla 1). Inclusive los órganos blanco son diferentes con respecto a la ingesta crónica de alcohol: en algunos es el sistema nervioso central, en otros el hígado y algunos más el páncreas. Incluso aquellos que tienen lesiones hepáticas pueden ser de varios tipos: hepatitis, esteatosis, fibrosis o combinación de alguna de las tres anotadas. En conclusión hay gran variedad racial, sexual e individual con respecto al manejo y tolerancia al etanol y posiblemente a sus productos de oxidación o a los cambios metabólicos que ocasione la oxidación de grandes cantidades de etanol.(Zentella y Piña 1987,Holtzman et al 1985)

*En esta tabla todas modifican la conducta de manera más o menos uniforme

Tabla 1 Concentración de etanol en sangre y algunos indicadores del comportamiento

| Concentración de etanol en sangre mg/100ml mmolas/l | | Número de bebidas con las que se puede alcanzar la concentración indicada* | Indicadores aproximados del comportamiento | situación legal al manejar |
|---|------------|--|--|----------------------------|
| 0 - 46 | 0 - 10 | 2 | Normal, ligeramente eufórico | Legal |
| 46 - 92 | 10 - 20 | 4 | Eufórico, verborreico, ligeramente incoordinado, no debe manejar | Dudoso |
| 92 - 138 | 20 - 30 | 6 | Excitado, con frecuencia agresivo, irreflexivo, irresponsable. | Ilegal |
| 138 - 230 | 30 - 50 | 8 - 10 | Deprimido, obviamente incoordinado | Ilegal |
| 230 - 460 | 50 - 100 | - | Muy deprimido, hay que ayudarlo a caminar. | - |
| más de 460 | más de 100 | - | Límite de tolerancia, peligro de muerte | - |

* Dada la enorme variabilidad a la respuesta al etanol, esta columna de datos aproximados adaptados a las siguientes condiciones: la unidad de bebida es la copa normal de 1 onza o una botella de cerveza o una copa de vino de mesa; se refiere a la ingestión del número de bebidas anotado por un individuo de 65 kilos, en ayuno, que ingiere el alcohol en un periodo aproximado de 90 a 120 minutos. La situación cambia si el individuo tiene otro peso corporal, si ingiere alimentos o si consume el alcohol a una velocidad diferente. (Referido en Zentella y cols, 1987)

Metabolismo del etanol

Absorción

La ruta de administración del etanol es determinante en la distribución y en la velocidad de su mecanismo. Generalmente la administración se hace por vía oral, una vez que el alcohol es ingerido se absorbe por: la mucosa epitelial de la boca (Bode, 1980; Kricka and Clark 1979) y como vapor por los alvéolos pulmonares (Gibson, 1975; Nomiyama and Nomiyama, 1974), como esta vía es prácticamente indetectable, puede considerarse que casi todo el alcohol ingerido va hacia el estómago, donde es absorbido por difusión simple a través del epitelio del estómago e intestinos de una manera muy parecida a la que ocurre con el agua, y es canalizado por la vena porta directamente hacia el hígado para ser metabolizado. Menos del 10% del etanol ingerido es eliminado a través del riñón, pulmón y piel (Moser *et al*, 1968; Bosrom and Li, 1981), la mayor parte del metabolismo del etanol ocurre en el hígado donde es oxidado; sin embargo existe un metabolismo extrahepático, aunque en menor proporción (fig 1). El hígado es el principal órgano responsable de la oxidación y eliminación del alcohol ingerido, así también de la mayoría de drogas y xenobióticos que se consumen.

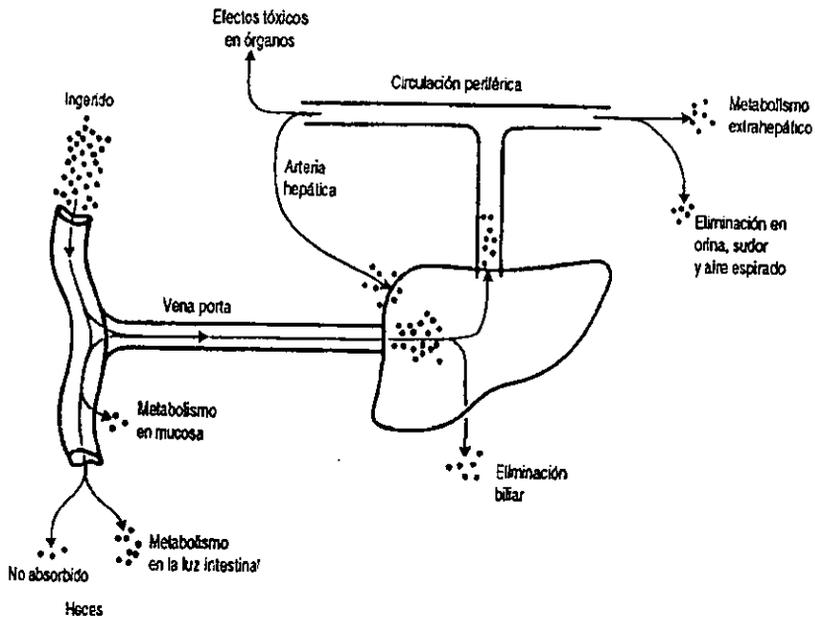


Fig 1 Metabolismo hepático y extrahepático del etanol (Tomado de Zentella 1993)

El porcentaje de etanol absorbido de una dosis dada tiene grandes variaciones individuales, aunque la absorción del etanol parece estar también bajo control genético (Reed *et al*, 1976), existen además otros factores que pueden modificarla (tabla 2)

Tabla 2 Factores que afectan la absorción del etanol

| |
|---|
| <p>Concentración del etanol Flujo sanguíneo en el sitio de absorción Velocidad de ingestión Tipo y características irritantes de la bebida Comida Vaciamiento gástrico Deficiencia proteínica Temperatura corporal Ejercicio físico Ciclo menstrual</p> |
|---|

Modificada de Agarwal nad Guede, 1989

Oxidación del etanol

En el hígado existen tres sistemas enzimáticos capaces de llevar a cabo la oxidación del etanol (fig. 2):

1) El primer sistema está formado por una serie de enzimas especializadas conocidas genéricamente como alcoholes deshidrogenasas o ADHs, las cuales se encuentran en el citosol de los diferentes tejidos, principalmente el hepático. Estas enzimas promueven la oxidación del etanol a acetaldehído, acoplando esta reacción con la reducción de un dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD^+).

2) El segundo sistema se encuentra dentro de los peroxisomas de los hepatocitos, en este sistema, la oxidación de una molécula de etanol a acetaldehído se acompaña de la descomposición de una molécula de peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por la enzima catalasa.

3) El tercer y último sistema oxidante es el llamado Sistema Microsomal Oxidante de Etanol (MEOS), el cual está localizado en el interior de los microsomas y requiere la participación del citocromo P-450. El citocromo P-450 acopla la oxidación del etanol y del fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida (NADPH) a la reducción de una molécula de oxígeno para formar peróxido de hidrógeno.

Estos tres sistemas trabajan simultáneamente en presencia de alcohol, con diferentes actividades y afinidades.

Además de los sistemas enzimáticos descritos para la oxidación del etanol, hay un mecanismo de oxidación no enzimático el cual debe ser funcional *in vivo* y depende de la participación de hierro quelado en presencia de radicales hidroxil (reacción de Fenton). Por su importancia, este sistema será descrito mas adelante en forma detallada.

Finalmente existe una vía metabólica no oxidativa donde el etanol forma ésteres etil de ácidos grasos por mediación de una sintetasa de éster etil de ácidos grasos, aunque su participación no es significativa en el metabolismo total del etanol.

Oxidación del acetaldehído

El acetaldehído es el principal metabolito generado en el primer paso del catabolismo hepático del etanol, es una molécula altamente reactiva y puede formar aductos con diversas moléculas. En este sentido, gran parte

de los efectos tóxicos asociados con la ingestión aguda o crónica de etanol son atribuidos a la formación de aductos de acetaldehído.

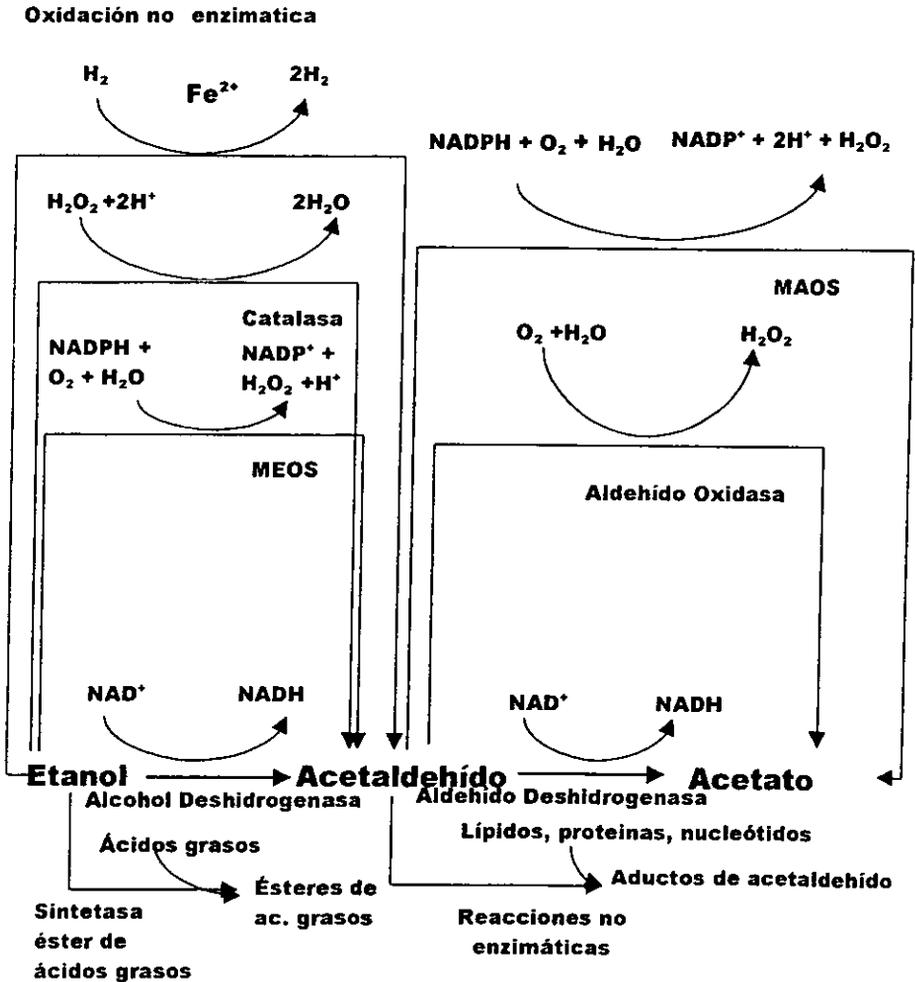
El acetaldehído es producido principalmente en el hígado y es oxidado a través de tres vías metabólicas (fig. 2):

1) El primero mediado por un sistema enzimático conocido como aldehído deshidrogenasa o ALDHs, el cual cataliza la oxidación del acetaldehído a acetato en una reacción que requiere NAD^+ como el aceptor de electrones.

2) En la segunda vía participa la aldehído oxidasa o AO, una enzima muy pobremente estudiada, la cual cataliza la oxidación del acetaldehído hacia acetato en una reacción dependiente de oxígeno.

3) La tercer vía, descrita recientemente, es llamada el *Sistema Microsomal de Oxidación del Acetaldehído* o también llamado MAOS. Este sistema requiere la participación del citocromo P-450 y lleva a cabo la oxidación del acetaldehído hacia acetato en una reacción acoplada a la oxidación de un fosfato dinucleótido de adenina nicotidamina reducida, en una reacción análoga a la realizada por la MEOS sobre el etanol.

Fig. 2 Principales rutas metabólicas del metabolismo del alcohol y acetaldehído.



Generación de radicales libres durante el metabolismo del etanol

El etanol es la droga más usada en todo el mundo. Este produce una serie de condiciones patológicas variando de una intoxicación simple a severa. Muchos de los esfuerzos han sido dirigidos a revelar los mecanismos bioquímicos del daño celular producido por etanol (Zentella *et al*, 1994). La generación de radicales libres atribuibles al metabolismo del etanol ha recibido mucha atención en los últimos años (Mira *et al*, 1995, Bondy and Guo, 1994, Cederbaum, 1989). Tales radicales son responsables de la peroxidación lipídica (LP) en muchos tejidos (cerebro, hígado y testículos), observada después de una ingesta de etanol (Normann *et al*, 1992). Se ha reportado que el etanol induce un incremento de dienos conjugados y LP en los fosfolípidos de alcohólicos crónicos, un hecho que sugiere un efecto mediado por radicales libres. Se ha reportado daño a las proteínas de la membrana de los eritrocitos (RBC) en experimentos *in vitro* (Gutiérrez, 1993) causados por acetaldehído pero a mucho mayor concentración (hasta 10mM), que el encontrado en plasma después de una dosis oral única de etanol (hasta 100 μ M).

Un radical libre (RL), es cualquier especie química ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados, la molécula de oxígeno es un birradical pues tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en un orbital diferente y con su giro (spin) en la misma dirección ($\uparrow\uparrow$). Existen diferentes formas del

oxígeno: singulete de oxígeno delta, radical superóxido, ion peróxido, singulete de oxígeno sigma, radical hidroxilo, etc., algunos de ellos muy reactivos. Los radicales del oxígeno pueden actuar como agentes oxidantes y reductores. Cuando un RL reacciona con un compuesto no radical, pueden formarse otros RL ya que induce una reacción en cadena que amplifica el fenómeno miles de veces (Zentella, 1994a).

Los RL interactúan con todas las moléculas orgánicas (tabla 3), ácidos grasos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas, modificando su estructura, funciones, sitios activos, polaridad, etc., lo que ocasiona daños serios en las funciones orgánicas, aunque estas alteraciones dependen del tiempo de exposición, edad del individuo, defensas antioxidantes, entre otras (Zentella, 1994a).

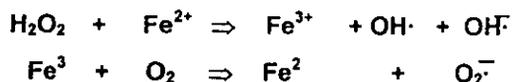
Tabla 3. Compuestos celulares alterados por la acción de los radicales libres del oxígeno

| | Polímeros estructurales | Daño |
|------------------|-------------------------|--|
| Radicales libres | DNA | Causa mutaciones, inhibición de la síntesis de proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos |
| | Proteínas | Causa cambios en la estructura, oxidación de grupos sulfhidrilo |
| | Lípidos | Lipoperoxidación |
| | carbohidratos | Despolimerización de polisacáridos |

(modificado de Pacifici, 1991)

Hay evidencia suficiente para considerar la conversión del etanol en radical libre, como otra vía alterna. Normalmente en las mitocondrias y en el

retículo endoplásmico, se producen radicales $\cdot\text{OH}$ *in vivo*, procedentes del peróxido de hidrógeno generado en estos organelos, esto sucede vía la reacción de Fenton:



También otras enzimas producen H_2O_2 , por ejemplo: D-amino oxidasas, glicolato y urato oxidasas. Chance *et al* (1979) ha concluido que aproximadamente 82 nmolas/min/g de agua oxigenada se producen en el hígado de rata en condiciones normales, de manera que siempre hay $\cdot\text{OH}$ disponibles, capaces de oxidar el etanol y dar lugar al radical 1-hidroxietilo y agua.



La sustracción de un átomo de H del etanol puede conducir a la producción de otros radicales libres (Reinke, 1991), principalmente 2-hidroxietilo y el radical etoxilo (Zentella *et al* 1994a, Cederbaum 1989), anion superóxido (Bautista and Spitzer 1992)

Así mismo otros trabajos evidencian la generación de radicales libres durante el metabolismo del alcohol (Mira *et al*, 1995, Bautista and Spitzer, 1992), esto es debido a la oxidación de NADH por AO produciendo NAD^+

dando lugar a una continua generación de especies reactivas de oxígeno - radicales libres- (fig. 3).

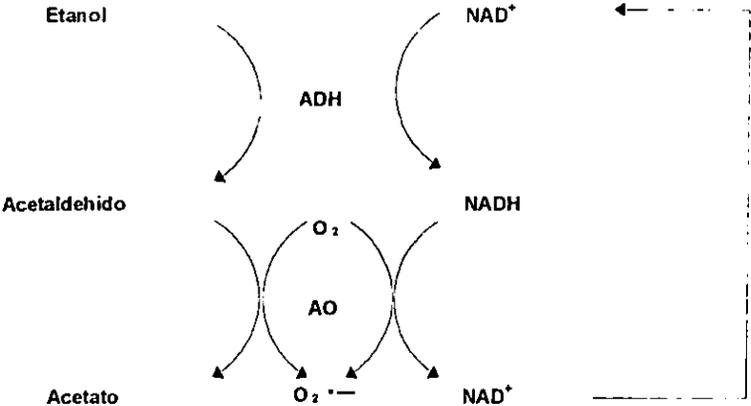


Fig. 3 Ciclo activado por Aldehído Oxidasa (AO) ocasionando una constante producción de especies reactivas de oxígeno (RL). (3)

El eritrocito

Características generales

El eritrocito maduro es un disco bicóncavo con un diámetro promedio de 8μ , espesor de 2μ y un volumen de 90 fl (fig 4).

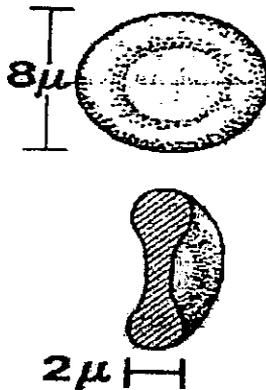


Fig. 4 Representación frontal y transversal (Tomado de Hillman, 1987)

Sin núcleo y sin mitocondrias, la célula ha perdido su capacidad de sintetizar proteínas. Su limitado metabolismo es apenas suficiente para sustentarlo durante los cuatro meses que dura su vida en circulación. Puesto que el eritrocito maduro es anucleado, tiene un metabolismo único. En ausencia de mitocondrias, hay poca capacidad de metabolizar ácidos grasos y aminoácidos. La energía se genera casi exclusivamente a través de la degradación de glucosa (fig. 5). Es conveniente dividir esta actividad metabólica en la vía anaeróbica principal (Embden-Meyerhof) y en tres vías

Debido a su falta de núcleo y mitocondrias, no pueden sintetizar proteínas ni lípidos de la membrana, solamente viven un promedio de 120 días en la circulación sin renovación de dichas moléculas, se protegen contra radicales libres (Halliwell and Gutterdge, 1989) entre ellos O_2 y H_2O_2 mediante las enzimas CuSOD, ZnSOD , catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y la vía de las pentosas (fig. 6)

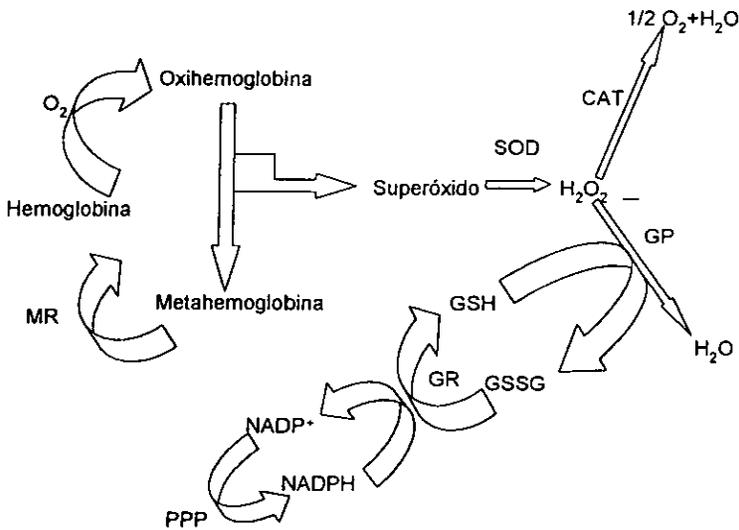


Fig 6 Protección de los eritrocitos contra el daño producido por radicales libres y/u oxidación de la hemoglobina. (Tomado de Halliwell, 1989). MR: Metahemoglobina reductasa SOD: Cu y Zn superóxido dismutasa CAT: catalasa GP: glutatión peróxidasa GR: glutatión reductasa PPP: vía de la pentosa fosfato (por sus siglas en inglés)

Los eritrocitos sin embargo pueden degradar proteínas modificadas oxidativamente, por medio del proteosoma (Grune and Davies, 1997). Por otra parte, se han detectado otras enzimas que pueden oxidar el etanol: alcohol deshidrogenasa o ADH (Lizano *et al*, 1998; Sanz *et al*, 1995), y Aldehído deshidrogenasa o ALDH (Dockham *et al*, 1997).

El proteosoma

Es un complejo multicatalítico de alto peso molecular (aproximadamente de 700 kDa), que comprende una proteinasa intracelular la cual ha sido aislada bajo diversos nombres de una amplia variedad de células eucarióticas y tejidos. El proteosoma está conservado desde arqueobacterias a humanos; sin embargo, la complejidad de la composición de subunidades y, por resultado, las propiedades catalíticas se han incrementado durante la evolución. El complejo esta compuesto de al menos 24 subunidades las cuales incluyen diferentes polipéptidos arreglados en una estructura cilíndrica (Rivett, 1993). En contraste a enzimas pertenecientes a las cuatros familias clásicas de proteasas (proteasas séricas, cisteínicas, metalo y aspárticas), el proteosoma eucariótico 20s representa una proteasa con una amplia actividad específica, no está relacionada cercanamente a ningún tipo conocido de proteasa y se presume que representa una nueva familia de enzimas proteolíticas (Schmidt, 1997). Hay evidencia que sugiere que juega un rol principal en vías no lisosomales de interconversión intracelular proteínica. Dado que el eritrocito no presenta sistema lisosomal, éste es el único sistema proteolítico.

Los eritrocitos sin embargo pueden degradar proteínas modificadas oxidativamente, por medio del proteosoma (Grune and Davies, 1997). Por otra parte, se han detectado otras enzimas que pueden oxidar el etanol: alcohol deshidrogenasa o ADH (Lizano *et al*, 1998; Sanz *et al*, 1995), y Aldehído deshidrogenasa o ALDH (Dockham *et al*, 1997).

El proteosoma

Es un complejo multicatalítico de alto peso molecular (aproximadamente de 700 kDa), que comprende una proteinasa intracelular la cual ha sido aislada bajo diversos nombres de una amplia variedad de células eucarióticas y tejidos. El proteosoma está conservado desde arqueobacterias a humanos; sin embargo, la complejidad de la composición de subunidades y, por resultado, las propiedades catalíticas se han incrementado durante la evolución. El complejo esta compuesto de al menos 24 subunidades las cuales incluyen diferentes polipéptidos arreglados en una estructura cilíndrica (Rivett, 1993). En contraste a enzimas pertenecientes a las cuatros familias clásicas de proteasas (proteasas séricas, cisteínicas, metalo y aspárticas), el proteosoma eucariótico 20s representa una proteasa con una amplia actividad específica, no está relacionada cercanamente a ningún tipo conocido de proteasa y se presume que representa una nueva familia de enzimas proteolíticas (Schmidt, 1997). Hay evidencia que sugiere que juega un rol principal en vías no lisosomales de interconversión intracelular proteínica. Dado que el eritrocito no presenta sistema lisosomal, éste es el único sistema proteolítico.

ANTECEDENTES

El estudio de los efectos de los RL en las moléculas orgánicas se ha enfocado, principalmente, al daño que producen en lípidos estructurales de la membrana (Chiu *et al*, 1989), mientras que los efectos de los RL sobre las proteínas han sido menos estudiados, se ha encontrado que los agentes oxidantes alteran la estructura de las proteínas y así incrementan la susceptibilidad proteolítica (Davies, 1987, Davies and Golberg 1987e). Se ha descrito una susceptibilidad general de las proteínas a los radicales de oxígeno (Davies, 1987a, 1987b, 1987c, 1987d), también se ha visto, en experimentos *in vitro* (Runge-Morris *et al*, 1988), que se estimula la proteólisis debido a la alteración de las proteínas y su degradación por parte de los sistemas proteolíticos celulares (Davies and Golberg, 1987f). De manera general las modificaciones oxidativas de las proteínas se pueden agrupar en alteraciones del peso molecular (agregación y fragmentación) alteración de las cargas netas (+ o -), pérdida de triptofano y producción de bitirosina (Davies, 1987a, 1987b, 1987c, 1987d) (Fig. 7).

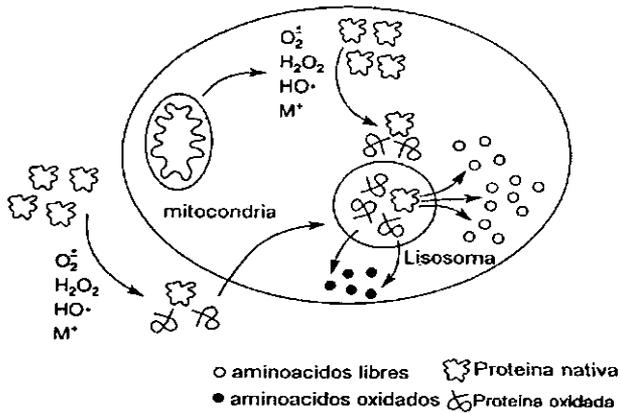


Fig 7 Alteración de proteínas por RL de origen extracelular e intracelular

Así mismo, en experimentos *in vitro* se demostró que la generación de radicales libres produce un incremento en la degradación de proteína (Mortensen *et al*, 1991). Observando esto, se decidió determinar si la intoxicación aguda por etanol aumentaba la proteólisis en el eritrocito de rata, debido a la generación de radicales libres ocasionada por el metabolismo del alcohol en organismos *in vivo*.

El eritrocito, a pesar de no ser una célula completa, puede ser un buen modelo simple para estudiar las alteraciones en las proteínas, provocadas por la ingestión aguda y excesiva de etanol, en vista de su acceso fácil y de su activo metabolismo, además al no tener organelos ni sintetizar proteínas y por lo tanto no hay recambio de las mismas, todo esto ofrece ventajas en relación al estudio de los daños ocasionados por una exagerada producción de radicales libres.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la intoxicación aguda con etanol modifica la proteólisis en los eritrocitos de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar si la proteólisis inducida con etanol en eritrocitos puede ser cuantificada mediante un incremento en la liberación de alanina y tirosina en relación con los animales control.

Determinar si el etanol modifica la concentración de alanina y tirosina en plasma.

HIPÓTESIS GENERAL

El metabolismo del etanol en la intoxicación aguda produce un exceso de radicales libres que alteran la estructura de las proteínas celulares del eritrocito promoviendo un efecto proteolítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 g +/- 20 g. Los animales fueron alimentados con *Nutricubos* (Purina de México, S.A.) consumieron agua *ad libitum* y permanecieron en ayuno durante 12 horas antes del tratamiento. Los animales recibieron una dosis única de etanol (5 g/kg de peso corporal de una solución al 60% v/v) o una cantidad isocalórica de glucosa a través de una sonda orogástrica. Se agruparon en lotes de 5 animales por cada tratamiento y en los siguientes tiempos: a las 2, 4, 8 y 12 horas pos-tratamiento (Caballero, 1998).. Los animales fueron sacrificados por decapitación y la sangre colectada para la determinación de proteólisis medida por la liberación de alanina y tirosina tanto en eritrocitos como en plasma. A un grupo único en ayuno y sin tratamiento, se le midieron los valores basales de los aminoácidos mencionados. Los resultados fueron interpolados con curvas estándar de los mencionados aminoácidos. En todos los casos se cuantificó la proteína por el método de Bradford (Bradford,1976). Las concentraciones de ambos aminoácidos se expresaron como nmolas por mg de proteína.

Reactivos y equipo

La enzima L-alanina deshidrogenasa, hidrato de hidrazina y β -NAD (β -dinucleótido de adenina nicotidamina) se obtuvieron de Sigma, el 1,2

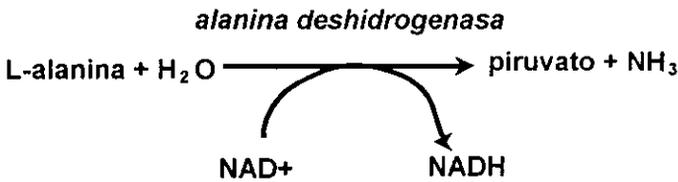
dicloroetanol se obtuvo de Aldrich, todos los demás reactivos son de la más alta pureza disponible. Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU 600 y se utilizaron cuvetas de cuarzo de Sigma de 2 ml.

Para la determinación de alanina (Ala) se utilizó la técnica de cuantificación de alanina referida en *Methods in Enzymology* (Pacifi and Davies, 1993), y para la determinación de tirosina (Tir) por la reacción de esta con el 1-nitroso 2-naftol (Udenfriend and Cooper, 1952, Waalkes and Udenfriend, 1957).

Determinación de Alanina

Ya que la alanina no puede ser sintetizada *de novo* o por interconversión metabólica en el eritrocito su presencia es un buen indicador de proteólisis. Brevemente la técnica es la siguiente: a 3 ml de paquete globular (RBC) o plasma se le adiciona 1 ml de ácido perclórico 1.6 M, para desproteinizar, agitándolo en vortex, dejándose reposar 10 min. en hielo, la suspensión es centrifugada a $5,000g \times 10min$ a $4^{\circ}C$, después se ajusta 1 ml de sobrenadante a pH 9 al agregar 0.2 ml de KOH (2.0 M) y se mantiene el pH agregando 0.8 ml de Tris HCl (0.5 M). Se deja 1 hora en hielo, durante este tiempo los cristales de perclorato precipitan y se puede medir la alanina en el sobrenadante. La medición se realiza por la reducción de NAD^{+} a NADH coenzima de la alanina deshidrogenasa en la presencia de alanina como sustrato y ácido pirúvico como producto. Este puede ser medido a 340 nm en el espectrofotómetro.

La alanina se mide en el paquete globular de eritrocitos porque de acuerdo con los autores la aparición de alanina en el eritrocito es indicativo de la degradación de proteínas, en el plasma también se mide la alanina considerando en este caso al plasma como la poza de alanina de manera que puede proceder no solo del eritrocito sino de otros tejidos.



Determinación de Tirosina

Otro indicador de la proteólisis, bien aceptado, es la liberación de tirosina, ya que puede ser considerada no únicamente como un marcador de daño oxidativo en proteínas sino también como un marcador endógeno para la degradación selectiva de proteínas modificadas oxidativamente. A 1 ml del paquete globular o de plasma se le agregan 3 ml de agua destilada y 1 ml de ácido tricloroacético al 20% para desproteinizar, agitándose en vórtex, y dejando reposar 10 min., para posteriormente centrifugar a 5,000g x 15 min. Posteriormente 1 ml del sobrenadante se le adiciona 1 ml de 1-nitroso 2-naftol 0.1%, más 1 ml de reactivo de ácido nítrico, se agita en vórtex y se incuba por 30 min. a 37°C, se deja enfriar y se agrega 5 ml de dicloroetano para extraer el nitrosoaftol que no haya reaccionado por medio de centrifugación lenta (1000g x 10 min). Se lee la fase acuosa a 450 nm en el

espectrofotómetro. La tirosina forma un aducto con el nitrosoaftol que puede leerse espectrofotométricamente a 450 nm. La densidad óptica es proporcional a la concentración. La tirosina y el nitrosoaftol reaccionan molécula a molécula con pérdida de agua, para formar un compuesto amarillo estable.

Resultados

El objetivo del presente trabajo es medir la proteólisis mediante la liberación de 2 aminoácidos, alanina (Ala) y tirosina (Tir), tanto en paquete globular (eritrocitos) como en plasma.

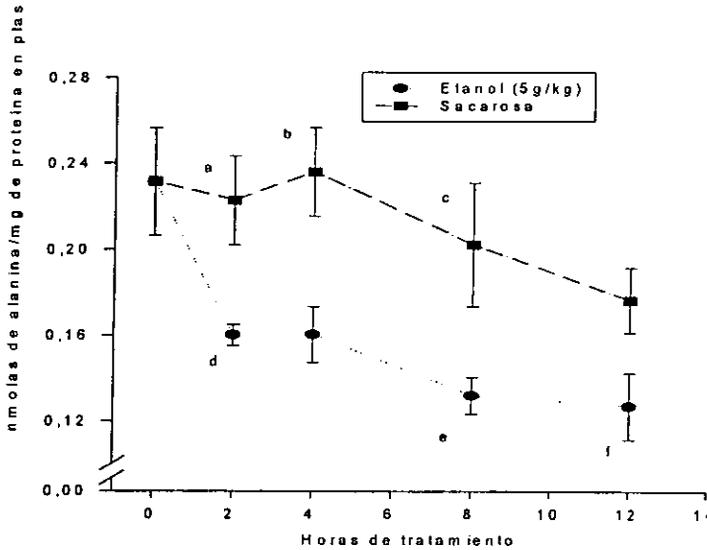


Figura 8.- Curso temporal de la aparición de alanina en plasma después de tratamiento. a= $P < 0.05$ etanol vs control b= $P < 0.05$ etanol vs control c= $P < 0.05$ etanol vs control d= $P < 0.05$ etanol vs basal e= $P < 0.01$ etanol vs basal f= $P < 0.01$ etanol vs basal (n=5) (barras = error estándar)

En la figura 8 (Ala en plasma) se presenta un curso temporal de la liberación de alanina después del tratamiento con etanol comparado contra el control (sacarosa) y contra su liberación en el tiempo 0. Puede observarse una menor liberación de Ala hacia el plasma en las ratas tratadas con el etanol en comparación con el control. Este resultado es opuesto a lo esperado, se observan diferencias significativas a las 2, 4 y 8 horas con respecto al control, así mismo existen diferencias significativas a las 2, 8 y 12 horas cuando se compara contra tiempo 0 considerado como estado basal.

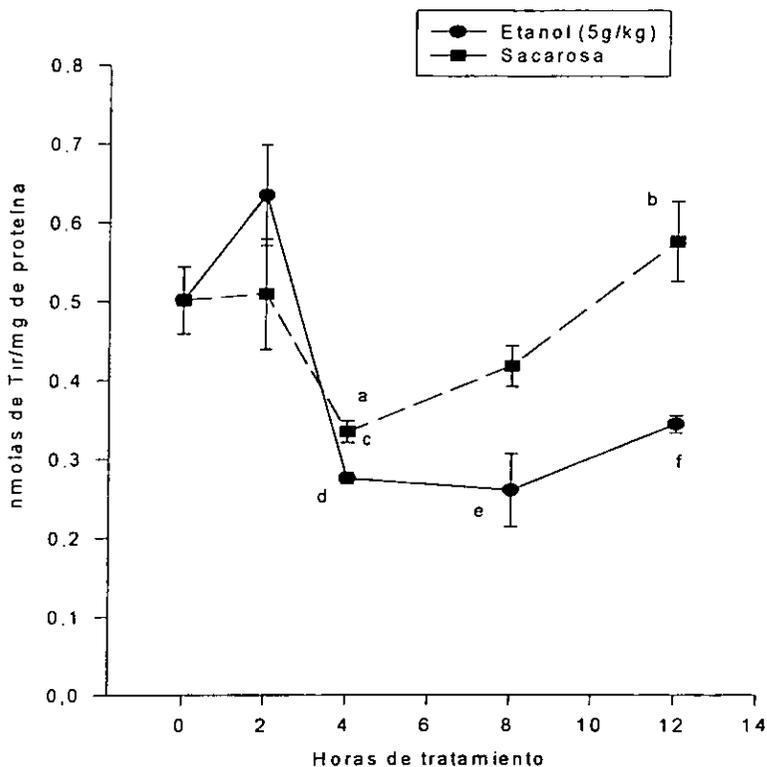


Figura 9.- Curso temporal de la aparición de tirosina en plasma después de tratamiento. a= $P < 0.01$ etanol vs control b= $P < 0.005$ etanol vs control c= $P < 0.01$ control vs basal d= $P < 0.005$ etanol vs basal e= $P < 0.01$ etanol vs basal f= $P < 0.01$ etanol vs basal (n=5) (barras = error estándar)

En la figura 9 (Tir en plasma), se observa una disminución en la liberación de Tir hacia el plasma, en las ratas tratadas con etanol, contrariamente a lo esperado. Pueden observarse en el grupo tratado con etanol, diferencias estadísticas a las 4 y 12 horas contra el control, así mismo se observan diferencias a las 4, 8 y 12 horas con respecto al basal, el grupo control muestra también diferencias a las 4 horas con respecto al basal.

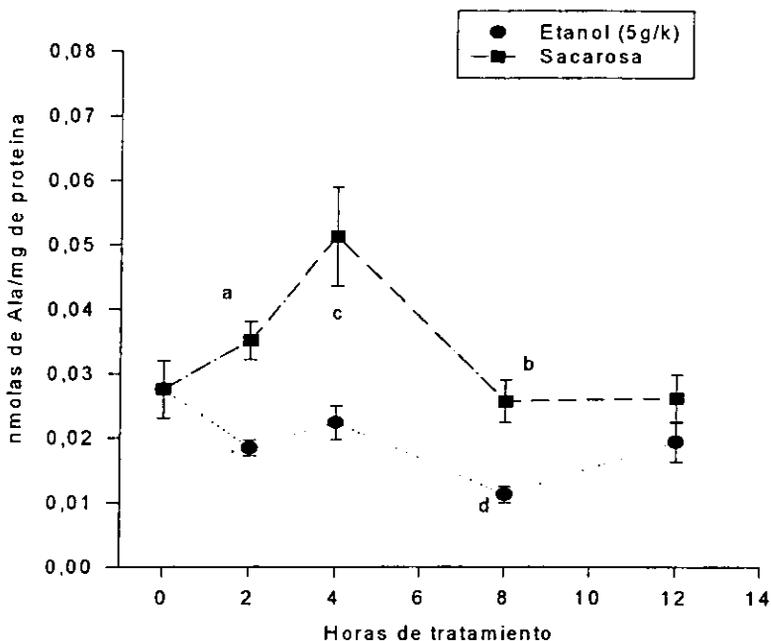


Figura 10.- Curso temporal de la aparición de alanina en eritrocitos después de tratamiento. a= $P < 0.001$ etanol vs control b= $P < 0.01$ etanol vs control c= $P < 0.005$ control vs basal d= $P < 0.001$ etanol vs basal (n=5) (barras = error estándar)

En la figura 10 (Ala en eritrocito), durante el curso temporal el grupo con el tratamiento de etanol muestra una disminución con respecto al grupo control, opuestamente a lo esperado, se observan diferencias a las 2, 4 y 8 horas del grupo experimental con respecto a su control, solo se presentan diferencias significativas a las 8 horas del control con respecto a su basal.

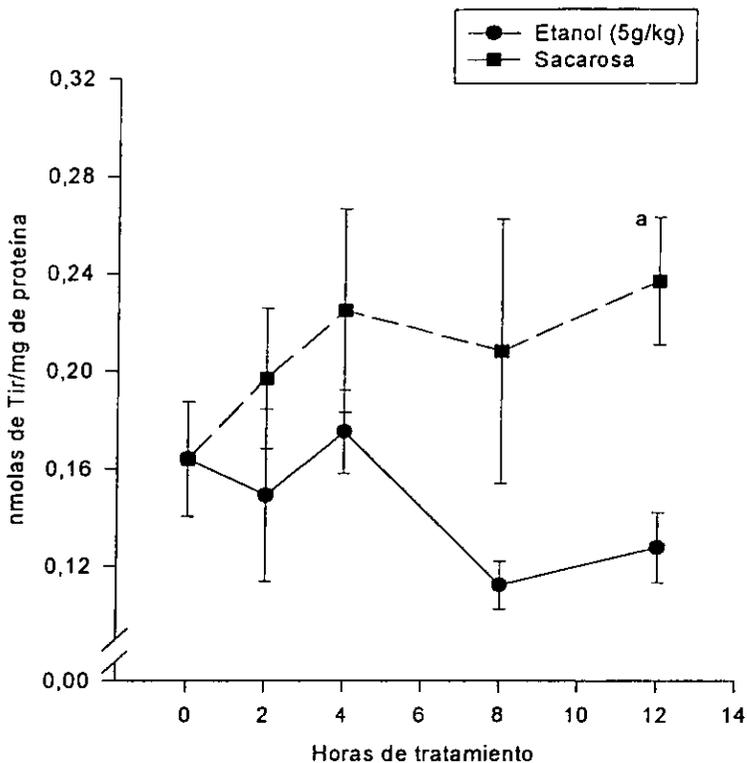


Figura 11.- Curso temporal de la aparición de tirosina en eritrocitos después de tratamiento. a= $P < 0.01$ etanol vs control (n=5) (barras = error estándar)

En la figura 11 (Tir en eritrocitos), solo se ven diferencias significativas hasta las 12 horas del grupo experimental con respecto a su control, no se puede concluir que exista una disminución en la presencia del aminoácido ya que puede tratarse de una mejor difusión.

Otra forma de analizar los resultados obtenidos fue mediante la medición del área bajo la curva (representa el área bajo el tiempo experimental 0 a 12 horas y esta dada en nmolas/mg de proteína⁻¹ × hr) indicador global de la liberación de los aminoácidos. El grupo experimental, contra lo esperado, muestra una disminución comparado con el grupo control (tablas 1 a 4). En la tabla 4 (Ala en plasma) se observa una disminución del 30%, así mismo en la tabla 5 (Tir en plasma) observamos la misma disminución que en el anterior (30%). En la tabla 6 (Ala en eritrocitos), se observa la mayor disminución con un 52%. Finalmente en la tabla 7 (Tir en eritrocitos) se observa también una disminución pero en este caso solo del 23 %.

Tabla 4. Concentración de alanina en plasma nmolas/mg de proteína

| Total | Sacarosa | Etanol (5g/kg) |
|-------|---------------|----------------|
| 2 | 0.4540±0.0870 | 0.3900±0.1260 |
| 4 | 0.4854±0.0455 | 0.3209±0.0885 |
| 8 | 0.8764±0.1070 | 0.5842±0.2150 |
| 12 | 0.7572±0.1317 | 0.5172±0.2198 |
| Total | 2.5773±0.3712 | 1.8123±0.6493 |
| | | -30% |

Tabla 5. Concentración de tirosina en plasma nmolas/mg de proteína

| Total | Sacarosa | Etanol (5g/kg) |
|-------|----------------|----------------|
| 2 | 1.010 7±0.2610 | 1.1362±0.2490 |
| 4 | 0.8436±0.1950 | 0.9099±0.1690 |
| 8 | 1.8378±0.1952 | 1.0714±0.2702 |
| 12 | 1.9876±0.4196 | 1.2094±0.2950 |
| Total | 5.6797±1.070 8 | 4.3269±0.9832 |
| | | -30% |

Tabla 6. Concentración de alanina en eritrocitos nmolas/mg de proteína

| Total | Sacarosa | Etanol (5g/kg) |
|-------|---------------|----------------|
| 2 | 0.0580±0.0210 | 0.0458±0.0170 |
| 4 | 0.0912±0.0300 | 0.0432±0.0110 |
| 8 | 0.1788±0.0628 | 0.0 732±0.0190 |
| 12 | 0.1198±0.0378 | 0.0520±0.0215 |
| Total | 0.4478±0.1516 | 0.2142±0.0685 |
| | | -52% |

Tabla 7. Concentración de tirosina en eritrocitos nmolas/mg de proteína

| Total | Sacarosa | Etanol (5g/kg) |
|-------|---------------|----------------|
| 2 | 0.3612±0.1180 | 0.3132±0.1070 |
| 4 | 0.3811±0.0840 | 0.3246±0.0970 |
| 8 | 0.7842±0.2190 | 0.5752±0.1250 |
| 12 | 0.8902±0.2680 | 0.4796±0.0860 |
| Total | 2.4167±0.6890 | 1.6926±0.4150 |
| | | -23% |

Discusión

El etanol es un productor de radicales libres, los cuales actúan sobre las moléculas orgánicas modificando su estructura y/o función, lo que se traduce en daño celular cuando se rebasan las defensas antioxidantes (Halliwell and Gutteridge, 1989).

A pesar de la extensa literatura respecto a los efectos del etanol sobre el daño a moléculas orgánicas, estos se han dirigido principalmente sobre los lípidos, no así a otras moléculas, como las proteínas, probablemente porque después de una intoxicación aguda o crónica, esta desemboca en el estado conocido como hígado graso.

Actualmente se sabe que el mecanismo de lipoperoxidación difiere de la oxidación de proteínas, incluso el daño proteínico se produce de manera más rápida y no requiere el daño membranal como prerequisite y que los productos de lipoperoxidación pueden reaccionar con las proteínas formando uniones cruzadas; además se ha demostrado que los antioxidantes ejercen efectos protectores al inhibir la lipoperoxidación, pero no protegen contra la degradación de proteínas en un modelo agudo, generador de radicales libres (Davies, 1987a).

La susceptibilidad proteolítica se ha relacionado con el cambio de cargas netas (+ ó -) ya que esta aumenta linealmente con la desnaturalización e hidrofobicidad. La exposición repetida o mayor a oxidantes aumenta la desnaturalización e hidrofobicidad, al mismo tiempo

su susceptibilidad, por lo que este mecanismo puede representar la señal de reconocimiento de los sistemas proteolíticos (Davies, 1993).

La degradación de proteínas determina la liberación de aminoácidos libres (Amaci, 1989), los cuales funcionan como un índice de degradación proteica probablemente provocada por radicales libres producidos durante una ingestión aguda de etanol.

El objetivo del presente trabajo es cuantificar la liberación de 2 aminoácidos en eritrocito durante un curso temporal de administración de etanol (0-12 h), suponiendo que un incremento en su liberación es un indicador de aumento de la proteólisis; sin embargo esto no se observó, sino que se presentó una disminución en la liberación de ambos aminoácidos, en el eritrocito.

Se observó una caída importante en la liberación de alanina en plasma y eritrocitos ocasionada por una dosis aguda de etanol (5g/kg de peso corporal), (figuras 8 y 10) la cantidad de tirosina en el plasma también desciende (figura 9), mientras que en eritrocitos (figura 11) se observa un descenso hasta las 12 horas, de este último indicador que resulta ser significativo ($p=0.01$) con respecto a su basal. El hecho de que la concentración de aminoácidos plasmáticos desciendan en forma paralela al descenso en eritrocitos puede ser explicado también por una inhibición de la proteólisis en otros tejidos que se ve reflejado en la poza de aminoácidos en el plasma.

Al analizar el área bajo la curva (el cual es un indicador global de la liberación de los aminoácidos), se puede apreciar en todos los grupos una

disminución de la concentración de los aminoácidos en el plasma y en los eritrocitos de los animales tratados con etanol, detectándose una diferencia máxima de alanina plasmática de alrededor del 52% con respecto a su control, la alanina así como la tirosina en plasma, presentan un decremento del 30% en ambos casos, mientras que la concentración de tirosina en eritrocitos desciende en un 23%. Los resultados están de acuerdo con los hallazgos en otros modelos de estudio, por ejemplo con una dosis aguda de etanol (2g/kg, i.p.) se produce una disminución de alanina en plasma (Abdel-Nabi, 1996), aunque la vía de administración fue intraperitoneal y la dosis de alcohol fue menor a la manejada en este estudio. En otro modelo con dosis crónicas de etanol (Pösö and Hirisiwak, 1991), se encontró que se inhibe la proteólisis en el hígado perfundido de rata, (aproximadamente un 33%), aunque en este caso se utilizó la liberación de valina como marcador de proteólisis. En otro estudio realizado en hígado perfundido de rata, (Vom Dahl, 1998), y a una concentración 20 mM de etanol se inhibió la proteólisis en un 18.6% \pm 2.0%, se utiliza en este caso [3 H] leucina como indicador de proteólisis. A pesar de las diferencias en los modelos de estudio: órgano perfundido y animal íntegro no hay discrepancias esenciales con respecto a los resultados.

La acción inhibitoria del etanol, puede ocurrir a través de dos mecanismos:

- 1.- El etanol produce radicales libres que afectan al proteosoma, provocando una disminución en su actividad (Fataccioli et al, 1999).

2.- El etanol provoca un estrés tóxico y en consecuencia una elevación en los niveles de epinefrina, responsables de la inhibición de la proteólisis (Kraezlin *et al*, 1989).

El primer punto podría servir como explicación del resultado encontrado en el estudio; sin embargo las condiciones de intoxicación, usadas en el trabajo de Fataccioli *et al*, (1999) son crónicas (4 semanas de administración oral con etanol al 10% en el agua de beber de los organismos), así mismo el proteosoma que se aisló fue de hígado y no de eritrocitos por lo que sería necesario probar la actividad del proteosoma de eritrocitos después de una dosis aguda de etanol (5g/kg).

La segunda propuesta es la mas favorecida por las evidencias experimentales para explicar el resultado obtenido, ya que otros estudios han demostrado que la epinefrina aumenta en plasma las siguientes sustancias: glucosa (Shamoon, 1980), insulina (Del Prato, 1990, Shamoon, 1980), ácidos grasos libres (Kraezlin *et al*, 1989) y glucagon (Del Prato, 1990), a la vez que se disminuyen los aminoácidos en plasma (Flakoll, 1989). Así mismo se ha encontrado que el consumo de etanol en dosis agudas (4g/kg) aumentan los niveles de epinefrina 6 veces, en ratas no estresadas, mientras que en ratas estresadas es del orden de 20 veces (Vogel *et al*, 1986). En otro estudio se demostró que a concentraciones fisiológicas, la epinefrina tiene una acción anticatabólica sobre las proteínas musculares (Fryburg *et al*, 1995). En un estudio *in vitro* se midió la proteólisis sobre músculo de rata: en el cuarto posterior (Motoni1996), usando dosis agudas de epinefrina (Epi 5×10^{-6}) y se observó una disminución del 50% de tirosina

liberada resultado que concuerda con el obtenido en este trabajo. A su vez el etanol inhibe el catabolismo de la epinefrina (Riveros *et al*, 1997), por lo que su permanencia en plasma y tejidos es mayor dando lugar a un ciclo en el cual continua inhibida la proteólisis hasta que disminuyan los niveles de etanol en sangre.

De acuerdo con la literatura y nuestros resultados, puede decirse que tanto la administración de epinefrina como de etanol, tienen efectos similares en cuanto a que inhiben la proteólisis, siendo posible que el efecto del etanol este mediado por epinefrina en vista de que a la dosis empleada en nuestro modelo de estudio hay una importante liberación de epinefrina. Es también probable que la disminución de la actividad del proteosoma tenga una participación importante dado que existen reportes que indican que este sistema se inhibe en hígado.

Conclusiones

En la hipótesis propuesta se planteó inicialmente que la proteólisis al igual que la lipoperoxidación, aumenta durante la intoxicación alcohólica aguda; sin embargo los resultados obtenidos en nuestro modelo de estudio, indican que la proteólisis a diferencia de la lipoperoxidación, disminuye durante la intoxicación alcohólica aguda.

Es probable que la proteólisis no sea el indicador idóneo para medir el daño proteínico producido durante la intoxicación alcohólica aguda y pueda

liberada resultado que concuerda con el obtenido en este trabajo. A su vez el etanol inhibe el catabolismo de la epinefrina (Riveros *et al*, 1997), por lo que su permanencia en plasma y tejidos es mayor dando lugar a un ciclo en el cual continua inhibida la proteólisis hasta que disminuyan los niveles de etanol en sangre.

De acuerdo con la literatura y nuestros resultados, puede decirse que tanto la administración de epinefrina como de etanol, tienen efectos similares en cuanto a que inhiben la proteólisis, siendo posible que el efecto del etanol este mediado por epinefrina en vista de que a la dosis empleada en nuestro modelo de estudio hay una importante liberación de epinefrina. Es también probable que la disminución de la actividad del proteosoma tenga una participación importante dado que existen reportes que indican que este sistema se inhibe en hígado.

Conclusiones

En la hipótesis propuesta se planteó inicialmente que la proteólisis al igual que la lipoperoxidación, aumenta durante la intoxicación alcohólica aguda; sin embargo los resultados obtenidos en nuestro modelo de estudio, indican que la proteólisis a diferencia de la lipoperoxidación, disminuye durante la intoxicación alcohólica aguda.

Es probable que la proteólisis no sea el indicador idóneo para medir el daño proteínico producido durante la intoxicación alcohólica aguda y pueda

demostrarse mas claramente midiendo otros indicadores de daño proteico como son la carbonilación y/o la oxidación de proteínas.

Se sugiere que para medir el daño proteínico producido por una dosis de etanol se midan otros indicadores aparte de la degradación proteínica, como pueden ser la carbonilación de proteínas, la oxidación de las mismas, la presencia de proteínas de choque térmico que no solamente aparecen por aumento de temperatura sino también por oxidación misma de las proteínas.

Por último, es recomendable hacer estudios en un modelo de animales tratados con antagonistas de la epinefrina o bien con inhibidores de la oxidación del etanol en cuyo caso se esperaría no hubiera inhibición de la proteólisis para confirmar nuestra propuesta de que la inhibición de la proteólisis en nuestro modelo esta mediado por epinefrina y que esta a su vez es la responsable de muchos de los efectos metabólicos del etanol administrado en forma aguda a una dosis elevada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Nabi R, Milakofsky L, Hofford JM, Hare TA, and Vogel WH, R. (1996) "Effect of ethanol on amino acids and related compounds in rat plasma, heart, aorta, bronchus and pancreas" *Alcohol* 13(2):171-174
- Agarwal, D. P. A. Goedde, W. H. (1989) "Alcoholism: Biomedical and genetic aspects" Ed. Pergamon Press E.U. pp 3-20
- Allen, D; Cierzan, J. (1988) "Relative susceptibility of lipids to peroxidation in intact erythrocytes" *J. Lab. Clin. Med.* 112(1): 87-91
- Bautista, A. P., Spitzer, J. J. (1992) "Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by *in situ* perfused rat liver" *Hepatology* 15: 892-898
- Bode, J. C. H. (1980) "Alcohol and the gastrointestinal tract" *Adv. Intern. Med. Pediatr.* 1980:451-455
- Bondy, S; Guo, S. (1994) "Effect of ethanol treatment on indices of cumulative oxidative stress" *Europ. J. Pharm.* 270: 349-355
- Bosrom, W. F.; Li, T. K. (1981) "Genetic determination of alcohol and aldehyde dehydrogenases and alcohol metabolism" *Semin. Liver Dis.* 1(3): 179-188
- Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding" *Anal. Bioch.* 72: 248-254
- Caballero Cruz, Ivonne, (1998), "Modificación de los niveles de etanol y acetaldehído en sangre de ratas tratadas con agentes antiinflamatorios no

estiroideos" Tesis de Maestria en Ciencias Biomédicas, UNAM, México D.F.
pp 33-34

Cederbaum, Arthur. (1989) " Microsomal generation of hydroxyl radicals: its role in microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) activity and requeriment for iron" *Annals New York Academy of sciences* pp35-49

Chance, B; Sies, H; and Boveris, A. (1979) "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs" *Physiol. Rev.* 59:527

Chiu, D; Kuypers, F; Lubin, B. (1989) "Lipid peroxidation in human red cells" *Seminars in Hematology* 26(4): 257-276

Davies, KJ. (1987a) "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects" *J. Biol. Chem.* 262(20): 9895-9901

Davies, KJ. (1987b) "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids" *J. Biol. Chem.* 262(20): 9902-9907

Davies, KJ. (1987c) "Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure " *J. Biol. Chem.* 262(20): 9908-9913

Davies, KJ. (1987d) "Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denature protein" *J. Biol. Chem.* 262(20): 9914-9920

Davies, KJ; Goldberg, AL. (1987a) "Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanism in erythrocytes" *J. Biol. Chem.* 262(17), 8220-8226

Davies, KJ; Goldberg, AL. (1987b) "Protein damage by oxigen radicals are rapidly degradedin extracts of red blood cells" *J. Biol.Chem.* 262 (17):8227-8234

- Del Prato, S., R. A. DeFronzo, P. Castellino, J. Whares and A. Alvestrand (1990) "Regulation of amino acid metabolism by epinephrine" *Am. J. Physiol.* 258 (Endocrinol. Metab. 21):E878-E887
- Dockham, P.A.; Sreerama, L; Sladek, N. E. (1997) "Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the systemic detoxification of the oxazaphosphorines" *Drug. Metab. Dispos.* 25(12):1436-41
- Dwaight B. H. (1976) "Social aspects of alcoholism: Anthropological perspectives on the social biology of alcohol: an introduction to the literature" Editores recopiladores Kissin Benjamin and Begleiter Henri. Editorial Plenum Press NY USA pp 37-76
- Fataccioli V, Andraud E, Gentil M, French SW, and Rouach H. (1999) "Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress" *Hepatology*; 29(1):14-20
- Flakoll, P. J.; M. Kulaylat, M. Frexes-Steed, H. Hourami, L. L. Brown, J. O. Hill, and N. N. Abumrad (1989) "Amino acid augment insulin's suppression of whole body proteolysis" *Am. J. Physiol.* 257 (Endocrinol. Metab. 20):E839-E847
- Fryburg DA, Gelfand RA, Jahn LA, Oliveras D, Sherwin RS, Sacca L, Barrett EJ. (1996) "Effects of epinephrine on human muscle glucose and protein metabolism" *Am J. Physiol.* ():E55-E59
- Gibson, A. G. (1975) "Alcohol can be absorbed through the respiratory tract (A case report)" *Med. Sci. Law* pp 64
- Grune, T. and Davies K.J. (1997) "Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells" *Biofactors* 6:165-172

- Gutierrez, S. J; Zentella de Piña, M; Piña, E. (1993) "Acute ethanol intake produce lipid peroxidation in rat red blood cells membranes" *Biochem. Molec. Biol Intern.* 29 (2): 263-270
- Halliwell, B and Gutteridge, J. (1989) "Free radicals in biology and medicine" Ed. Clarendon Press. Oxford pp 137-142
- Hillman, R. S. (1987) "El eritrocito" Ed. El Manual Moderno México pp 1-23
- Holtzman JL, Gebhard RL, Eckfeldt JH, Mottonen LR, Finley DK, and Eshelman FN (1985) "The effects of several weeks of ethanol consumption on ethanol kinetics in normal men and women" *Clin. Pharmacol. Ther.* 38:157
- J. van der Zee; T.M.A.R. Dubbelman, J. van Steveninck. (1985) " Peroxide-induce damage in human erythrocytes" *Biochem. Biophys. Acta* 818: 38-44
- Kraezlin, M. E., U. Keller, A. Keller, A. Thelin, M. J. Arnaud and W. Stauffacher (1989) "Elevation of plasma epinephrine concentrations inhibits proteolysis and leucine oxidation in man via β -adrenergic mechanisms" *J. Clin. Invest.* 84:388-393
- Kricka, I, J and Clark, P. M. S. (1979) "Biochemistry of alcohol and alcoholism" (Ellis Horwood series in Chemical Science) Halsted Press. pp1-69
- Lizano, C; Sanz, S; Luke, J; Pinilla M. (1998) "In vitro study of alcohol dehydrogenase and aceteldehyde dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by an electroporation procedure" *Biochim. Biophys. Acta* 1425(2):328-336

- Milke, G. M. (1995) "Metabolismo del alcohol en presencia del daño hepático"
Tesis de licenciatura en nutrición y ciencias de los alimentos. Universidad
Iberoamericana, México D.F. IX-XI
- Mira, Lurdes; Maia, Luisa; Barreira, Luisa; Manso, C.F. (1995) "Evidence for
Free Radical generation due to NADH oxidation by Aldehyde Oxidase during
ethanol metabolism" Arch. Bioch. Bioph. 318 (1): 53-58
- Mortensen, AM; Runge-Morris, M and Novak, RF (1991) "Generation of free
radicals results in increased rates of protein degradation in human
erythrocytes" Adv. Exp. Med. Biol. 283: 771-776
- Moser, K.; Pepenberg, J. V.; Wartburg, J. P. (1968) "Heterogenitat and
organveteilung der Alkoholhydrogenase bei verscheidenen spezies"
Enzym. Biol. Clin. 9: 447
- Motoni, Kadowaki; Tomoko, Kamata and Tadashi, Noguchi (1996) "Acute
effect of epinephrine on muscle proteolysis in perfused rat hindquarters"
Am J. Physiol. 270(6 pt 1):E961-E967
- Nomiyama, K. and Nomiyama, H. (1974) "Respiratory retention uptake and
excretion of organic solvents in man" Int. Arch. Arbeitsmed 32: 75-83
- Normann, Rogers; Ribiere, Catherine; Rouach, Helene (1992) "Implication of
free radical mechanism in ethanol induce cellular injury" Free Radical Biology
and Medicine 12: 219-240
- Pacifi, R; Davies, KJ, (1993) "Methods in Enzymology" Academic Press,
U.S.A. p. 497

- Pacifici, Robert; Davies, KJ. (1991) "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free-radical Theory of aging revisited" *Gerontology* 37: 166-180
- Pösö, A. R. and Hirsimäki P. (1991) "Inhibition of proteolysis in the liver by chronic ethanol feeding" *Biochem. J.* 273:149-152
- Reed, T. E.; Kalant, A; Gibbins R. J.; Khanna, B. M. (1976) "Alcohol and acetaldehyde metabolism in caucasians, chinese and amerinds" *Can. Med. Assoc. J.* 115:851-855
- Reinke, L. A.; Kotake Y.; McCay, P. B. and Janzen, E. G. (1991) "Spin trapping studies of hepatic free radicals formed following the acute administration of ethanol to rats: *in vivo* detection of 1-hydroxyethyl radicals with PBN" *Free Radic. Biol. Med.* 11:31-39
- Riveros, R. H; Sánchez, A; Piña, E. (1997) "Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals" *Arch. Med. Research* 28 (4): 453-471
- Rivett , Jennifer. (1993), "Proteosomes: multicatalytic proteinase complexes" *Biochem. J.* 291:1-10
- Runge-Morris, MA; Iacob, S; Novak, RF. (1988) "Characterization of hydrazine-stimulated proteolysis in human erythrocytes" *Toxicology and applied pharmacol.* 94: 414-426
- Sanz, S; Pinilla, M; Garin, M; Tipton, K. F.; Luque, J. (1995) "The influence of enzyme concentration on the encapsulation of glutamate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in red blood cells" *Biotechnol. Appl. Biochem* 22(pt 2):223-231

- Schmidt, Marion and Kloetzel, Peter-M. (1997) "Biogenesis of eukaryotic 20S proteosomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme" *FASEB. J.* 11: 1235-1243
- Udenfriend, S; Cooper, J. (1952) "The chemical estimation of tyrosine and tyramine" *J. Biol. Chem.* 196: 227-233.
- Varga, Sz.I; Novák, Z; Pataki, L; Patocskai, M; Matkovics, B. (1992) " The influence of antioxidants on the oxidative stress of red blood cells" *Clinica Chimica Acta* 205: 241-244
- Velasco, Rafael. (1992) "Esa enfermedad llamada alcoholismo" Ed. Trillas México p 11
- Vogel, W. H.; De Turck, K. and Miller, J.M. (1986) "Differential effects of ethanol on plasma catecholamine levels in rats" *Biochem. Pharmacol.* 35(22):3983-3987
- Von Dahl, Stephan and Häussinger, Dieter (1998) "Bumetanide-sensitive cell swelling mediates the inhibitory effect of ethanol on proteolysis in rat liver" *Gastroenterology* 114:1046-1053
- Waalkes, T.P., Udenfien, S. (1957) "A fluorometric method for the estimation of Tyrosine in plasma and tissues" *J. Lab. and Clin. Med.* Nov:733-736.
- Zentella de Piña, M; Corona, G.S; Saldaña, B.Y. (1994a) "Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos". *BEB* 94 Sept. 13(3):87-93
- Zentella de Piña, M; Díaz Belmont, A; Rodríguez Lizárraga, L; Corona Garcia, S. (1994b) "Lipoperoxidación de las membranas de eritrocito como un

posible indicador del estrés oxidativo en el paciente alcohólico" Rev. Med. del Hospital General de México, S.S. 57 (1): 15-21

Zentella, Martha; Díaz Belmont, A; Rodríguez, L; Escotto, J. (1993) "Importancia del polimorfismo en el metabolismo del etanol" Rev. Med. del Hospital General de México, S.S. 56 (3): 113-124

Zentella, Martha; Piña, Enrique. (1987) "Metabolitos del etanol" Mensaje Bioquímico 10:143-175 Dep. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM México