

11281 51



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES
MODIFICAN LA RESPUESTA LIPOLÍTICA A LA
EPINEFRINA EN LOS ADIPOCITOS AISLADOS
DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A

la M. en C. MARTHA ZENTELLA MAYER

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE PIÑA GARZA

MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**TESIS
FALLA
DE
ORIGEN**

PAGINACION

DISCONTINUA

... en formato electrónico e imp...
mi trabajo recepción
Zaidaella MAYER
MAY + HA
2-DIC-2002
12-42

Agradezco sobre todo al equipo humano que con un alto espíritu de trabajo y un gran sentido de colaboración me escuchó, criticó, discutió, disintió una y otra vez mis presentaciones o las de mis alumnos (asesorados en servicio social o en tesis) hasta que se logró la realización de este trabajo. Gracias Nora Monserrat Alarcón, Ivonne Caballero Cruz, Edmundo Chávez Cossio, Armando Díaz Belmont, Antonio Díaz Cruz, Raquel Guinzberg Perrusquía, Aida Hernández Tobías, Enrique Moreno Hernández, Alejandra Palomares Ayala, Enrique Piña Garza, Héctor Riveros Rosas, Alma Rocha Hernández, Yolanda Saldaña Balmori, Adrián Sandoval Montiel, Héctor Vázquez Meza y Rafael Villalobos Molina.

Muchas gracias

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
ANTECEDENTES	5
INTRODUCCIÓN.....	7
Acciones tóxicas del etanol.....	8
Cambios en la relación $NAD^+/NADH$	13
Lanzaderas.....	13
Acetaldehído	14
Hígado graso.....	15
Aumento en la síntesis de ácidos grasos hepáticos.....	15
Disminución de la β -oxidación.....	17
Aumento de la esterificación de los ácidos grasos.....	19
Anormalidades en la formación de lipoproteínas tipo VLDL.....	19
Estimulación de la lipólisis periférica y de la movilización de ácidos grasos provenientes de tejido adiposo periférico	19
Algunas funciones afectadas por el estrés oxidativo desencadenado por la intoxicación aguda con etanol.....	20
Lipoperoxidación	20
Correlación entre los TAG y la lipoperoxidación en el hígado.....	24
Origen de los radicales libres en la intoxicación alcohólica aguda.....	24
Metabolismo del glutatión: defensa contra el estrés oxidativo.....	29
Consideraciones privilegiadas en esta tesis.....	33
NSAID: los antiinflamatorios no esteroideos.....	34
Mecanismos de acción.....	34
Aspirina	37
Biotransformación y excreción	38
Efectos tóxicos	38
Naproxen	39
Efectos tóxicos	40
Nimesulide	40
Piroxicam	41
Propiedades farmacológicas	42
Farmacocinética y metabolismo	42
Efectos tóxicos	42
Usos terapéuticos.....	43
HIPÓTESIS:	44
OBJETIVO GENERAL:	44

OBJETIVOS PARTICULARES:	44
MATERIAL Y MÉTODOS:	45
Material	45
Métodos	45
<i>Preparación de las membranas plasmáticas de hígado</i>	45
<i>Experimentos de saturación de los receptores</i>	47
<i>Experimentos de competencia, entre el ligando y los NSAID, por el receptor</i>	47
<i>Preparación de adipocitos</i>	48
Técnica de Rodbell	48
Técnica de Honnor.....	48
<i>Diseño experimental para evaluación de la lipólisis</i>	49
Curva dosis respuesta a epinefrina.....	49
Curva dosis-respuesta al dibutilil AMPc (Dib-AMPc)	49
Determinación de glicerol.....	50
Determinación de proteínas	50
Cuantificación del agua oxigenada	50
Estadística empleada.....	50
RESULTADOS	52
<i>Efecto de los NSAID sobre la lipólisis</i>	52
<i>Efecto del etanol, el acetaldehído y ambos sobre la lipólisis estimulada por el Dib-AMPc e inhibida por los NSAID</i>	56
<i>Participación del H₂O₂ mediando los efectos del Dib-AMPc y los NSAID</i>	68
DISCUSIÓN	81
<i>Participación de los NSAID en el tejido adiposo</i>	83
<i>Relevancia del aporte de ácidos grasos en el estrés oxidativo hepático causado por el etanol</i>	86
<i>Acciones opuesta del etanol y los NSAID en el hepatocito</i>	90
CONCLUSIONES	92
PROSPECTIVA	93
REFERENCIAS	96
ANEXOS	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
AGNE	Ácidos grasos no esterificados o ácidos grasos libres
AMP	Adenosin monofosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ATP	Adenosintrifosfato
B_{max}	Unión máxima del ligando
COX	Ciclooxigenasa
Dib-AMPc	Dibutiril adenosin monofosfato cíclico
Dihidroxiacetona P	Dihidroxiacetona fosfato
DE₅₀	Dosis efectiva en el 50% de los ensayos
DL₅₀	Dosis letal en el 50% de los ensayos
ee	Error estándar
Glicerol P	Glicerofosfato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GSHPx	Glutación peroxidasa
K_d	Constante de disociación
MAD	Malondialdehído
NAD⁺	Nacotinamin adenín dinucleótido
NADH	Nacotinamin adenín dinucleótido reducido
NF-κB	Factor nuclear kappaB
NSAID	Anti-inflamatorios no esteroideos

p. c.	Peso corporal
p. h.	Peso húmedo
P: O	Fosforilación oxidativa
PP	Pirofosfato
ROS	Especies de oxígeno reactivas
SOD	Superóxido dismutasa
TAG	Triacilglicéridos
TBARS	Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNFα	Factor alfa de necrosis tumoral
U	Unidades de actividad enzimática = molas de sustrato convertidas por min por molas de enzima

RESUMEN

En la literatura internacional se registra que la intoxicación alcohólica (5 g/kg peso o más) promueve estrés oxidativo hepático, hígado graso y aumento en la secreción de epinefrina; también se sabe que en ese hígado se propicia la peroxidación de los ácidos grasos y que el glutatión se consume al limitar los daños promovidos por el estrés oxidativo. Nosotros encontramos que los anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID)—aspirina, naproxén, nimesulide y piroxicam—contrarrestan en el hígado los siguientes efectos producidos por la intoxicación aguda con etanol: aumento en los triacilglicéridos y en la poza de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico y disminución del glutatión total. Con excepción del nimesulide, los otros NSAID abaten además los niveles de etanol en sangre. La intención en esta tesis fue profundizar a nivel molecular en el origen del antagonismo entre las acciones del etanol y las de los NSAID.

La hipótesis de trabajo que se sostiene en la tesis es que, en el modelo del animal íntegro intoxicado con etanol, las alteraciones hepáticas producidas por este tóxico resultan de la sumatoria de las respuestas que el propio etanol desencadena en diferentes estirpes celulares, incluyendo al hepatocito. En consecuencia una acción benéfica de los anti-inflamatorios observable en el hígado, puede ser resultado del efecto de estos compuestos en otro tejido del animal, en el cual, el etanol ocasiona una alteración prevenible por los anti-inflamatorios.

Para este trabajo en particular se consideró a la descarga adrenérgica causada por la intoxicación con etanol como el desencadenante de la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo y a su vez como la causa más probable de hígado graso, de manera que si los NSAID llegan a impedir la acción de la epinefrina en el tejido adiposo, esto es, bloquean la liberación de ácidos grasos de dicho tejido, podrían limitar de manera importante las lesiones observables en el hígado después de una intoxicación aguda con etanol. Se emplearon adipocitos aislados como modelo experimental, y los objetivos específicos fueron: a) evaluar el papel de los anti-inflamatorios seleccionados sobre la lipólisis estimulada con epinefrina, b) en caso de que los NSAID actúen sobre la lipólisis estimulada, investigar el mecanismo de acción de esos anti-inflamatorios y c) definir el efecto del etanol y el acetaldehído (a las concentraciones detectadas en la sangre de los sujetos intoxicados con etanol)

sobre la lipólisis estimulada con AMPc, en ausencia y en presencia de los anti-inflamatorios usados.

En adipocitos aislados los NSAID inhiben la lipólisis estimulada por epinefrina. Esos mismos 4 NSAID, en ausencia o en presencia de 50 mM etanol tal como sucede en el animal intoxicado, no modifican la unión ("binding") del agonista β -adrenérgico, dihidroalprenolol, a su receptor. Los NSAID a concentraciones 3 000 veces más bajas de las usadas para estimular con el AMPcíclico (10^{-3} M) inhiben la activación de la lipólisis promovida por el nucleótido cíclico. A su vez, el etanol y el acetaldehído, empleados a las concentraciones sanguíneas que se registran en los bebedores, esto es de 50 mM y 50 μ M respectivamente, el primero inhibe y el segundo estimula la lipólisis estimulada por el AMPc. Sin embargo, ni el etanol ni el acetaldehído modifican la acción inhibitoria de los NSAID sobre la lipólisis estimulada con AMPc. A semejanza de lo que sucede con la insulina sobre la lipólisis, los NSAID aumentan la formación de H_2O_2 en el adipocito. Además, el AMPc tiende a bajar los niveles de H_2O_2 alcanzados por los NSAID. En conclusión, es muy probable que los NSAID estudiados, en un proceso en el que participa el H_2O_2 , inhiban la lipólisis hormono-estimulada.

Estos hallazgos ayudan a explicar el mecanismo de acción protectora de los NSAID, revirtiendo las alteraciones hepáticas producidas por la intoxicación aguda con etanol: inhibición de la lipólisis estimulada por AMPc \rightarrow disminución de ácidos grasos recibidos por el hígado y ausencia de hígado graso \rightarrow menor peroxidación al haber menor poza de ácidos grasos \rightarrow menor estado de tensión oxidativa \rightarrow menor consumo de glutatión. La contribución relativa de esta menor movilización de ácidos grasos hacia el hígado mediada por los NSAID durante la intoxicación etílica aguda con respecto al daño oxidativo en el hígado está aún en espera de ser aclarada.

SUMMARY

Ethanol intoxication with 5 g/kg of body weight promotes hepatic oxidative stress, fatty liver and a rise in adrenergic secretion. It is also known that in the liver of intoxicated animals there is an increase in fatty acids peroxidation; further total glutathione content falls imposing an additional compromise in confronting more oxidative stress. We found that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)—aspirin, naproxen, nimesulide and piroxicam—prevent in the liver the following ethanol-mediated effects: increase in triacylglycerides, in thiobarbituric acid reactive substances pool and the decrease in total glutathione. With the exception of nimesulide, the other NSAID lowered also the concentration of blood ethanol. This thesis is an attempt to understand the molecular bases of the antagonism between ethanol and NSAID actions.

The working hypothesis was that in the ethanol intoxicated whole animal model; hepatic disturbances represent the sum of different responses elicited by ethanol in all types of cells, including the hepatocytes. Consequently, the benefit caused by NSAID and observed in the complete organ might result from the NSAID action on distinct cell types within and outside of the liver.

In this work it is accepted that the adrenergic response caused by acute ethanol intoxication, impinge adipose tissue and start fatty acids liberation to cause fatty liver. If NSAID prevent fatty acid liberation by inhibiting epinephrine action then they might impede some liver disturbances due to acute ethanol intoxication. Since epinephrine mediated lipolysis in adipocytes requires cAMP, the experimental model included isolated adipocytes from the epididymal fat pad with the following specific objectives: a) evaluate the role of selected NSAID on epinephrine-stimulated lipolysis, b) in case that NSAID regulates epinephrine-stimulated lipolysis, then, dissect their molecular mechanism of action, c) study the effect of ethanol and acetaldehyde (at the concentration detected in blood of intoxicated subjects) on cAMP stimulated lipolysis in presence and in absence of NSAID.

In isolated adipocytes selected NSAID inhibit epinephrine-stimulated lipolysis. The same NSAID do not modify binding of β -adrenergic agonist, dehydroalprenolol, to their receptor, even if 50 mM ethanol is present. These NSAID, inhibit activated-lipolysis promoted by cAMP, the effect occurred at NSAID concentrations 3 000-fold

lower than cAMP (10^{-3} M), 50 mM ethanol inhibits and 50 μ M acetaldehyde stimulates cAMP-activated lipolysis. These concentration of ethanol and/or acetaldehyde do not interfere with the inhibitory action of NSAID on cAMP-activated lipolysis. Selected NSAID stimulate the formation of H_2O_2 in isolated adipocytes and cAMP lower the H_2O_2 levels increased by NSAID. In conclusion, the inhibitory action of NSAID on epinephrine-(or cAMP)-stimulated lipolysis is probably mediated by H_2O_2 .

These findings contribute to explain the protective action of NSAID reverting hepatic disturbances produced by acute ethanol intoxication: inhibition of cAMP-activated lipolysis \rightarrow decrease in fatty acids accepted by the liver and absence of fatty liver \rightarrow decrease in lipid peroxidation due to a lower pool of fatty acids \rightarrow lower oxidative tension \rightarrow decrease consumption of glutathione. The relative contribution of this reduced lipid mobilization mediated by NSAID during acute ethanol intoxication with respect to oxidative damage in the liver remains to be clarified.

ANTECEDENTES

La historia del hombre está ligada al consumo de alcohol, pero nunca como ahora el alcoholismo es causante de una enorme problemática que afecta todas las esferas sociales y económicas (Williams *et al.*, 1988) y peor aún, cada vez afecta la salud de mujeres y de hombres más jóvenes (Schuckit e Irvin, 1988). Sin embargo, el consumo de alcohol en cantidades moderadas tiene efectos psicotrópicos muy importantes que pueden redundar en beneficio para la salud (Zentella de Piña *et al.*, 1989 y 1991). Mientras que los animales lo beben generalmente porque no tienen otra alternativa, la mayoría de los humanos encuentra placentero su consumo por estimular el apetito, ser tranquilizante, causar euforia y sedación; además, el consumo de etanol tiende a evadir en el consumidor las restricciones sociales e induce un aumento transitorio del sentimiento de autoestima; más aún, el bebedor sobreestima sus talentos y habilidades. Estos seductores y breves efectos del alcohol van en aumento conforme mayor es el consumo, hasta que llevan a un decremento de las interacciones sociales y personales de quien se habitúa a su uso exagerado.

Desde hace siglos se identifica al hígado como uno de los tejidos preferentemente dañados en el humano por la ingestión, tanto aguda como crónica, de etanol. La relación entre el etanol y los anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID, su abreviatura más empleada en la literatura biomédica a partir del nombre en inglés: nosteroidal anti-inflammatory drugs) surgió por una comunicación personal del Dr. Armando Díaz Belmont en la Clínica de Atención a Problemas Relacionados con el Alcoholismo del Hospital General de México. Este médico observó que los pacientes reumáticos con una importante hepatopatía alcohólica, al ser tratados con NSAID evolucionaban mejor que los que no consumían anti-inflamatorios. De ahí que pareciera interesante investigar por qué las alteraciones hepáticas durante la intoxicación alcohólica son paleadas por los dichos NSAID.

Esta tesis se presenta como un resumen de mi actividad de investigación durante varios años. Así, no aspira a ser una versión ampliada de una publicación concreta (Zentella de Piña *et al.*, 2002), sino que se ofrece como un conjunto de trabajos de investigación que paulatinamente se fueron integrando y organizando a través de una idea unificadora, que permite un análisis razonado sobre la interacción

entre las acciones moleculares desencadenadas por el etanol, el tóxico más empleado por el hombre (Williams *et al.*, 1988) y los NSAID, el grupo de fármacos más prescrito por los médicos (Langman, 1988). Incluso se incorporan a la tesis resultados más recientes que se espera sean objeto de próximas comunicaciones.

Dada la dificultad de analizar a nivel molecular los resultados observados por Díaz Belmont, se estableció un modelo animal de intoxicación aguda con etanol en el que se reprodujeron algunas de las acciones tóxicas bien identificadas al administrar etanol. Resultó muy halagüeño constatar que varias de esas alteraciones eran menores al administrar los NSAID seleccionados. La parte más compleja, y la que abarca la mayor proporción de esta tesis, fue la de avanzar en una explicación molecular sobre los efectos benéficos de los NSAID. La dificultad se debió en parte, a que hubo que buscar la respuesta en tejidos diferentes al hepático.

INTRODUCCIÓN

Las primeras publicaciones internacionales referentes al efecto de varios NSAID, limitando algunas acciones tóxicas resultantes de la intoxicación aguda por etanol, se realizaron en mi laboratorio (Zentella de Piña *et al.*, 1992; 1993). En breve, ahí se describe que varios compuestos pertenecientes al grupo de los NSAID tienen la capacidad de prevenir parcialmente dos de las acciones hepatotóxicas por exceso en el consumo agudo de etanol; una, la acumulación de triacilglicéridos (TAG) hepáticos (Fig. 1) y otra, la elevación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Fig. 2). La determinación de las ROS se efectuó mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA) y otros aldehídos, por lo que con más propiedad se le conoce como la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), la cual es el indicador más usado en la literatura internacional para cuantificar los radicales libres del oxígeno (Halliwell, 1995). Al respecto se sabe que el metabolismo hepático del etanol, administrado en grandes cantidades, provoca un estrés oxidativo importante (Bondy y Pearson, 1993).

También se reportaron a la comunidad internacional otros dos hallazgos: 1) algunos de los NSAID estudiados disminuyen los niveles de etanol sanguíneo, en comparación con los controles que solamente reciben la misma dosis única y elevada de etanol (Fig. 3) (Zentella de Piña *et al.*, 1992; Zentella de Piña *et al.*, 1993), y 2) algunos NSAID, en particular el piroxicam, impiden además la disminución en los niveles de glutatión hepático a consecuencia de una intoxicación aguda por etanol (Tabla I) (Zentella de Piña *et al.*, 1994).

Si bien algunos datos del laboratorio indican que cuando menos el piroxicam acelera la oxidación hepática del etanol (Riveros-Rosas *et al.*, 1999), a la fecha no existe una explicación integral de la capacidad de varios NSAID para disminuir la concentración sanguínea de etanol. En relación con los mencionados tres efectos de los NSAID, previniendo las acciones tóxicas del etanol en el hígado, resulta conveniente una aclaración preliminar. La acumulación de TAG hepáticos es una de las acciones tóxicas del etanol descritas desde hace más de 50 años, por lo que en esta tesis se describen las hipótesis que mejor ayudan a explicar la alteración, para después tratar de investigar el por qué los NSAID limitan ese cúmulo de TAG hepáticos a pesar de la presencia del etanol. La elevación de TBARS y la

disminución del glutatión, ambos efectos detectados en el hígado a consecuencia de la intoxicación etílica, son indicadores celulares del también descrito cuadro de estrés oxidativo ocasionado por el etanol y son indicadores cuya presencia es disminuida por la administración de los 4 NSAID aquí usados. Por lo mismo, en la tesis se revisan las hipótesis más recientes sobre el origen del estrés oxidativo promovido por la intoxicación con etanol, para enseguida tratar de ubicar el efecto de los NSAID limitando dicho estrés oxidativo.

Vale la pena hacer notar que tanto en el caso de la elevación de los TAG hepáticos, como en el de activación del estrés oxidativo en el mismo hígado, las hipótesis más probables para explicar las acciones tóxicas del etanol involucran una activa participación de tejidos extra-hepáticos, por lo que la elección de modelos experimentales para entender algunos de los efectos de los NSAID incluyó el empleo de tejidos extra-hepáticos en el intento de resolver un problema que se manifiesta en el hígado.

Acciones tóxicas del etanol

En este apartado sólo se revisan algunas acciones producidas por el etanol en el hígado de los mamíferos, en particular las acciones del tóxico que muestran relación o relevancia sobre la acumulación de material graso en el hígado. Este ha sido tema de estudio desde hace muchos años, sin embargo, la secuencia de eventos desde su instalación hasta el daño hepático irreversible aún no se conoce en su totalidad a nivel molecular. En vista de la vastedad del campo, se limitó al análisis a aquellas acciones deletéreas ocasionados por una intoxicación aguda con etanol en el hígado y que han mostrado ser controladas por mediación de los siguientes NSAID: aspirina, naproxen, nimesulide y piroxicam. Por lo tanto, es conveniente precisar el modelo experimental seleccionado, con lo que se acota la información y puede ahondarse en el análisis. Se escogió la intoxicación aguda con etanol (5g/kg de peso corporal) por vía orogástrica, que si bien representa una dosis alta de etanol, asegura la reproducibilidad cuantitativa de los efectos (Reitz, 1979).

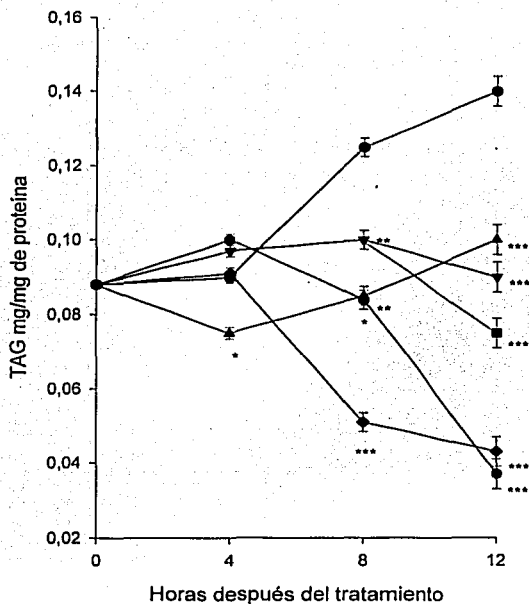


Fig. 1. Efecto del etanol y los NSAID sobre el curso temporal del contenido de triacilglicéridos hepáticos. Etanol (●) administrado por sonda orogástrica 5 g, equivalentes a 37.5 kcal/kg de p.c. como solución al 30% más 0.9% de NaCl cantidad equivalente a la usada para disolver los NSAID. Etanol más aspirina 56 mg/Kg p.c. una sola dosis (▼), refuerzo con una segunda dosis idéntica (■). Etanol más naproxen 7 mg/Kg p.c. (◆). Etanol más nimesulide 30 mg/Kg p.c. (▲). Etanol más piroxicam 10 mg/Kg p.c. (●). Cada punto representa el promedio de 4-6 determinaciones \pm ee * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

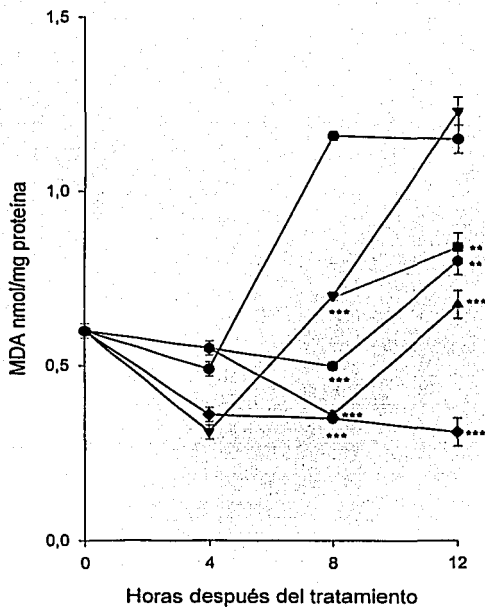


Fig. 2. Efecto del etanol y los NSAID sobre el curso temporal del contenido de malondialdehido (MAD) en el hígado. Etanol (●) administrado por sonda orogástrica 5 g, equivalentes a 37.5 kcal/kg de p.c. como solución al 30% más 0.9% de NaCl cantidad equivalente a la usada para disolver los NSAID. Etanol más aspirina 56 mg/Kg p.c. una sola dosis (▼), con una segunda dosis de aspirina a las 8 h (■). Etanol más naproxen 7 mg/Kg p.c. (◆). Etanol más nimesulide 30 mg/Kg p.c. (▲). Etanol más piroxicam 10 mg/Kg p.c. (●). Cada punto representa el promedio de 4-6 determinaciones ± ee *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

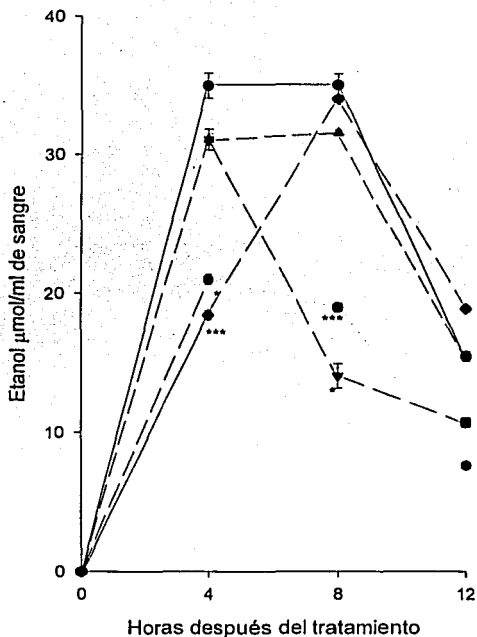


Fig. 3. Efecto de los NSAID sobre el curso temporal de la concentración de etanol en sangre. Etanol (●) administrado por sonda orogástrica 5 g, equivalentes a 37.5 kcal/kg de p.c. como solución al 30% más 0.9% de NaCl cantidad equivalente a la usada para disolver los NSAID. Etanol más aspirina 56 mg/Kg p.c. (▼) una sola dosis, con una segunda dosis de aspirina a las 8 h (■). Etanol más naproxen 7 mg/Kg p.c. (◆). Etanol más nimesulide 30 mg/Kg p.c. (▲). Etanol más piroxicam 10 mg/Kg p.c. (●). Cada punto representa el promedio de 4-6 determinaciones \pm ee *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Tabla I
EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIROXICAM SOBRE LA POZA DE
GLUTATIÓN HEPÁTICO EN RATAS

TRATAMIENTO	GSH+GSSG μmol/g de pH de hígado
Glucosa + salina	4.62 ± 0.35 (5)
Glucosa + piroxicam	3.63 ± 0.20 (4)
Etanol +salina	3.05 ± 0.37* (5)
Etanol + piroxicam	4.17 ± 0.11** (4)

Las ratas recibieron dosis isocalóricas de glucosa o etanol por vía orogástrica (5 g/kg peso corporal). Piroxicam (10 mg/kg peso corporal). Los datos corresponden al promedio ± error estándar con el número de ratas en paréntesis. * p < 0.01 al comparar glucosa + salina vs etanol + salina, ** p < 0.03 al comparar etanol + salina vs etanol + piroxicam.

En las siguientes páginas del texto se revisan un conjunto de acciones del etanol que inciden sobre el hígado, cuando en esta tesis, desde el punto de vista experimental, se estudian las acciones de los NSAID a nivel del adipocito. Vale la pena una aclaración al respecto. A lo largo de este trabajo, y con base en la literatura internacional, se ofrecen los datos experimentales en favor de que una intoxicación aguda con etanol active la lipólisis en el tejido adiposo periférico y ello eleva los TAG hepáticos. Además, se revisan brevemente los ajustes metabólicos en el hígado que favorecen el depósito de TAG hepáticos. También se incluye en la introducción los siguientes efectos deletéreos causados por el exceso de etanol en el hígado: aumento de ROS, algunas funciones modificadas por el estrés oxidativo y el descenso de glutatión hepático. Al tratar estos tres temas se intenta explicar que si el hígado del animal intoxicado con etanol no recibe ácidos grasos de los tejidos periféricos, no desarrolla un cúmulo de TAG, pero tampoco se elevan los RL, ni se afectan funciones que dependen del aumento de esos RL, ni se "invierte" el glutatión

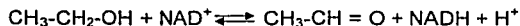
para así abatir la elevada poza de los mismos RL. En conclusión, si los NSAID impiden la liberación de los AGNE de los adipocitos, evitarán en el hígado del animal intoxicado, consecuentemente, la elevación de los TAG y de los RL, así como la disminución del glutatión.

Cambios en la relación NAD⁺/NADH

Desde hace unas 4 décadas se estableció que en los distintos compartimientos celulares, como el citosol y la mitocondria por ejemplo, las deshidrogenasas se encuentran en una situación cercana al equilibrio de la reacción, de manera que la concentración del sustrato y el producto definen la relación de las respectivas coenzimas (Krebs, 1973). El caso general puede ilustrarse así:



En la intoxicación alcohólica, el exceso de etanol en la celdilla hepática, donde se oxida el 90% del mismo, desplazará el equilibrio de la deshidrogenasa alcohólica hacia la derecha, con un mayor consumo de NAD⁺ y una mayor formación de NADH.



La relación NAD⁺/NADH presente en el hepatocito normal tiene un valor cercano a 1000, la intoxicación alcohólica puede descender dicha relación unas 10 veces, lo que propiciará una elevación de los sustratos reducidos y una disminución de los sustratos oxidados de todas las deshidrogenasas del citosol que comparten el uso de las coenzimas NAD⁺ y NADH (Krebs, 1968).

Lanzaderas

En el citosol de las células presentes en los tejidos de los mamíferos no existe un sistema para la "oxidación" del NADH, tal como sí existe en las mitocondrias de las mismas células, en donde la oxidación del NADH opera como el principal alimentador de la cadena respiratoria y consecuentemente de la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP. Sin embargo, la membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH y al NAD⁺, por lo que las pozas de ambos piridín nucleótidos están física y funcionalmente separadas (Dawson, 1979). La situación ideal apuntaría a que el NADH citosólico pasara al interior de la mitocondria para el uso ya mencionado. En el caso de una ingestión elevada de alcohol, el hígado del individuo

intoxicado, a medida que oxida el etanol, convierte cada vez más NAD^+ citosólico en un exceso de NADH , al grado que se llega a impedir la oxidación de sustratos por la falta de NAD^+ disponible para recibir hidruros provenientes de los sustratos reducidos, como el etanol o el lactato. Se considera que la velocidad de conversión del NADH al NAD^+ citosólico, en el hepatocito, es el principal factor limitante en la oxidación de más etanol (Rossiter y Slater, 1973).

En las células hepáticas se sabe que las llamadas "lanzaderas" participan en la solución del problema. En el hígado de los mamíferos se han descrito dos lanzaderas, la del malato/aspartato y la del glicerolfosfato. Lo que sucede con la participación de las lanzaderas es que se transfieren los equivalentes reductores de las coenzimas utilizando un sustrato reducido localizado en el citosol, proveniente de una deshidrogenasa dependiente de NAD^+ y formado en exceso por el numerador de la pareja NADH/NAD^+ , el cual es transferido del citosol a la mitocondria. Las figuras 4 y 5 ilustran el funcionamiento de las dos lanzaderas más importantes.

En resumen: las coenzimas se mantienen en su compartimiento pero existe un flujo de sustratos reducidos del citosol a la mitocondria y otro recíproco y acoplado de sustratos oxidados desde la mitocondria hacia el citosol.

Acetaldehído

El acetaldehído es el primer producto de oxidación del etanol en las células de los mamíferos. Se origina por cualquiera de tres caminos enzimáticos descritos: deshidrogenasa alcohólica, sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) o la catalasa (Fig. 6). Además el acetaldehído se produce por otro mecanismo no enzimático, que es estimulado por la presencia de quelantes de hierro y agua oxigenada. Existe una batería de enzimas (citosólicas, mitocondriales y microsomales) con capacidad suficiente para oxidar al acetaldehído y convertirlo en acetato, de tal manera que, después de una intoxicación aguda con etanol, las concentraciones sanguíneas de acetaldehído son micromolares mientras que las de etanol son milimolares (Caballero-Cruz, 1998).

Hígado graso

La costumbre ha consagrado el nombre de hígado graso a la situación en que este órgano aumenta su contenido de TAG arriba de las cifras normales. Como se mencionó en párrafos previos se sabe que la administración de una dosis alta de etanol 5 g/kg de peso corporal (p. c.) produce hígado graso. Para explicar la acumulación de TAG hepáticos por etanol pueden invocarse varias causas particulares, pero es posible que se trate de un problema multicausal y multifactorial, donde los efectos del etanol van a depender de otros aspectos fisiológicos entre los que intervienen los genes, la edad, el sexo, la raza, el ayuno, la alimentación, el hábito de consumo de etanol, la posible inducción de sistemas enzimáticos capaces de activar el metabolismo del etanol (Ingelman-Sundberg y Jörnvall, 1984) y otros más. En la práctica estas variables pueden ser controladas en el laboratorio y para ello se emplean modelos de estudio que se detallan más adelante. A continuación se analizan brevemente las principales situaciones metabólicas modificables por la intoxicación con etanol que pueden ser causa del hígado graso.

Aumento en la síntesis de ácidos grasos hepáticos

La disminución hepática en la relación $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$, ocasionada por la intoxicación alcohólica, canaliza equivalentes reductores del citosol a la mitocondria, disminuye la oxidación de equivalentes reductores de la propia mitocondria y llega a inhibir el ciclo de los ácidos tricarbóxicos e incluso a lesionar las mitocondrias (Kießling, 1964). Además, el mencionado aumento en la poza de acetato se traduce en una elevación en la poza de acetil coenzima A. Esto es, se reemplaza la fuente normal de energía en el hígado, los ácidos grasos, por el acetato.

En este esquema de reajuste, se eleva la poza citosólica del citrato y se estimula la actividad de la acetil coenzima A carboxilasa, la enzima clave reguladora de la biosíntesis de los ácidos grasos. En conclusión, el etanol estimula la síntesis hepática de ácidos grasos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Nikkila y Ojala, 1976, Graham, *et al.*, 1975).

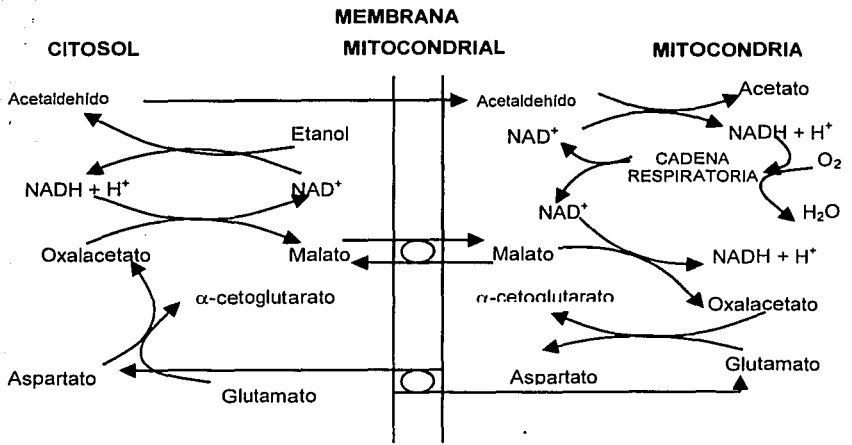


Fig. 4. Lanzadera del aspartato malato en el hígado.

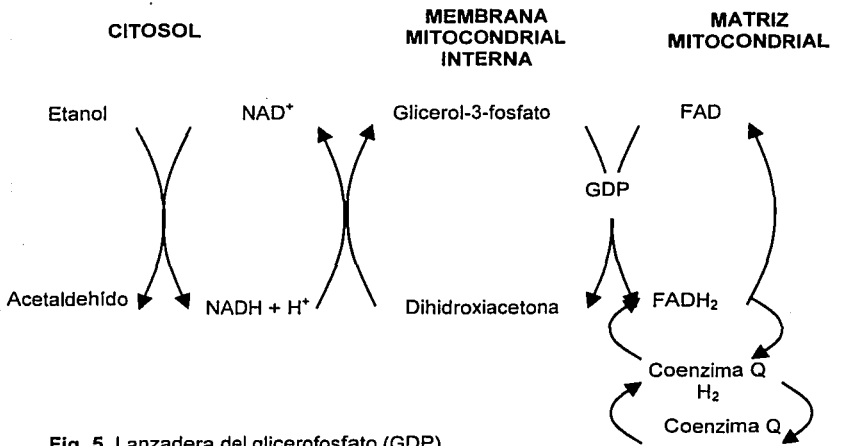


Fig. 5. Lanzadera del glicerofosfato (GDP).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Existen algunos aspectos no dilucidados: en los animales alimentados, el etanol eleva la lipogénesis, pero en los animales ayunados no se observa ese aumento en la síntesis de los ácidos grasos (Olivecrona *et al.*, 1972); la administración de sorbitol, glucosa y xilitol producen una rápida disminución en la relación $NAD^+/NADH$ a expensas de un aumento en el NADH citosólico en el hígado, pero no se eleva la síntesis de ácidos grasos (Reboucas e Isselbacher, 1961); otros autores, (Slater *et al.*, 1964), argumentan que la disminución en la relación $NAD^+/NADH$ sucede muy pronto después de la ingestión de etanol, y también asciende rápidamente; de manera que la relación es casi normal cuando la acumulación de grasa apenas comienza.

Disminución de la β -oxidación

En principio, la inhibición en la β -oxidación de los ácidos grasos se asocia con los siguientes mecanismos: 1) disminución en el aporte de oxígeno, o bien 2) sustitución en la disponibilidad de acetato por ácidos grasos.

1. Durante la oxidación hepática del etanol, un exceso de los equivalentes reductores del NADH en el citosol pasa la membrana mitocondrial vía lanzaderas y forma NADH, cuyos electrones fluyen a través de la cadena respiratoria y se combinan con oxígeno para formar agua; con esto se logra la reoxidación del NADH mitocondrial y se forma ATP. En los casos en que es excesivo el acarreo de electrones del citosol a la mitocondria, eventualmente podría existir un déficit de oxígeno.
2. En el hígado de los mamíferos, el sustrato que proporciona más calorías para realizar todas sus funciones lo constituyen los ácidos grasos. Sin embargo, la oxidación de las enormes cantidades de etanol en un individuo intoxicado, tal como sucede en la realidad, proveerá de grandes cantidades de sustrato en forma de acetil coenzima A, que reforzará la síntesis de ácidos grasos, lo cual impide la oxidación simultánea de los mismos.

Efectivamente el etanol *in vitro* disminuye la oxidación de los lípidos; no obstante, otras moléculas disminuyen la oxidación hepática de lípidos, como la glucosa, el sorbitol, el xilitol y la nicotinamida y no producen hígado graso (Reboucas e Isselbacher, 1961).

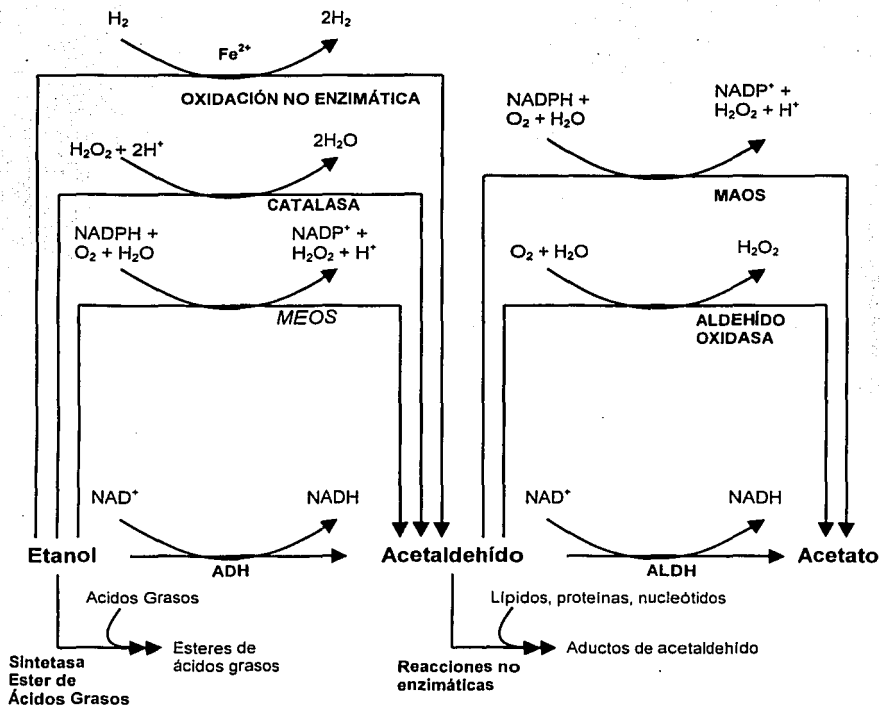


Fig. 6. Principales rutas metabólicas del etanol y del acetaldehído.

Aumento de la esterificación de los ácidos grasos

La administración de etanol a las ratas modifica el sistema esterificante en microsomas hepáticos. Existen datos en la literatura que reportan un aumento hasta de 4 veces en la incorporación de palmitato a TAG (Scheig e Isselbacher, 1965). Este aumento de esterificación de ácidos grasos se ha asociado con un aumento en hígado del α -glicerofosfato, sustrato necesario para la formación de triglicéridos. El aumento de α -glicerofosfato se favorece ampliamente por el desbalance redox de los sustratos reducidos presentes en el citosol del hepatocito, debido a un exceso en la producción del NADH.

Anormalidades en la formación de lipoproteínas tipo VLDL

Si bien durante la ingesta crónica de etanol disminuye la síntesis de proteínas hepáticas, no se ha demostrado que una dosis aguda y elevada de etanol altere las síntesis de las apoproteínas de las lipoproteínas hepáticas, tal como ha sido demostrado para el ácido orótico al usarse como productor de hígado graso. De manera que no existe sustento experimental suficiente para considerar en el modelo empleado a la síntesis de proteínas como el promotor primario del cúmulo de grasas neutras en el hígado (Mendenhall C.H.L., 1987).

Estimulación de la lipólisis periférica y de la movilización de ácidos grasos provenientes de tejido adiposo periférico

Antes de analizar esta posible causa de hígado graso, hay que comentar que existen grandes diferencias entre los efectos del alcohol *in vitro* e *in vivo*. En general, se acepta que en el modelo *in vitro* el aumento de TAG en el hígado parece estar a nivel de la mitocondria: la oxidación de los ácidos grasos está deprimida y la síntesis de ácidos grasos saturados está aumentada. Por otra parte, desde hace años, los efectos hepáticos de etanol *in vivo* se han explicado adicionalmente a los efectos anotados *in vitro* en el párrafo previo, a un aumento en la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo al hígado. Este efecto indirecto del etanol, de acuerdo con Horning *et al.*, (1960), estaría mediado por el eje adreno-pituitario y se basa en varios hallazgos reportados por diferentes estudios. A continuación se mencionan los fundamentales: la cantidad de grasa acumulada es proporcional a la dosis de alcohol

administrada (Reitz, 1979); después de una dosis única de alcohol (5 a 7 g/kg p.c.) los lípidos del hígado tienen una composición similar a la del tejido adiposo (Lieber y Spritz, 1966). En este mecanismo de producción de hígado graso están involucradas varias hormonas: catecolaminas, corticoides, ACTH, hormonas del crecimiento; por esta razón la adrenalectomía, la hipofisectomía y los agentes bloqueadores adrenérgicos previenen la acumulación de lípidos en el hígado después de la intoxicación aguda con etanol (Reitz, 1979). También se ha reportado que la ingestión aguda y elevada de etanol, produce un aumento de norepinefrina plasmática urinaria (Anton, 1965). De lo anterior puede concluirse que en el animal íntegro, cuando se ingieren dosis elevadas de etanol, el hígado graso es primordialmente debido a la estimulación de la lipólisis periférica y que el efecto está mediado por agentes adrenérgicos, de acuerdo con la propuesta original de Anton (1965) (Fig. 7). En esta tesis se postula que los hallazgos reportados por nuestro laboratorio, referentes a la acción atenuante de los NSAID sobre el establecimiento de hígado graso, y probablemente del aumento secundario de algunas especies reactivas del oxígeno, pueden explicarse como resultado del bloqueo en algún punto de la cascada de la respuesta adrenérgica, desencadenada por la ingestión aguda de etanol. Para su comprobación, se ha seleccionado el adipocito aislado proveniente del paquete graso del epidídimo de rata, como modelo experimental en el cual se mide la posible acción de los NSAID sobre la lipólisis estimulada por la epinefrina o por un análogo del AMPc.

Algunas funciones afectadas por el estrés oxidativo desencadenado por la intoxicación aguda con etanol

Lipoperoxidación

La lipoperoxidación es una reacción de autooxidación que puede ser iniciada por los radicales hidroxilos, los radicales hidroperóxido, y quizá por el oxígeno singulete, pero no por compuestos menos reactivos: radical superóxido y peróxido de hidrógeno. El radical libre iniciador remueve un protón del carbón de un metileno en la cadena de carbono del ácido graso. Este hecho deja un electrón desapareado en

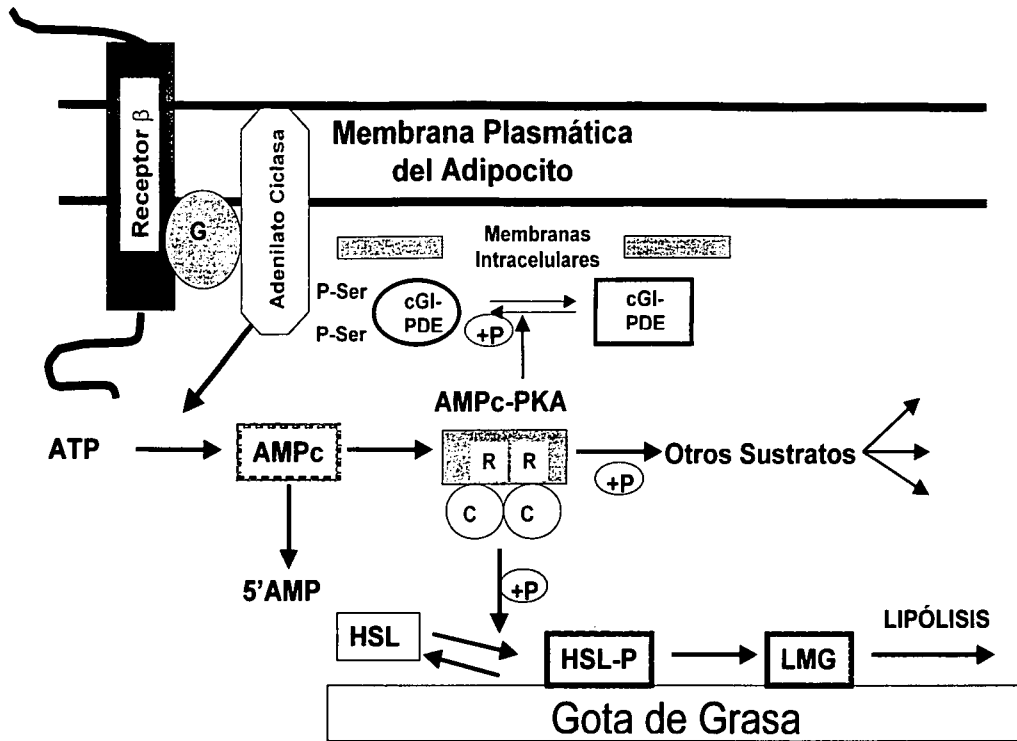


Fig. 7. Cascada de reacciones del proceso lipolítico que conduce a la activación de la lipasa hormono-sensible.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

este átomo de carbono, creando un radical de ácido graso (Fig. 8). Este último realiza un rearrreglo molecular interno para formar un dieno conjugado, (Fig. 8), que a su vez reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical peroxil lípido (Fig. 8), capaz de sustraer un protón de otro ácido graso para formar el hidroperoxil lípido (Fig. 8) y continuar la reacción en cadena hasta que eventualmente reaccionan 2 radicales libres y se evita que prosiga la reacción en cadena y que se sigan oxidando mas ácidos grasos insaturados (Fig. 8).

La lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas daña seriamente a las membranas plasmáticas y la de los organelos celulares, produciendo pérdida de la fluidez, alteración de las funciones secretoras y de los gradientes iónicos transmembranales (Donohue *et al.*, 1983), e incluso la muerte celular.

Los productos finales de la reacción de peroxidación sobre los ácidos grasos insaturados son aldehídos, hidrocarburos (etano, pentano) y varios residuos químicos de tipo aldehído como el malondialdehído (Barber y Berhein, 1967). Estos productos pueden difundir del sitio de producción; originar edema celular y cambios en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Además, algunos pueden cambiar la actividad de la fosfolipasa e inducir la salida del ácido araquidónico y la formación de prostaglandinas estables y varios endoperoxidos (Mendenhall, 1987). La secuencia teórica de los sucesos que conducen a la formación de moléculas residuales hasta el malondialdehído, capaces de aumentar el daño celular por este mecanismo, se presentan gráficamente en la Fig. 8.

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

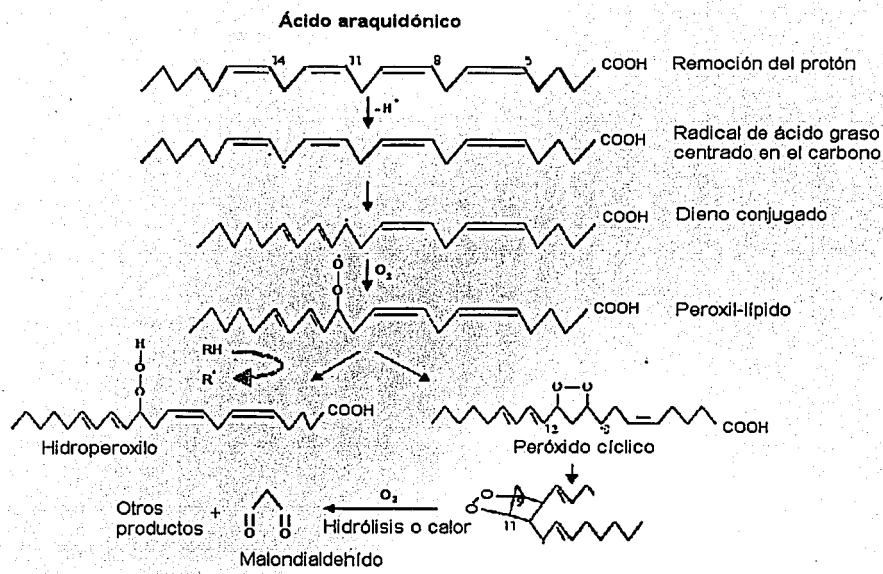


Fig. 8. Formación de moléculas contribuyentes al daño celular por lipoperoxidación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Entre ambos fenómenos: hipoxia y lipoperoxidación, también es muy difícil tratar de investigar qué tanto son consecuencia o efecto una de la otra. Lo que sí puede establecerse es que ambos procesos tienen en común la presencia de un exceso de radicales libres del oxígeno. Las alteraciones producidas por el alcohol como inductor de radicales libres, en las diferentes macromoléculas de organelos celulares, se resume en la Fig. 9.

Correlación entre los TAG y la lipoperoxidación en el hígado

Una parte importante de la información existente se refiere a la posible correlación entre la disponibilidad de TAG hepáticos y el grado de lipoperoxidación. Expresado como pregunta: por el solo hecho de elevar el contenido de TAG hepáticos; ¿se eleva directamente un proceso como el de la lipoperoxidación?, sí definitivamente, se trata de una reacción en cadena, en donde los productos de la reacción son radicales libres los cuales amplifican y mantienen la reacción. En el experimento reportado en la Fig. 10 se usaron ratas macho de 200 g de peso corporal a las cuales se les modificó el contenido hepático de TAG por medio de la administración subcutánea de diferentes cantidades de aceite de maíz y 12 h después se cuantificaron en el hígado los niveles tanto de TAG como de TBARS. Se observa en la figura una correlación directa entre los dos indicadores usados con un valor de $r = 0.97$ y un valor de $p < 0.05$; o sea, en condiciones experimentales bien definidas la lipoperoxidación hepática depende directamente de la poza de TAG presente en el hígado, la cual a su vez depende principalmente de la avalancha de ácidos grasos liberados en la periferia.

Origen de los radicales libres en la intoxicación alcohólica aguda

Se ha demostrado en numerosas ocasiones que en los animales intoxicados agudamente con elevadas cantidades de etanol (5 a 7g / kg de peso) se observa un aumento en la lipoperoxidación hepática. En el inciso previo se hizo notar que la lipoperoxidación se inicia como consecuencia de la aparición celular de radicales hidroxilo o hidroperoxilo, quizá por el oxígeno singulete.

Estudios difundidos desde hace varios años indican que normalmente se producen radicales libres en mitocondrias, peroxisomas, microsomas, citosol y que

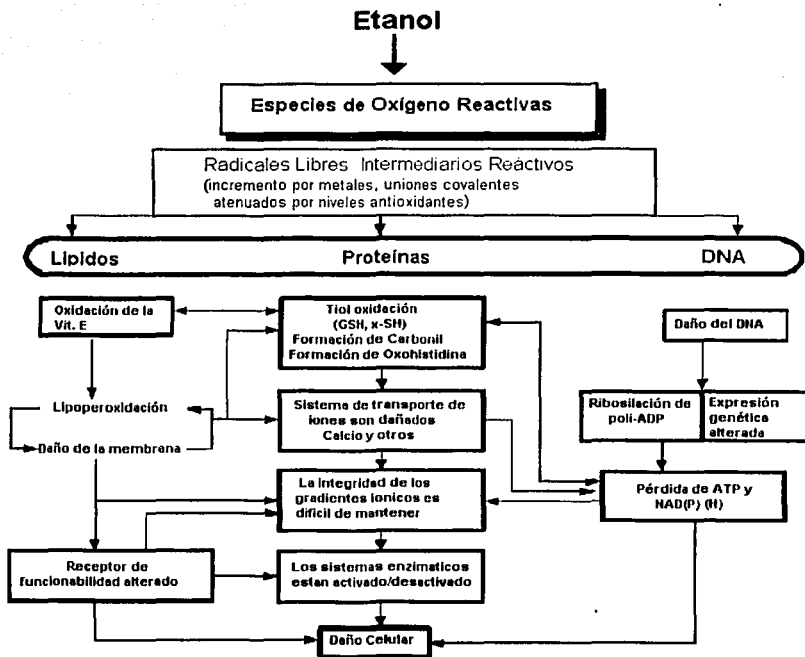


Fig. 9. Secuencia de las modificaciones de macromoléculas inducidas por ROS en el daño celular por etanol.

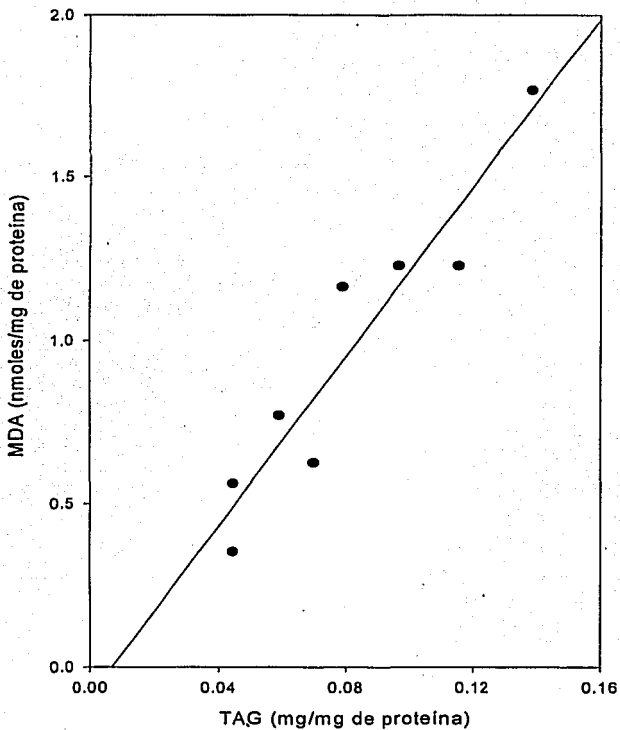


Fig. 10. En esta figura se ilustra cómo el grado de lipoperoxidación hepática depende la cantidad de TAG disponible en el propio hígado (Terrazos-Luch *et al.*, 1997).

durante la intoxicación aguda con etanol dicha producción se ve exacerbada. Sin embargo, un análisis de la literatura reciente da información complementaria en dos áreas: La NADPH oxidasa es la enzima responsable de la formación de radicales libres en la intoxicación alcohólica crónica (Kono *et al.*, 2000 a), y algunos modificadores moleculares de patología hepática por consumo crónico de etanol se abaten importantemente en animales mantenidos con dietas ricas en ácidos grasos saturados (Kono *et al.*, 2000 b y Nanji *et al.*, 2001).

Es indispensable puntualizar algunos aspectos al respecto. Los datos y estudios de esta tesis incluyen exclusivamente efectos y acciones tóxicas del etanol en un modelo agudo (hasta 24 h). Para ese modelo agudo no se dispone de ningún trabajo que explique de manera satisfactoria el origen de las ROS y las consecuencias del aumento en la poza de ROS, detectada en el hígado de los sujetos intoxicados con etanol. Al momento sólo se dispone de trabajos recientes, y son los que se revisan a continuación, sobre el origen de los radicales libres en la intoxicación alcohólica experimental crónica (duración de 6 a 8 semanas).

En relación con la enzima NADPH oxidasa, se usaron ratones identificados como "p47^{phox} knockout mice", esto es, ratones genéticamente deficientes en la NADPH oxidasa (Jackson *et al.*, 1995), los cuales fueron obligados a recibir dietas líquidas isocalóricas con etanol (35.49% del total de calorías) y sin etanol. Los ratones fueron operados y se les colocó una cánula en el estómago por la que fueron alimentados con una dieta que contenía de 1.29 a 1.31 kcal/ml, y se pasó a una velocidad continua de 0.44 ml/g de peso corporal, merced a una bomba de infusión. El modelo experimental fue descrito por French *et al.*, (1986) y la dieta contiene 37% del total de calorías como grasa, y en aquella que carece de etanol, las calorías fueron sustituidas por dextrosa. La infusión de dietas, con etanol y sus respectivos controles, se mantuvieron por 4 semanas con libre acceso al agua de bebida y en un ambiente libre de patógenos.

Los animales normales, con su dotación genética de NADPH oxidasa, que recibieron dieta con etanol, muestran un aumento en los niveles séricos de la aspartato aminotransferasa, esteatosis hepática severa con inflamación y necrosis, formación de aductos con radicales libres presentes en la bilis, y en las células de Kupffer indican una activación del factor de transcripción NF- κ B y liberación del

factor citotóxico TNF- α . Comparativamente, en los ratones deficientes en la NADPH oxidasa que recibieron la misma dieta con etanol, no se observaron aumentos en los niveles séricos de la aspartato aminotransferasa, ni formación de aductos con radicales libres en la bilis, ni activación del factor de transcripción NF- κ B, ni liberación del factor citotóxico TNF- α . Los datos anteriores apoyan la hipótesis de que los radicales libres generados por la actividad de la NADPH oxidasa de las células de Kupffer tienen una participación predominante en la patogénesis de la hepatitis inducida por etanol, activando el factor de transcripción NF- κ B, que a su vez libera el factor citotóxico TNF- α . (Kono *et al.*, 2000 a).

Desde hace más de 10 años existe evidencia experimental de que las lesiones producidas por la intoxicación alcohólica en el hígado de animales están influenciadas por el contenido y tipo de lípidos de la dieta (Nanji, 1989). Las publicaciones más recientes indican que la sustitución de ácidos grasos insaturados de la dieta, por ácidos grasos saturados, disminuye la presencia de indicadores moleculares e histopatológicos producidos por la administración crónica de etanol (Kono *et al.*, 2000 b y Nanji *et al.*, 2001). El modelo experimental usado fue similar al descrito en el párrafo anterior, el animal experimental fue la rata, en lugar del ratón. En una de las publicaciones (Kono *et al.*, 2000 b), se describe que el experimento se realizó en sólo 2 semanas y los lípidos de la dieta (37% de las calorías totales) fueron: en un grupo, aceite de maíz como ejemplo de grasa insaturada, y en el otro, triglicéridos de cadena media como ejemplo de grasa saturada. El etanol proporcionó de 35 a 40% de las calorías y fue sustituido por dextrosa para los animales controles. Al final de las 2 semanas de suministrar la dieta de manera forzada (vía cánula gástrica e infusión continua con bomba), las ratas alimentadas con aceite de maíz y etanol mostraron los siguientes cambios patológicos: elevación de la aspartato amino transferasa sérica, elevación de 10 veces en los niveles de endotoxina plasmática, aumento de 2 veces en la permeabilidad del tubo digestivo con lesiones e inflamación de la mucosa del tubo digestivo, infiltración grasa e inflamación en el hígado y un aumento en el número de las células de Kupffer, mayor permeabilidad al Ca^{2+} extracelular, mayor producción del factor TNF- α , mayor producción de radicales libres y mayor síntesis del receptor para las endotoxinas, el CD14. Todos estos indicadores de patogenicidad disminuyeron a la mitad en las

ratas que recibieron triglicéridos de cadena media, saturados, en lugar del aceite de maíz con ácidos grasos insaturados.

En el otro trabajo (Nanji *et al.*, 2001), el experimento duró 8 semanas y las ratas recibieron la dieta de manera forzada por cánula gástrica, el contenido de lípidos en la dieta fue 35% y el de etanol desde 10 hasta 16 g/kg de peso/día. Las primeras 6 semanas las ratas recibieron aceite de pescado, con casi 30% de ácidos grasos con 2 o más insaturaciones, y en las últimas 2 semanas 1 grupo continuó con aceite de pescado, otro recibió aceite de palma con 8% de ácido linoleico (2 insaturaciones), y otro grupo más, triglicéridos de cadena media con 1.5% de ácido linoleico. Los 3 grupos recibieron etanol a lo largo de las 8 semanas y se compararon entre sí y con un grupo más que recibió aceite de pescado por las 8 semanas y al cual el etanol se sustituyó por una cantidad isocalórica de dextrosa.

Las lesiones hepáticas fueron muy similares si las ratas recibían el aceite de pescado y el etanol por 6 u 8 semanas y se observó: inflamación severa, fibrosis, y niveles altos de endotoxina, de peroxidación de lípidos, activación de NF- κ B y altas cifras de RNA mensajero para la enzima Cox-2 y el factor TNF- α . Después de las 2 semanas de cambio de dieta a aceite de palma o de triglicéridos de cadena media, aun manteniendo la infusión de etanol, se encontró una marcada mejoría histológica, disminución en los niveles de endotoxina y peroxidación de lípidos, ausencia en la activación del factor NF- κ B y disminución en la expresión de Cox-2 y TNF- α . Se concluyen que una dieta enriquecida en ácidos grasos saturados revierte efectivamente la necrosis hepática, la inflamación y la fibrosis ocasionadas por el etanol, a pesar de continuar consumiéndolo (Nanji *et al.*, 2001).

En resumen, el consumo continuo y abundante de etanol requiere de la participación de la enzima NADPH oxidasa, de la formación de oxidantes, de la activación de NF- κ B y TNF- α y de un suministro de niveles altos de ácidos grasos insaturados para producir lo que estos grupos han llamado, las "lesiones hepáticas tempranas promovidas por el etanol".

Metabolismo del glutatión: defensa contra el estrés oxidativo

El glutatión (GSH) es un tripéptido que existe en concentraciones milimolares y con una amplia distribución en las células de eucariontes. El GSH no se distribuye en

forma homogénea en las células, del 80 al 85% se localiza en el citosol; lugar exclusivo de su síntesis, y el 10 al 15% se ubica en las mitocondrias, en donde esa menor cantidad puede llegar a alcanzar una concentración similar a la que se encuentra en el citosol (Fernández-Checa *et al.*, 1991). La poza de GSH mitocondrial proviene de la poza citosólica de GSH y existe un eficiente sistema acarreador que transloca el GSH del citosol a la matriz mitocondrial (Martensson *et al.*, 1990).

Las mitocondrias representan la principal fuente celular de radicales libres ya que las mitocondrias emplean el 90% del oxígeno consumido por las células (Chance *et al.*, 1979 y Shigenaga *et al.*, 1990). Los radicales libres, en particular en forma de anión superóxido, se forman en segmentos específicos de la cadena del transporte de electrones (Chance *et al.*, 1979); los aniones superóxido así generados se convierten en H_2O_2 con el concurso de la superóxido dismutasa. Por otra parte, para entender los experimentos descritos más adelante, vale la pena mencionar el uso de la antimicina A como bloqueador en la cadena respiratoria en el paso de un electrón de la ubisemiquinona al ubiquinol, y con ello se logra aumentar la generación de aniones superóxido (Turrens y Boveris, 1980 y Turrens *et al.*, 1985). A mayor producción de aniones superóxido, mayor formación de H_2O_2 , pero las mitocondrias no poseen catalasa para la conversión del $2H_2O_2$ en $2H_2O + O_2$, de manera que la desaparición de H_2O_2 mitocondrial ocurre en presencia de GSH y por acción de la glutatión peroxidasa. En conclusión: el GSH en la matriz mitocondrial es la única defensa disponible en contra de los efectos tóxicos del H_2O_2 generada endógenamente en la cadena de transporte de electrones. Algunos experimentos apoyan la aseveración anterior: si la poza mitocondrial de GSH disminuye abajo de un nivel crítico (3 nanomoles/mg de proteína), el tratamiento con antimicina A provoca un aumento exponencial en el H_2O_2 medible (García-Ruiz *et al.*, 1995). En resumen, tanto mitocondrias como células hepáticas íntegras, en las cuales llega a bajar un 20% su poza mitocondrial de GSH, son mucho más sensibles a los efectos ocasionados por una excesiva producción de radicales libres a consecuencia de la presencia de antimicina A; tales efectos incluyen: peroxidación de lípidos, pérdida de la actividad del complejo IV mitocondrial y activación de la transcripción nuclear del factor $NF-\kappa\beta$ (García-Ruiz *et al.*, 1995).

La intoxicación crónica con etanol es un ejemplo, entre otros, del efecto de un exceso en la formación de radicales libres celulares y cómo son distribuidos por una compleja red de antioxidantes, unos de naturaleza enzimática y otros no enzimática, los cuales además deberán contribuir para mantener un balance crítico (Fig. 11). La pérdida del balance puede ocurrir por una generación excesiva de radicales libres y/o por una limitada disponibilidad de antioxidantes. La Fig. 11, adaptada de Fernández-Checa *et al.*, (1997), muestra en el caso A la situación normal de balance en donde una génesis limitada de superóxido es convertido en H_2O_2 , la cual es destruida por la actividad de la catalasa y la glutatión peroxidasa en presencia de una poza normal de GSH. En el caso B la actividad de la superóxido dismutasa es mayor con respecto a la glutatión peroxidasa, y en el caso C la actividad de la glutatión peroxidasa es menor en relación con la actividad de la superóxido dismutasa (nótese que en ambos casos no se incluye la actividad de la catalasa, tal como sucede en las mitocondrias), en ambos casos aumenta la concentración de H_2O_2 , lo cual puede ser causado por una disminución en la disponibilidad de GSH reducido. La acumulación del H_2O_2 en presencia de Fe^{3+} podrá elevar la generación de radicales hidroxilo (Fig. 11).

Continuando con el ejemplo seleccionado se sabe que en ratas crónicamente intoxicadas con etanol, se desarrolla un defecto selectivo en el funcionamiento del translocador mitocondrial de GSH (Fernández-Checa *et al.*, 1993), con lo que se tienen valores bajos de GSH en esas mitocondrias. De todo lo anterior se ha concluido que después de la ingestión de etanol, y en general al aumentar el estrés oxidativo mitocondrial, la situación del GSH mitocondrial es un factor crítico para determinar la pérdida de la función mitocondrial, la viabilidad celular y la activación de factores de transcripción y por ende de la regulación de ciertos genes (Fernández-Checa *et al.*, 1997).

Bajo condiciones normales, la síntesis celular de ROS es contrarrestada por su desaparición mediante una red de antioxidantes, entre los que se encuentran algunos sistemas enzimáticos. El balance permite mantener una poza pequeña de ROS celulares. El exceso en la producción de ROS, tal como sucede entre otras condiciones en la intoxicación alcohólica aguda, altera el equilibrio normal y puede llegar a disminuir los niveles de algún componente de los sistemas antioxidantes. El más abundante de ellos, y que disminuye con la ingestión aguda de dosis tóxicas de

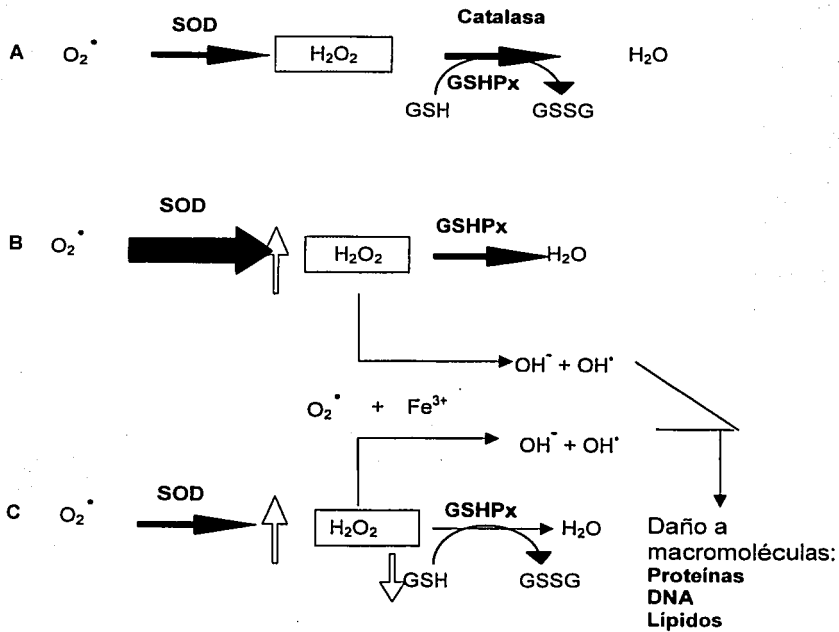


Fig. 11. Balance entre los sistemas antioxidantes en el control de las pozas del radical superóxido, H_2O_2 y radical hidroxilo. (OH^{\bullet}). SOD, superóxido dismutasa y GSHPx, glutatión peroxidasas. Para más detalles ver el texto.

etanol, es el glutatión. Si bien, tal como se esbozó en párrafos previos, la fisiología celular del glutatión es particularmente compleja, en este trabajo se limita la información al comportamiento parcial de la poza celular del glutatión total en el hepatocito. Como ya se dijo la administración aguda de dosis de etanol de 5 g/kg de peso corporal/día, o mayores, ocasionan una disminución cercana al 50% en la poza de glutatión hepático.

De interés para esta tesis es el hecho de que la aplicación del NSAID, piroxicam, revierte la disminución de glutatión hepático dependiente de la intoxicación con etanol (Zentella de Piña *et al.*, 1994).

Consideraciones privilegiadas en esta tesis

Enseguida se incluye una selección de los datos experimentales anotados en las páginas previas. La selección se efectuó con la idea de darle sustento al modelo experimental escogido para lograr los objetivos de esta tesis y con base en el siguiente criterio: conjuntar la contribución de los diferentes tejidos durante el establecimiento de las lesiones hepáticas consecutivas a la intoxicación aguda con cantidades elevadas de etanol (5 g/kg pc o mayores).

En función directa a la dosis de etanol empleada para registrar una intoxicación, concentraciones crecientes del mismo afectan de manera simultánea distintas estirpes celulares. En las células intestinales modifican la permeabilidad celular y facilitan el paso de toxinas para incidir sobre las células de Kupffer donde se activa la NADPH oxidasa, se generan radicales libres y se liberan factores citotóxicos, todo lo cual afecta a los hepatocitos (Kono *et al.*, 2000a). El etanol activa las células adrenérgicas y se liberan catecolaminas (Anton, 1965), que al ocupar los receptores adrenérgicos de los adipocitos activan la lipólisis y promueven la liberación de ácidos grasos, que son captados por el hígado donde se eleva la poza de TAG con una composición similar a la del tejido adiposo (Lieber y Spritz, 1966) y dispone de más ácidos grasos por lo que se acrecienta la lipoperoxidación, en vista del aporte extra de radicales libres provenientes de las células de Kupffer.

Otros experimentos en los que se alimentan durante varias semanas con un tipo de lípidos (Kono *et al.*, 2000a y, Nanji 1989) permiten observar que el tipo de grasa de la dieta puede suplir a los ácidos grasos en el tejido adiposo, además de

que el tipo de grasa empleada en la dieta favorece o llega a eliminar algunas lesiones causadas por la intoxicación alcohólica (Kono *et al.*, 2000b y Nanji *et al.*, 2001).

Consecuentemente a la mayor lipoperoxidación resulta lógico postular un mayor consumo de glutatión para limitar el estrés oxidativo. No deja de ser interesante que sólo con un reto considerable de alcohol se logra observar la respuesta adrenérgica y la disminución de glutatión hepático (Anton, 1965 y Videla *et al.*, 1980).

En este complejo esquema, si los NSAID llegan a impedir la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, podrían limitar de manera importante las lesiones observables en el hígado después de una intoxicación aguda con etanol.

NSAID: 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 NSAID 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 indometacina (Bilodeau *et al.*, 1995).

Mecanismos de acción

Los NSAID actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (Vane, 1971), 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 este grupo se encuentran las prostaglandinas, las prostaciclina, los leucotrienos y los tromboxanos. En general es aceptado que los NSAID inhiben la actividad de las ciclooxigenasas, la COX-1 constitutiva y la 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 *et al.*, 1984) (Fig. 12).

El araquidonato es el principal precursor de las hormonas eicosanoides. La prostaglandina sintasa cataliza el primer paso en una ruta que conduce a la formación de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. La lipooxigenasa cataliza el paso inicial en la ruta que lleva a los leucotrienos.

Los efectos de los NSAID resultan también de sus propiedades fisicoquímicas que probablemente impiden la interacción de proteína-proteína en muchos tipos de membranas biológicas, ya que la mayoría son moléculas planas, sin carga, que pueden estar en ambientes lipídicos como bicapas de membranas plasmáticas (Abramson y Weissman, 1989).

Los compuestos químicos precursores del ácido acetil salicílico, además de interferir en la síntesis de prostaglandinas, han resultado ser atrapadores de radicales libres del oxígeno. Un ejemplo de esto es el ácido benzoico, relacionado estructuralmente con el salicilato, que es descarboxilado e hidroxilado por el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) producido por el granulocito estimulado (Sagone y Husney, 1987). Esto sugiere que los NSAID podrían actuar de manera similar reaccionando rápidamente con los radicales, lo cual haría más entendible sus conocidas propiedades antiinflamatorias.

En este aspecto, resultan interesantes los experimentos realizados por un integrante de nuestro grupo de trabajo: Castrejón y colaboradores han encontrado y reportado que el piroxicam disminuye de manera dosis dependiente, la señal de intensidad de Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR de sus siglas en inglés) de radicales aductos concentrados en oxígeno y en carbono (Castrejón *et al.*, 1996). El piroxicam es entonces un atrapador (scavenger) de radicales libres tipo hidroxilo y que puede formar radicales libres menos reactivos que ayudarían a explicar los efectos del piroxicam *in vivo*. Por otra parte se encontró que el piroxicam aumenta la producción de radicales libres durante la auto-oxidación de la fenilhidrazina y que decrece esa producción de radicales libres en el sistema de la reacción de Fenton (Castrejón *et al.*, 1997).

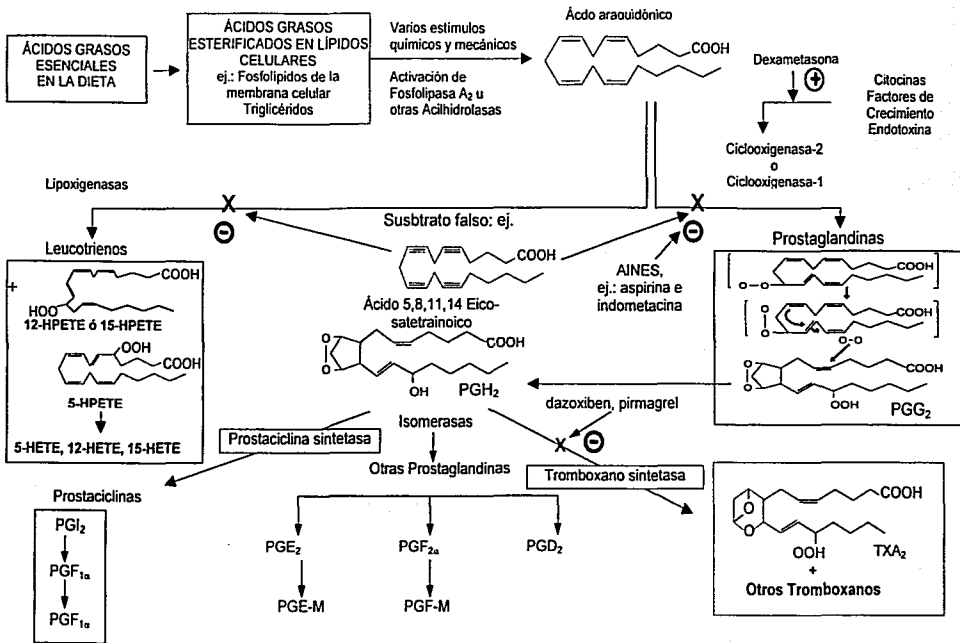
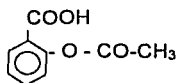


Fig.12 Biosíntesis de los productos derivados del ácido araquidónico. Se muestran las rutas principales del metabolismo del ácido araquidónico. La vía catalizada por lipoxigenasas da lugar a una gran variedad de leucotrienos y la vía de las ciclooxigenasas cataliza la formación de endoperóxidos (PGG y PGH) y productos subsecuentes. La ciclooxigenasa-1 (COX-1) se expresa constitutivamente. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es inducible por citoquinas, factores de crecimiento y endotoxinas, efectos que son bloqueados por glucocorticoides. Algunos compuestos: aspirina e indometacina inhiben la ciclooxigenasa pero no a las lipoxigenasas; mientras el ácido 5,8,14-eicosatetraenoico inhibe ambas enzimas. El dazoxiben y el pirogrel son inhibidores selectivos de la tromboxano sintetasa. (+) Activación; (-) inhibición (tomado de Zentella de Piña *et al.*, 2000).

Aspirina

La aspirina (ácido acetil salicílico) es un compuesto anti-inflamatorio no esteroideo. En 1971 Vane *et al.*, demostraron que concentraciones bajas de aspirina inhibían la producción enzimática de prostaglandinas. Después, numerosas observaciones consolidaron la información de Vane. Además de la acción anti-inflamatoria las moléculas tipo aspirina pueden tener acciones analgésicas y antipiréticas ya bien descritas y otras acciones que pueden o no contribuir a sus efectos terapéuticos y solo recientemente se han reconocido, o bien que aún no se conocen. A pesar de la introducción de muchas moléculas nuevas, la aspirina es aún el agente analgésico, antipirético y anti-inflamatorio más prescrito y el estándar con el que se comparan y evalúan otros fármacos anti-inflamatorios y analgésicos. En Estados Unidos se consumen cantidades enormes; algunas estimaciones oscilan entre 10 y 20 mil toneladas anuales.



Ácido acetil salicílico

La aspirina ingerida se absorbe principalmente como tal, pero cierta cantidad entra como ácido salicílico en la circulación sistémica a causa de la hidrólisis por esterazas en la mucosa gastrointestinal y el hígado. La aspirina puede detectarse en el plasma solamente por corto tiempo debido a la hidrólisis plasmática, hepática y eritrocitaria; por ejemplo, 30 minutos después de una dosis de 0.65 g solamente el 27% del salicilato plasmático se encuentra en la forma acetilada. Como resultado la dosis de la aspirina siempre es baja y no pasa de 27 mg/ml con las dosis terapéuticas ordinarias. A las concentraciones reportadas para su uso clínico, 80-90% del salicilato está unido a proteínas plasmáticas, en particular a la albúmina. La aspirina al unirse a la albúmina humana plasmática la acetila en el grupo E amino de la lisina y puede cambiar los sitios de unión para varios compuestos; la hemoglobina, el DNA, las hormonas, las plaquetas y otras proteínas también pueden sufrir acetilación.

Biotransformación y excreción

La biotransformación de los salicilatos se realiza en muchos tejidos, en particular en el retículo endoplasmático y las mitocondrias hepáticas. Los tres productos metabólicos principales son el ácido salicílico (el conjugado de glicina), el éter o glucurónido fenólico y el éster o acilglucurónido. Además, una pequeña fracción se oxida a ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y a ácidos 2,3-dihidroxibenzoico y 2,3,5-trihidroxibenzoico; también se forma ácido gentísico, el conjugado de glicina del ácido gentísico.

Los salicilatos se excretan por la orina como ácido salicílico libre (10%), ácido salicílico (75%), glucurónidos salicílico fenólico (10%) y acílico (5%) y ácido gentísico (< 1%). No obstante, la excreción de salicilato libre es en extremo variable y depende tanto de la dosis como del pH urinario. En la orina alcalina, más del 30% del compuesto ingerido puede eliminarse como salicilato libre, mientras que en la orina ácida puede ser sólo del 2%.

La vida media plasmática de la aspirina es de alrededor de 15 minutos, la del salicilato en bajas dosis de 2 a 3 horas y en las dosis antiinflamatorias usuales de cerca de 12 horas. La vida media del salicilato puede ser de 15 a 30 horas con dosis terapéuticas altas o cuando hay intoxicación. Esta eliminación dosis-dependiente es el resultado de la capacidad limitada del hígado para formar ácido salicílico y glucurónido fenólico; con dosis mayores, una gran proporción del fármaco se excreta por la orina sin cambios.

Efectos tóxicos

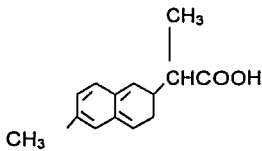
Como resultado de su uso amplio y fácil disponibilidad, los salicilatos son una causa frecuente de intoxicación. A menudo se produce en niños y a veces es fatal. Esta molécula no debe considerarse como un remedio casero e inofensivo.

La hipersensibilidad también es una causa de respuestas indeseadas al salicilato. Más aun, la insuficiencia renal o hepática o la hipoprotrombinemia u otros trastornos de la sangre potencian la posibilidad de la toxicidad del salicilato. Los niños con fiebre y deshidratación son particularmente propensos a la intoxicación con dosis relativamente pequeñas de este compuesto. Además, el uso de aspirina está

contraindicado en niños y adolescentes con enfermedad febril debido al riesgo del síndrome de Reye. DE₅₀ 135 mg/kg; DL₅₀ 1.1 g/kg para rata

Naproxen

El ácido 6 metoxi-1-metil-2-naftaleno-acético o naproxen es un antiinflamatorio sistémico muy potente, que como la aspirina, inhibe 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 Clisold, 1990).

Los metabolitos del naproxeno se excretan casi por completo en la orina. Cerca del 30% de la molécula sufre 6-desmetilación y la mayor parte de este metabolito, así como el mismo naproxeno se excretan como glucurónido u otros conjugados.

El naproxeno se une casi por completo (99%) a las proteínas plasmáticas después de dosis terapéuticas normales. Atraviesa la placenta y aparece en la leche de las mujeres que amamantan en alrededor del 1% de la concentración plasmática materna.

Efectos tóxicos

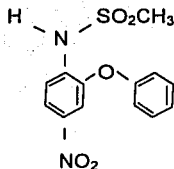
Las complicaciones gastrointestinales varían desde una dispepsia relativamente leve, malestar gástrico y pirosis a náuseas, vómitos y hemorragia gástrica. Sobre el SNC produce desde somnolencia, cefalea, mareos y sudoración hasta fatiga, depresión y ototoxicidad. Reacciones menos comunes incluyen prurito y una variedad de problemas dermatológicos. Se han informado unos pocos casos de ictericia, deterioro de la función renal, edema angioneurótico, trombocitopenia y agranulocitosis. DE₅₀ 2-10 mg/kg; DL₅₀ 395 (281-557) mg/kg.

Nimesulide

Es otro agente anti-inflamatorio con propiedades analgésicas y antipiréticas de la clase de sulfonanilidos, con potencia anti-inflamatoria semejante al piroxicam y más potente que la aspirina en su actividad antipirética. Es un inhibidor débil de la síntesis de prostaglandinas y un atrapador de radicales libres del oxígeno, el ion superóxido. Además inactiva mediante una acción atrapadora la disponibilidad del ácido hipocloroso generado en la vía de la mieloperoxidasa. El nimesulide tiene otras acciones sobre la actividad de la bradicinina, liberación de TNF, degradación de cartílagos, síntesis del factor activador plaquetario. Es menos ulcerogénico que la aspirina, naproxen y piroxicam. Tiene un efecto pobre en la síntesis de prostaglandinas renales.

Después de la ingestión de 50 a 200 mg de nimesulide, el pico de concentración plasmática se alcanza entre 1.20 a 3.20 h. El metabolismo del nimesulide se hace de manera extensiva hacia varios metabolitos, con excepción de 1 a 3% de la dosis que se excreta por vía urinaria sin ningún cambio, el resto es biotransformado en 4 hidroxinimesulide ya sea libre o conjugado y se excreta por heces o por vía urinaria. La vida media de eliminación del compuesto es de 2.89 a 4.78 h para el 4-hidroxinimesulide y de 2.89 a 4.78 h para el nimesulide.

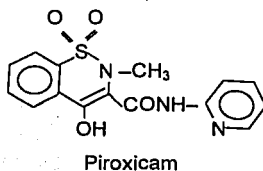
La dosis para adultos es de 100 a 200 mg dos veces al día y la tolerancia en adultos es semejante a la de otros NSAID.



Estructura química del nimesulide. Se trata de un ácido débil $pK_a = 6.5$ y difiere de otros NSAID en que tiene en su estructura química una molécula de sulfonamida como grupo ácido. DE_{50} 0.34 mg/kg; DL_{50} 88.4 mg/kg.

Piroxicam

El piroxicam es uno de los derivados oxicam, una clase de ácidos enólicos que poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Se han desarrollado otros oxicams que están en estudio (p. ej., tenoxicam). El piroxicam es la única molécula de esta clase que puede obtenerse en la actualidad en los EE.UU. En las dosis recomendadas, el piroxicam parece ser el equivalente de la aspirina, la indometacina o el naproxeno para el tratamiento prolongado de la artritis reumatoidea o la osteoartritis. Puede tolerarse mejor que la aspirina o la indometacina. La ventaja principal de piroxicam es su vida media prolongada, que permite la administración de una sola dosis diaria. Las propiedades farmacológicas y los usos terapéuticos del piroxicam han sido revisados en un simposio (Symposium, 1982), por Wiseman (Rainsford, 1985b) y por Lombardino y Wiseman (en Lewis y Furst, 1987). La siguiente es su fórmula estructural:



Propiedades farmacológicas

El piroxicam es un agente antiinflamatorio efectivo; tiene una potencia casi igual a la indometacina como inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas *in vitro*. También puede inhibir la activación de neutrófilos, aun cuando estén presentes productos de la ciclooxigenasa; por ello se han propuesto modos adicionales de acción antiinflamatoria (Abramson y cols., 1985; Lombardino y Wiseman, en Lewis y Furst, 1987). El piroxicam ejerce efectos antipiréticos y analgésicos en los animales de experimentación y en el hombre. Como con otras moléculas tipo aspirina, el piroxicam puede producir erosiones gástricas y prolongar el tiempo de sangría.

Farmacocinética y metabolismo

El piroxicam se absorbe por completo después de la administración oral; se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas en 2 a 4 horas. Ni los alimentos ni los antiácidos alteran la velocidad o el grado de absorción. Se produce una circulación enterohepática del piroxicam y las estimaciones de la vida media plasmática han sido variables; el valor medio parece ser de alrededor de 50 horas.

Después de la absorción, se une en forma extensa (99%) a las proteínas plasmáticas. El estado de equilibrio (p. ej., después de 7 a 12 días) las concentraciones de piroxicam en el plasma y en el líquido sinovial son casi iguales. Menos del 5% de la droga se excreta sin modificar por la orina. La hidroxilación del anillo piridilo es la transformación metabólica más importante en el hombre y este metabolismo inactivo y su conjugado glucurónido constituyen cerca del 60% del fármaco excretado por la orina y las heces.

Efectos tóxicos

La incidencia de informes de efectos adversos en los pacientes que toman piroxicam es de alrededor del 20%, cerca del 5% de los enfermos suspenden su ingestión debido a las acciones colaterales. Las reacciones gastrointestinales son las más comunes; la incidencia de úlcera péptica es menor del 1%. Al igual que otras moléculas tipo aspirina, el piroxicam altera la función plaquetaria y debe suponerse que precipitará broncoconstricción en los pacientes hipersensibles a la aspirina.

Usos terapéuticos

El piroxicam está aprobado en los EE.UU. para el tratamiento de artritis reumatoidea y la osteoartritis. También se ha usado para tratar la espondilitis anquilosante, trastornos musculoesqueléticos agudos, dismenorrea, dolor posquirúrgico y gota aguda. DL₅₀ 220 mg/kg (rata); DL₅₀ 360 mg/kg (ratón).

HIPÓTESIS:

Los anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID) antagonizan las acciones fisiológicas desencadenadas por el exceso de agentes adrenérgicos liberados a consecuencia de una intoxicación aguda con etanol.

OBJETIVO GENERAL:

Avanzar a nivel molecular sobre el origen del antagonismo entre las acciones del etanol y las de los NSAID. En especial, se analizará si los NSAID modifican la liberación de los ácidos grasos del tejido adiposo, y así influyen en la cantidad de ácidos grasos captados por el hígado (y en su posterior peroxidación) después de una intoxicación aguda con etanol.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Evaluar el papel de los anti-inflamatorios seleccionados sobre la lipólisis estimulada por la epinefrina.

Investigar el mecanismo de acción de los anti-inflamatorios seleccionados para inhibir la lipólisis estimulada por epinefrina; en particular precisar el tipo de agonista adrenérgico involucrado, definir la influencia de los NSAID para modificar la unión (binding) del agonista con su receptor específico, y en caso de no haber acción de los NSAID sobre el receptor, explorar si la estimulación de la lipólisis ocasionada por la adición de segundos mensajeros (ej. El AMPc) es modificada por la presencia de los NSAID.

Conocer la posible influencia de moléculas moduladoras de la lipólisis, tales como el peróxido de hidrógeno interviniendo en la acción de los NSAID.

Definir el efecto del etanol y el acetaldehído, a las concentraciones detectadas en la sangre de los sujetos con una intoxicación aguda de etanol, sobre la lipólisis estimulada por AMPc y en ausencia o presencia de los anti-inflamatorios usados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Material

Es importante hacer algunas consideraciones sobre el patrón de consumo de alcohol. El alcoholismo lleva la connotación de hábito, y efectivamente, es la costumbre de consumir compulsivamente etanol en forma consuetudinaria y exagerada la que ocasiona el daño celular. Existe otra situación, como es el caso de gente, generalmente joven, no habituada a controlar la cantidad de alcohol bebido y las primeras veces que lo hace es a través de un consumo exagerado que la conduce a una intoxicación, en ocasiones mortal. Con ciertas restricciones menores, ambas situaciones: el modelo de intoxicación aguda y el alcoholismo crónico, son reproducibles en animales de laboratorio.

Los reactivos \pm alprenolol, ATP, NAD⁺, glicerol, EDTA, etanol, ácido tiobarbitúrico, epinefrina, aspirina, naproxen, nimesulide y piroxicam, dibutilil AMPc, glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, glicerocinasa, Tritón X 100, ácido N-2-hidroxiethylpiperazima-N-2-etanosulfónico. (Hepes), 4 clorfenol, 4-aminoantipirina, peroxidasa, albúmina y TCA se obtuvieron de Sigma, [propil 2,3,³H] dihidroalprenolol (120Ci/mml) fue proporcionado por New England Nuclear Co. (USA). EDTA, albúmina, etanol, glucosa, sulfato de magnesio y sulfato ferroso amoniacal se obtuvieron de Baker (Edo. de México, México). El tiocinato de potasio provino de Mallinckrodt.

Métodos

Preparación de las membranas plasmáticas de hígado

Las membranas plasmáticas se prepararon de acuerdo con el método propuesto por Neville (1968) a partir de tres hígados de cobayo (450-500 g de peso corporal), ya que cuentan con una población grande de receptores a la epinefrina lo que permite una clara observación de los efectos sobre dichos receptores. El proceso consta de varios pasos, todos ellos se realizan en frío 0-4° C, el medio que se emplea en este procedimiento para suspender y homogenizar el tejido es una solución 0.001M de NaHCO₃. En resumen:

- (1) Una vez obtenidos los hígados se les enjuaga para remover el exceso de sangre. A continuación se desmenuzan con tijeras muy finas, eliminando el tejido conectivo.
- (2) 10 g de fragmentos pequeños de hígado se colocan en un homogenizador Dounce grande, se le agregan 25 ml de medio y se homogeniza a 4° C con golpes de pistilo lo más fuerte posible contra el fondo del vaso. La homogenización se repite una vez y se agregan 500 ml del medio a 4° C, agitando durante 3 min, después se filtra a través de dos capas de gasa, y después a través de 4 capas.
- (3) En 4 frascos de centrifuga se distribuye el homogenado-filtrado de manera uniforme y se centrifuga a 1500 rpm x 10 min. El sobrenadante y los frascos se colocan de cabeza con papel absorbente en el cuello para remover el exceso de sobrenadante. Después, el precipitado se coloca en el homogenizador de Dounce.
- (4) Se repiten los pasos 2 a 3 una vez pero ahora se tiene en el homogenizador el precipitado resuspendido.
- (5) Se homogeniza el precipitado con 4 golpes suaves de pistilo, se colecta por centrifugación para continuar el procedimiento.
- (6) Con la ayuda de un refractómetro, se ajusta una solución madre de sacarosa hasta alcanzar una concentración de $69\% \pm 0.1\%$. Colocar 34 ml de esa solución en frío en el homogenado que se preparó en el paso 5. Agregar agua hasta 60 ml, se mezcla vigorosamente hasta que no haya evidencia de patrones de Schlierin. En el refractómetro se ajusta con agua, o con solución de sacarosa al 69%, hasta que la nueva mezcla quede a una concentración de sacarosa de $44.0 \pm 0.1\%$.
- (7) Se colocan 20 ml del homogenizado en cada uno de tres tubos.
- (8) Se llenan con 10 ml de solución de sacarosa al $42.3 \pm 0.1\%$ (ajustado en el refractómetro).
- (9) Se balancean los tubos ± 0.05 g agregando solución de sacarosa al 42.3%.
- (10) Los tubos se colocan en el rotor 28SW preenfriado a 4° C y se centrifugan a 25,000 r.p.m. (90,000x g) por 2 horas. Se detiene la centrifuga con cuidado para

manejar los tubos y preservar la interfase. Los tapones deben estar bien engrasados para mantener los tubos a 1 atmósfera de presión.

- (11) Se remueve con ayuda de una espátula la capa que flota, se agregan 8 ml de medio y se centrifugan a 25,000 r.p.m. durante 10 min para empacar bien el sedimento. Se elimina el sobrenadante y se obtienen las membranas.

Las membranas se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan a -70° C hasta el momento de ser empleadas, en un lapso de 2 semanas. Para su empleo se mide la concentración de proteínas antes del experimento.

Experimentos de saturación de los receptores

Se realizan experimentos de saturación para obtener la K_d , y una vez calculada, se hacen los experimentos de competencia entre el ligando elegido, el dihidroalprenolol (DHA), con los NSAID utilizados para cada experimento.

Los experimentos de saturación de los receptores de las membranas plasmáticas de hígado se hicieron por triplicado. En ellos se resuspendieron 100 μ g de proteína/ml de buffer tris/HCl 50 mM, pH 7.4 conteniendo 10 mM $MgCl_2$ y se incuban por 10 min, a 37° C, adicionado de $[^3H]$ -dihidroalprenolol, con el esquema propuesto por Villalobos (Reyes-Salcido y Villalobos-Molina, 1999). El pegado total de $[^3H]$ -dihidroalprenolol se registró usando 8 diferentes concentraciones crecientes del ligando tritiado sin dilución, desde 0.1 hasta 30 nM. La unión no específica fue obtenida en presencia de 10 μ M de alprenolol frío, la unión específica se calculó restando la fracción que fue desplazada por el alprenolol. Al terminar la incubación, los 250 μ l de muestra se filtraron a través de filtros Whatman GF/C (20 nm de diámetro), los filtros fueron lavados con 5 ml de buffer de incubación a 4° C, secados y colocados en viales de centelleo, eluidos y contados en 5 ml de mezcla de la solución de centelleo en un contador de centelleo (Beckman, mod. L5 6000SC).

Una K_d de 13.5 nM se calculó para el $[^3H]$ -dihidroalprenolol.

Experimentos de competencia, entre el ligando y los NSAID, por el receptor

En los experimentos de competencia los NSAID fueron disueltos en agua, llevados a un pH de 8.5 con NaOH y agregados a las membranas inmediatamente

antes de añadir el ligando radiactivo e iniciar la incubación, la cual se terminó de manera similar a como se describe para los experimentos de saturación.

Preparación de adipocitos

Por las razones que se aducen al hacer referencia a los resultados, se han empleado dos técnicas para preparar los adipocitos. La primera que se describe es la clásica técnica de Rodbell (1964). Inmediatamente después se describe la técnica de Honnor y colaboradores (1985). La principal diferencia entre ambas técnicas es el uso del nucleósido adenosina, el cual inhibe a la adenilato ciclasa de los adipocitos del epidídimo, obteniéndose así adipocitos con valores basales de AMPc, bajos y muy similares.

Técnica de Rodbell

En esta técnica (Rodbell, 1964) a 100 ml de la solución Krebs-Ringer se le adicionan 133.18 mg de CaCl_2 , se mezcla y se airea con carbógeno, a 37° C, durante 15 min. Se ajusta el pH a 7.4 con una solución de NaHCO_3 al 6.5%. Los cojinetes grasos del epidídimo, de 2 ratas macho, cepa Wistar, de 200 a 220 g de peso, previamente lavados con solución fisiológica, se fragmentan con tijeras finas, se suspenden en 10 ml de buffer Krebs-Ringer a la cual se le ha agregado 3% de albúmina sérica bovina fracción V purificada, a esta mezcla se le adiciona 1mg/ml de colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (de Sigma), se coloca en 2 tubos de plástico y se incuba en baño maría 60 minutos, con agitación vigorosa. Al finalizar ese tiempo se filtran en una malla de nylon se centrifuga y el sobrenadante se lava con una solución Krebs-Ringer-albúmina al 1% tres veces. Se obtienen aproximadamente 2.5g de adipocitos y se emplean conforme el protocolo de cada experimento.

Técnica de Honnor

Al comparar esta técnica (Honor *et al.*, 1985) una primera diferencia con Rodbell es que emplea epidídimos de 2 ratas macho, cepa Wistar, de 200 a 220 g de peso, ayunadas 16 h. Las incubaciones se llevaron a cabo en buffer Krebs-Ringer-albúmina 1%, pH 7.4, suplementado con 30mM de Hepes más colagenasa tipo II al

1%, durante 30 minutos, con agitación vigorosa, después de lavar 3 veces con buffer Krebs-Ringer-albúmina más Hepes, la última vez se resuspenden en solución Krebs-Ringer-albúmina al 4% más Hepes 30mM. La albúmina empleada es la fracción V de Sigma y debe ser desgrasada previamente con carbón activado. 100 µl de adipocitos se emplean para cada ensayo, se aforan a 800 µl con el medio de incubación (Krebs-Ringer-albúmina 4% + Hepes 30 mM). Es importante mencionar que en todas las soluciones empleadas para resuspender y para incubar, se incluyó adenosina, 200 nM, como se dijo, para suprimir la producción endógena de AMPc durante el procedimiento de aislamiento.

Diseño experimental para evaluación de la lipólisis

Curva dosis respuesta a epinefrina

A partir de una solución acuosa de epinefrina 1×10^{-2} M, ajustada a pH 5 con HCl, se preparan diluciones que contienen las concentraciones finales necesarias para la curva que se hizo desde 1×10^{-4} hasta 1×10^{-8} M, se ajusta el volumen de 900 µl con buffer Krebs-Ringer-bicarbonato-albúmina al 4%, y se adicionan 100 µl de la suspensión de adipocitos. Se corre un experimento paralelo en el que cada tubo de la curva lleva una concentración fija de 3×10^{-6} M de uno de los NSAID; aspirina, naproxen, nimesulide, o piroxicam disueltos en agua y a pH de 8.5 ajustado con NaOH.

Curva dosis-respuesta al dibutilil AMPc (Dib-AMPc)

Cuando la estimulación de la lipólisis se hace con Dib-AMPc se prepara una solución acuosa de 0.1 M del nucleósido, a partir de la cual, se añaden a los 100 µl de adipocitos para alcanzar concentraciones finales de Dib-AMPc que van de 1×10^{-2} hasta 1×10^{-6} M, con las que se incuban durante 30 minutos.

En forma semejante a la curva dosis respuesta a epinefrina, se corre otro experimento paralelo con los adipocitos del mismo lote pero que contiene uno de los NSAID a concentraciones finales de 3×10^{-6} M, incubándose 30 minutos, después de los cuales se detiene la lipólisis al transferir los tubos del baño a 37° C a un baño de hielo durante 5 minutos. Los tubos se centrifugan durante 10 minutos a 10,000 x g y a la temperatura de 4° C. Una alícuota de 100 µl de la solución que está por abajo

del sobrenadante se transfiere cuidadosamente a un tubo nuevo para medir el glicerol liberado.

Determinación de glicerol

El glicerol se midió por el método colorímetro recomendado por Warnick (1986). En este método el glicerol es fosforilado a glicerol 1-fosfato en presencia de ATP y la glicerol cinasa, después es oxidado con la glicerol 3-fosfato oxidasa para producir cantidades equimoleculares de agua oxigenada y dihidroxiacetona fosfato. El agua oxigenada reacciona con el fenol y la aminoantipurina en presencia de peroxidasa y se produce un pigmento, quinoneimina, cuya intensidad es proporcional al contenido de agua oxigenada.

Determinación de proteínas

Para conocer la concentración de proteínas se empleó el método colorimétrico de Bradford (1976).

Cuantificación del agua oxigenada

La determinación de agua oxigenada se hizo conforme al método empleado por Thurman y cols. (1972). La medición se hace en el internadante, después de centrifugar los adipocitos a 13 500 r.p.m. durante 10 min a 4° C. Es importante medir el volumen del internadante con exactitud. Se le agrega TCA al 40% en una relación de 0.1 ml/ml. La muestra se centrifuga a 27 000, X g durante 15 min a 4°C, se separa el sobrenadante y se le agrega sulfato ferroso amoniacal 10 mM (0.2 ml x ml). Se agita y se agrega tiocinato de potasio al 2.5 M en una relación de 0.1 ml x ml. Agitar y esperar 30 min en la oscuridad. Leer a 480 nm.

Estadística empleada

Para conocer la significancia estadística entre los valores de las curvas de dosis-respuesta a la epinefrina y al Dib-AMPC contra las que llevan adicionado uno de los NSAID, se empleó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de comparación múltiple de Dunn recomendada para muestras pares (Sigma Stat-for Windows, versión 1.0 Jandel Co., San Rafael, CA. USA). En todos los análisis, una

$p < 0.05$ fue considerada como el nivel de significancia. La concentración y afinidad de los β receptores fueron determinadas en tres y ocho experimentos individuales para los experimentos de saturación y análisis de Seatchar usando el programa EBDA-LIGAND (Brisoft, Elsevier, Cambridge, UK). La prueba t de student se empleó para comparar la B_{max} y la afinidad entre los grupos.

RESULTADOS

Los principales resultados experimentales se presentan en tres partes. En la primera se incluyen datos sobre la acción de los NSAID inhibiendo la lipólisis estimulada por la epinefrina. Después se revisa la incapacidad de esos NSAID para modificar la unión (binding) de un agonista β -adrenérgico con su receptor en el adipocito, y enseguida se presenta la acción inhibitoria de los NSAID sobre la estimulación de la lipólisis mediada por el AMPc. La segunda parte de los resultados se refiere a la acción del etanol, el acetaldehído y ambos sobre la lipólisis estimulada por el Dib-AMPc; en esta parte también se analiza la posible acción de los compuestos anotados en relación con la acción inhibitoria de los NSAID en la lipólisis. La última parte de los resultados comprende los efectos del H_2O_2 al disminuir la acción lipogénica del Dib-AMPc y ofrece una explicación mediada por el H_2O_2 , sobre los efectos antagónicos de los NSAID y el Dib-AMPc, los primeros elevando la poza de H_2O_2 y así inhibiendo la lipólisis, y el segundo estimulando la lipólisis y disminuyendo la poza de H_2O_2 .

Efecto de los NSAID sobre la lipólisis

En la Fig. 13 puede verse la curva dosis-respuesta a la lipólisis estimulada con la epinefrina, obtenida en adipocitos preparados conforme a la técnica de Rodbell, modificada por Honnor. La mayor estimulación de la lipólisis, medida por la máxima liberación de glicerol (5.5 μ moles/g de peso húmedo), se registró a una concentración de epinefrina de 10^{-4} M. Sin embargo, desde una concentración de 10^{-6} M, la estimulación de la lipólisis es significativamente mayor al ser comparada con la actividad lipolítica del tubo control, que no contiene el anti-inflamatorio. La adición de cualquiera de los NSAID ensayados, empleados a una concentración de 3×10^{-6} M, produce una inhibición estadísticamente significativa de la acción de la hormona a partir de la concentración de 10^{-6} M de epinefrina. La máxima inhibición en la liberación de glicerol se observa con el piroxicam, el cual, a las concentraciones de epinefrina de 10^{-6} hasta 10^{-4} M disminuye en un 60% la liberación del glicerol en comparación con los tubos que no contienen el NSAID. Las diferencias entre los cuatro NSAID ensayados no fueron estadísticamente significativas.

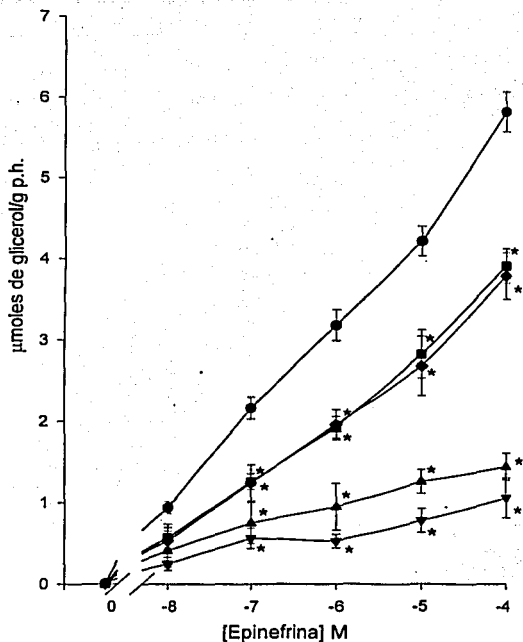


Fig. 13. Efecto de diferentes NSAID sobre la liberación de glicerol estimulado con concentraciones crecientes de epinefrina en adipocitos aislados de ratas. Los adipocitos fueron incubados con diferentes concentraciones de epinefrina, control en ausencia de NSAID (●), en presencia de 3×10^{-6} M de aspirina (■), naproxen (◆), nimesulide (▲) o piroxicam (▼). Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37° C. Cada valor representa el promedio \pm ee para seis experimentos individuales en adipocitos incubados con epinefrina más uno de los NSAID. * $p < 0.05$, al comparar células tratadas con epinefrina más uno de los NSAID.

Se sabe que los principales receptores para la epinefrina, localizados en la membrana del adipocito de rata, son del subtipo β (Lafontan y Berlan, 1993); por lo tanto, se pensó estudiar la acción del etanol y los NSAID seleccionados para modular la unión del dihidroalprenolol, un agonista β adrenérgico, con estos receptores. Bajo las condiciones experimentales aquí descritas no hay efecto del etanol ni de los NSAID sobre la unión del dihidroalprenolol al receptor, como puede deducirse por la similitud de los valores de la K_d y la B_{max} . (Tabla II). Los NSAID fueron ensayados en experimentos de competencia empleando 14 concentraciones diferentes de cada uno de ellos, que van desde 10^{-8} hasta 10^{-2} M, en ausencia y presencia de etanol. En ningún caso tuvieron efecto sobre la unión del ligando al receptor.

Tabla II
 NÚMERO DE RECEPTORES B_{max} Y K_d PARA EL [3 H]DIHIDROALPRENOLOL EN MEMBRANAS AISLADAS DE HÍGADO

Medio de incubación	B_{max} (fmol/mg proteína)	K_d (nM)
Sin etanol	2167 \pm 539 (n = 8)	18.9 \pm 1.6 (n = 8)
Con etanol	1840 \pm 435 (n = 3)	23.6 \pm 2.8 (n = 3)

Los valores son el promedio \pm error estándar con el número de ratas en paréntesis. Las diferencias no tuvieron significado estadístico.

Después de medir el efecto inhibitor de cuatro NSAID sobre la lipólisis estimulada por la epinefrina, y de constatar que tanto esos NSAID como el etanol no modifican la unión ligando-receptor β , se consideró conveniente conocer la posible inhibición de los NSAID sobre la lipólisis promovida por el AMPc. Con ese objeto se empleó un análogo no hidrolizable del AMPc, el Dib-AMPc, (citado por Gaudiot *et al.*, 2000). Al realizar la curva dosis-respuesta de la lipólisis estimulada con el Dib-AMPc (Fig. 14) se observa que la máxima producción de glicerol se registró a una concentración de 10^{-2} M de Dib-AMPc que corresponde a 7.10 μ moles de glicerol/g

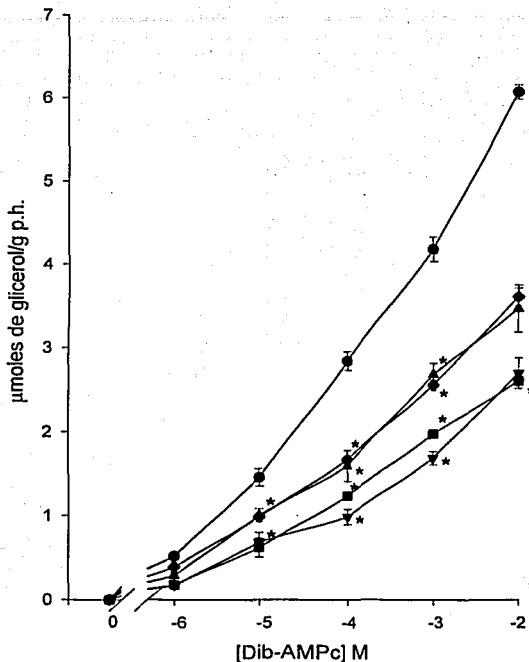


Fig. 14. Efecto de diferentes NSAID sobre la liberación de glicerol estimulado con concentraciones crecientes de dibutiril AMPc en adipocitos aislados de ratas. Los adipocitos fueron incubados con diferentes concentraciones de dibutiril AMPc, control en ausencia de antiinflamatorio (●), en presencia de 3×10^{-6} M de aspirina (▼), naproxen (■), nimesulide (◆) y piroxicam (▲). Todas las muestras fueron incubadas 30 minutos a 37° C. Cada valor representa el promedio \pm ee para seis ensayos individuales en adipocitos incubados con dibutiril AMPc y tres ensayos individuales en adipocitos incubados con dibutiril AMPc más uno de los NSAID. * $p < 0.05$, al comparar células tratadas con dibutiril AMPc vs dibutiril AMPc más uno de los NSAID.

de peso húmedo. Los adipocitos que se emplearon para probar si los NSAID modifican la lipólisis estimulada con Dib-AMPc, fueron incubados a la concentración constante del NSAID ensayado en los experimentos previos con epinefrina, de 3×10^{-6} M. Puede observarse que los cuatro NSAID empleados, aspirina, naproxen, nimesulide y piroxicam, presentaron un comportamiento semejante en cuanto a que la inhibición se inicia a la concentración de 10^{-4} M de AMPc y es mayor a la concentración de 10^{-2} M, siendo la aspirina la que produce un mayor efecto; se aprecia una inhibición de 78%, 54% y 68% a las concentraciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M de Dib-AMPc, en presencia de una concentración constante de aspirina. La lipólisis estimulada con Dib-AMPc en presencia de los NSAID, contra la curva sin NSAID, presenta la misma significancia estadística con una $p < 0.05$ para los 4 NSAID a las concentraciones del Dib-AMPc desde 10^{-5} hasta 10^{-2} M. En este caso, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las acciones de los cuatro NSAID empleados.

Efecto del etanol, el acetaldehído y ambos sobre la lipólisis estimulada por el Dib-AMPc e inhibida por los NSAID

La siguiente parte de este trabajo se realizó para conocer si los efectos descritos para los NSAID suceden en condiciones semejantes a las que existen en el organismo durante la intoxicación aguda con etanol. Por consiguiente, se estudió el efecto del etanol, el acetaldehído y el de ambos, sobre la lipólisis estimulada por Dib-AMPc, así como su posible influencia sobre la inhibición registrada con los NSAID estudiados. Esta parte del estudio tiene particular relevancia, porque tal como se muestra en la tabla III, los datos hallados en los reportes de la literatura internacional son contradictorios en relación con los efectos del etanol y el acetaldehído sobre la lipólisis basal y la lipólisis estimulada por agonistas adrenérgicos y el Dib-AMPc. Así, se consideró conveniente establecer de manera más definitiva el papel del etanol, el acetaldehído y el de ambos, sobre la lipólisis. Para ello, al sistema *in vitro* se le adicionó suficiente etanol, acetaldehído, o ambos, para alcanzar concentraciones de 12.5 a 100 mM en el caso del primero y de 12.5 a 100 μ M en el segundo, las cifras bajas encontradas en bebedores sociales (2 tragos por noche) y las altas en borrachos (10-12 tragos por noche) (Caballero-Cruz, 1998). Los adipocitos fueron

preparados a partir de ratas con 16 h de ayuno, como en los experimentos anteriores, y además en algunos experimentos, a partir de ratas alimentadas *ad libitum* y sacrificadas a las 8 a.m., en vista de que la alimentación y el ayuno pueden influir sobre la respuesta a la lipólisis en presencia de etanol (Giudicelli *et al.*, 1978 y Nilsson y Belfrage 1978).

Los adipocitos de animales con 16 h de ayuno mostraron que las concentraciones moderadas de etanol, 12.5 y 25 mM, no modificaron la lipólisis estimulada por el Dib-AMPC, mientras que las concentraciones altas, 50 y 100 mM, inhibieron en cerca de 50% la lipólisis estimulada por concentraciones de Dib-AMPC en el intervalo de 10^{-6} hasta 10^{-2} M (Fig. 15). En el caso de los adipocitos preparados con ratas alimentadas *ad libitum* es de interés notar que la concentración más baja de etanol ensayada, 12.5 mM, estimula de manera estadísticamente significativa la lipólisis activada por 10^{-4} a 10^{-2} M de Dib-AMPC (Fig. 16). El etanol a mayores concentraciones, 25, 50 y 100 mM produjo inhibición estadísticamente significativa en la liberación de glicerol promovida por las cinco concentraciones de Dib-AMPC incluidas en la Fig. 16, y con las dos mayores concentraciones de etanol, 50 y 100 mM, dicha inhibición, al igual que en los adipocitos de las ratas ayunadas, la inhibición es mayor del 50%.

Concentraciones de acetaldehído tres órdenes de magnitud inferiores a las de etanol, tal como sucede en la sangre de los bebedores, esto es de 12.5 a 100 μ M, se estudiaron en adipocitos de ratas en ayunas y los resultados se resumen en la Fig. 17: las dos concentraciones más altas de acetaldehído empleadas estimularon la lipólisis mediada por Dib-AMPC y no hubo cambio apreciable con dicho indicador al emplear las concentraciones bajas del aldehído. De manera semejante ocurre con los animales alimentados (Fig. 18).

De lo anterior se concluye que la acción del etanol y del acetaldehído, añadidos directamente a los adipocitos aislados producen un efecto similar, independientemente de que las células provengan de un animal en ayunas o un animal comido; el etanol tiende a inhibir la lipólisis estimulada por el Dib AMPC, mientras que el acetaldehído estimula la lipólisis mediada por el mismo Dib AMPC. Los siguientes experimentos se realizaron con animales ayunados, con base en dos

hechos: no hay cambio en la respuesta por el ayuno de 16 h o la alimentación *ad libitum* y los experimentos previos se efectuaron en ratas ayunadas.

En el bebedor de etanol coinciden los niveles sanguíneos altos de etanol y acetaldehído, por lo que el último experimento de esta serie se realizó adicionando etanol y acetaldehído a los adipocitos estimulados con el nucleótido cíclico. Las concentraciones seleccionadas de etanol y acetaldehído fueron 50 mM y 50 μ M respectivamente, con las cuales se obtuvieron efectos claramente opuestos sobre la lipólisis desencadenada por el AMPc. En los resultados de la Fig. 19, se aprecia que el efecto inhibitorio del etanol sobre la lipólisis predomina sobre el efecto estimulante del acetaldehído. Los resultados no son de extrañar, puesto que en el medio de incubación se dispone de 1000 veces más etanol que acetaldehído.

En el esquema general de esta tesis y del trabajo realizado en el laboratorio era de particular interés definir si las acciones del etanol, acetaldehído y etanol + acetaldehído sobre la lipólisis promovida por el Dib-AMPc pudieran modificar el efecto inhibitorio de los NSAID actuando sobre el mismo indicador metabólico, la lipólisis estimulada por el Dib-AMPc. Por consiguiente se exploró la acción combinada de cada uno de los cuatro NSAID elegidos junto con etanol (50 mM), o acetaldehído (50 μ M), o etanol + acetaldehído (50 mM + 50 μ M) al actuar sobre la lipólisis estimulada por Dib-AMPc en adipocitos de ratas con 16 h de ayuno. La acción inhibitoria de cada uno de los cuatro NSAID sobre la lipólisis mediada por Dib-AMPc se sumó al efecto inhibitorio del etanol (50 mM) por lo que se registró una actividad lipolítica de apenas un tercio en comparación con la cifra basal (Fig. 20). De manera análoga, la acción estimulante del acetaldehído sobre la lipólisis en respuesta al Dib-AMPc se sumó algebraicamente a la acción inhibitoria de los NSAID sobre el mismo indicador, por lo que se contrarrestaron ambos efectos y la resultante fue una actividad lipolítica similar a la obtenida en los experimentos control tratados exclusivamente con el Dib-AMPc (Fig. 21). Los últimos resultados de esta serie se presentan en la Fig. 22. Cada uno de los cuatro NSAID en estudio se mezclaron con etanol (50 mM) más acetaldehído (50 μ M) y se cuantificó la lipólisis activada con dosis crecientes de Dib-AMPc. En dicha figura se muestra que la acción inhibitoria sobre la lipólisis registrada previamente con la mezcla de etanol y acetaldehído fue más marcada con los cuatro NSAID utilizados en este estudio. O sea, que los anti-

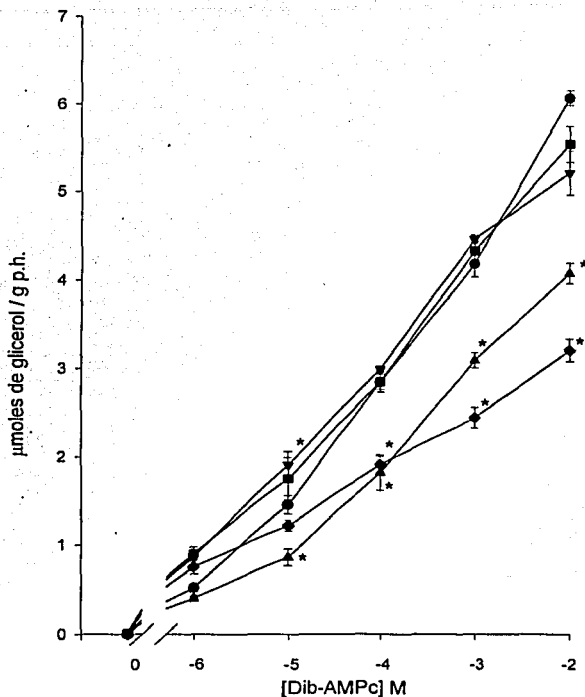


Fig. 15. Efecto de diferentes concentraciones de etanol sobre la liberación de glicerol estimulada con concentraciones crecientes de dibutilil AMPc en adipocitos aislados de ratas ayunadas 16 h. Las condiciones de la incubación son 30 minutos a 37° C. Control sin etanol (●), etanol 12.5 mM (▼), etanol 25 mM (■), etanol 50 mM (◆) y etanol 100 mM (▲). Cada valor representa el promedio \pm ee de seis ensayos para el control y de tres ensayos individuales en los adipocitos incubados con etanol. * $p < 0.05$ al comparar glicerol liberado de células incubadas sin etanol vs incubadas con etanol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

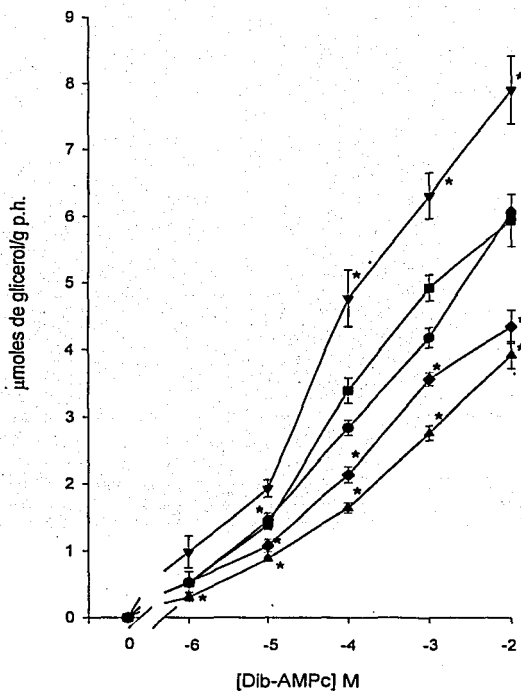


Fig. 16. Efecto de diferentes concentraciones de etanol sobre la liberación de glicerol estimulada con concentraciones crecientes de dibutiril AMPc en adipocitos aislados de ratas alimentadas. Las condiciones de la incubación son 30 minutos a 37° C. Control sin etanol (●), etanol 12.5 mM (▼), etanol 25 mM (■), etanol 50 mM (◆) y etanol 100 mM (▲). Cada valor representa el promedio \pm ee de seis ensayos para el control y de tres ensayos individuales en los adipocitos incubados con etanol. * $p < 0.05$ al comparar glicerol liberado de células incubadas sin etanol vs incubadas con etanol.

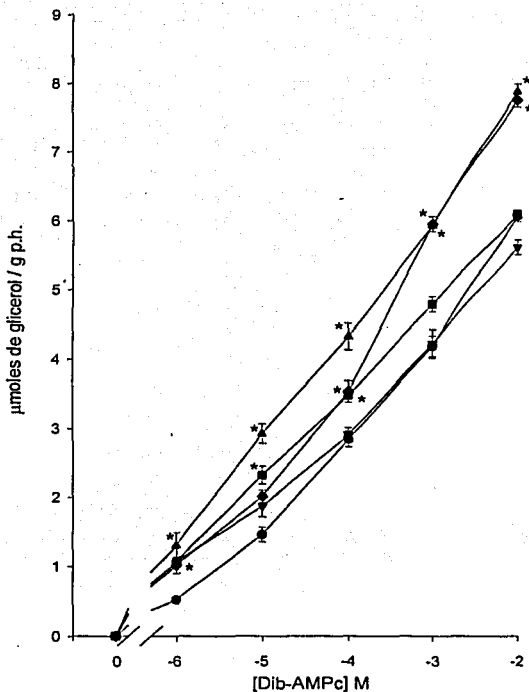


Fig. 17. Efecto de diferentes concentraciones de acetaldehído sobre la liberación de glicerol estimulada con concentraciones crecientes de dibutiril AMPc en adipocitos aislados de ratas ayunadas 16 h. Las condiciones de la incubación son 30 minutos a 37° C. Control sin acetaldehído (●), acetaldehído 12.5 μM (▼), acetaldehído 25 μM (■), acetaldehído 50 μM (◆) y acetaldehído 100 μM (▲). Cada valor representa el promedio ± ee de seis ensayos para el control y de tres ensayos individuales en los adipocitos incubados con acetaldehído. * $p < 0.05$ al comparar glicerol liberado de células incubadas sin acetaldehído vs incubadas con acetaldehído.

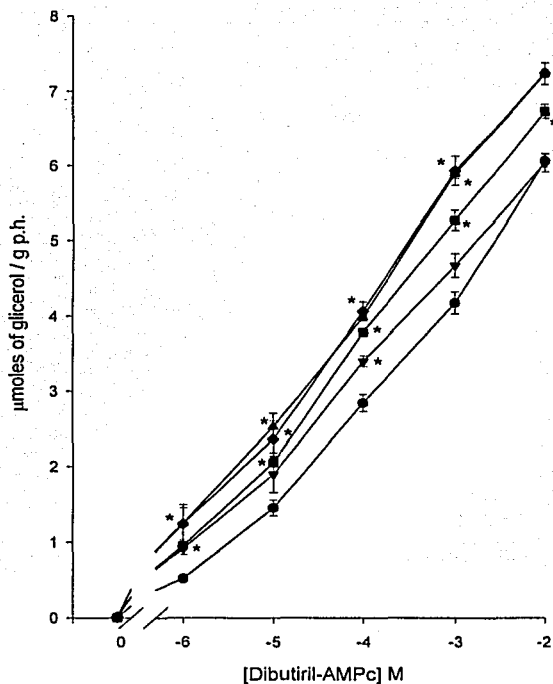


Fig. 18. Efecto de diferentes concentraciones de acetaldehído sobre la liberación de glicerol estimulada con concentraciones crecientes de dibutiril AMPc en adipocitos aislados de ratas alimentadas. Las condiciones de la incubación son 30 minutos a 37° C. Control sin acetaldehído (●), acetaldehído 12.5 µM (▼), acetaldehído 25 µM (■), acetaldehído 50 µM (◆) y acetaldehído 100 µM (▲). Cada valor representa el promedio ± ee de seis ensayos para el control y de tres ensayos individuales en los adipocitos incubados con acetaldehído. * $p < 0.05$ al comparar glicerol liberado de células incubadas sin acetaldehído vs incubadas con acetaldehído.

Tabla III

RESUMEN CON LOS DATOS DE LA LITERATURA BIOMÉDICA SOBRE LAS ACCIONES DEL ETANOL Y EL ACETALDEHÍDO SOBRE LA LIPÓLISIS *IN VITRO*

Referencia	Estado nutritivo		Muestra estudiada		Lipólisis estudiada		Etanol		Acetaldehído	
	Alimentado	Ayunado	Epidídimo	Adipocitos aislados	Basal	Estimulada con	Dosis usada	Efecto	Dosis usada	Efecto
Bizzi y Carlson 1965	+	24 h	+		+		2.2×10^{-1} 2.2×10^{-1}	↑26% ninguno		
Giudicelli <i>et al.</i> , 1972 a		18 h	+		+		10^{-2} a 2×10^{-2}	↓ 30%	5×10^{-3} a 2×10^{-2}	↑ 220 a 350%
Giudicelli <i>et al.</i> , 1972 b	+		+						5×10^{-4} 10^{-2} 10^{-2}	↑ 24% ↑ 218% ↓ 20%
Giudicelli <i>et al.</i> , 1978		24 h 24 h 24 h 24 h	+			10^{-6} norepinefrina 10^{-3} Dib-AMPc 10^{-6} norepinefrina 10^{-3} Dib-AMPc	10^{-1} 10^{-1}	ninguno ninguno	10^{-5} a 10^{-2} 10^{-2}	↓ dosis dependiente ↓ 65%
Nilsson y Belfrage 1978	+		+			1.8×10^{-3} norepinefrina 1.8×10^{-6} norepinefrina	10^{-1}	ninguno	10^{-3}	no reproducible

El resumen incluye la información publicada desde 1965 hasta agosto del 2002. La lipólisis fue medida por la liberación de glicerol. En todos los casos el cojinete del epidídimo o los adipocitos se obtuvieron de la rata

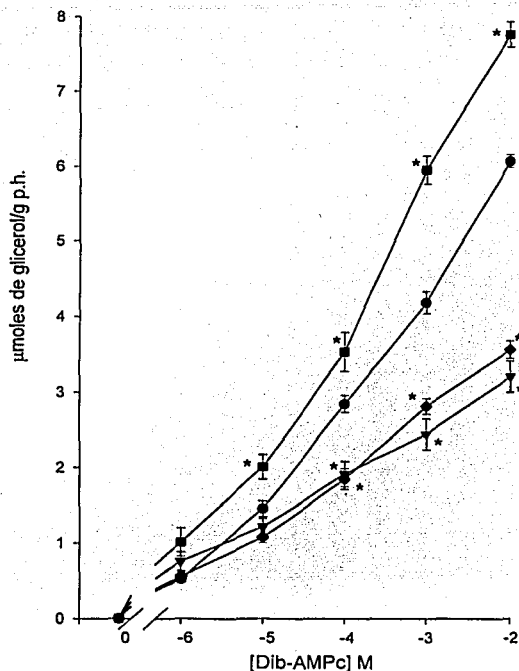


Fig.19. Efecto de la adición de etanol 50 mM y acetaldehído 50 μ M o de ambos sobre la liberación de glicerol en adipocitos aislados de rata ayunadas, estimulados con diferentes concentraciones de dibutilil AMPc. Las condiciones de incubación de las células son 30 minutos a 37° C. Control sin etanol y sin acetaldehído (●), etanol 50 mM (▼), acetaldehído 50 μ M (■) y etanol 50 mM- acetaldehído 50 μ M (◆). Los valores representan el promedio \pm ee de seis ensayos para el control y de tres ensayos individuales en los adipocitos incubados con etanol y/o acetaldehído. * $p < 0.05$ al comparar glicerol liberado de células incubadas sin etanol y/o acetaldehído vs células con etanol y/o acetaldehído.

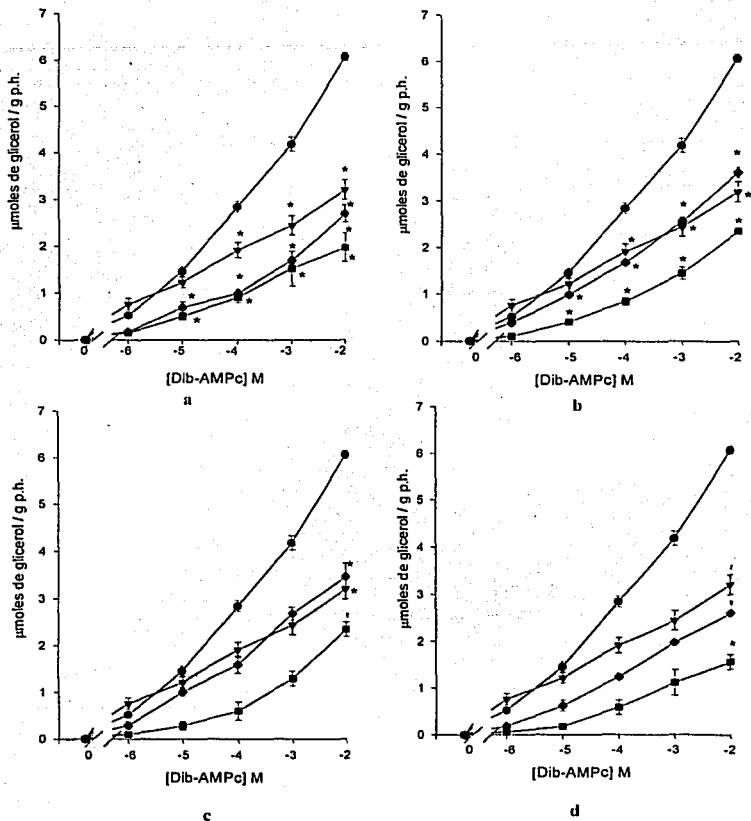


Fig. 20. Efecto de los NSAID sobre la liberación de glicerol en adipocitos aislados de rata, con 16 h de ayuno, estimulados con diferentes concentraciones de dibutilil AMPc y etanol 50 mM. Control sin etanol y sin NSAID (●), con etanol y sin NSAID (▼), etanol más NSAID (empleado a la concentración de 3×10^{-6} M en todos los casos en que se adicionó) (■) y NSAID solo (♦), panel del a al d, representan aspirina, naproxen, nimesulide y piroxicam respectivamente. Las condiciones de incubación y la significancia estadística son iguales a las anotadas en las figuras anteriores.

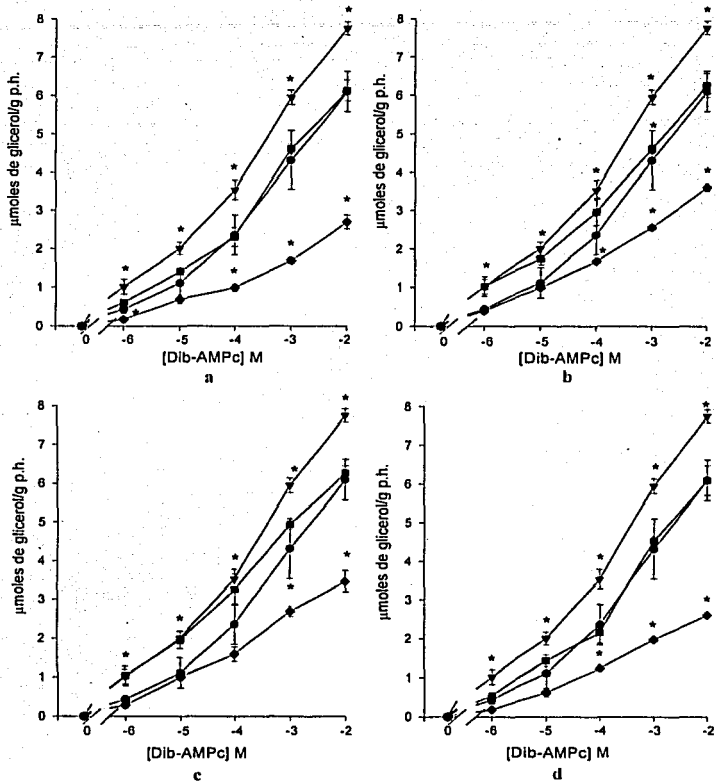


Fig. 21. Efecto de los NSAID sobre la liberación de glicerol en adipocitos aislados de rata, con 16 h de ayuno, estimulados con diferentes concentraciones de dibutilil AMPc y acetaldehído 50 μ M. Control sin acetaldehído y sin NSAID (●), con acetaldehído y sin NSAID (▼), acetaldehído más NSAID (en todos los casos en que se adicionó fue a una concentración de 3×10^{-6} M) (■) y NSAID solo (◆), panel del **a** al **d**, representan aspirina, naproxen, nimesulide y piroxicam respectivamente. Las condiciones de incubación y la significancia estadística son iguales a las anotadas en las figuras anteriores.

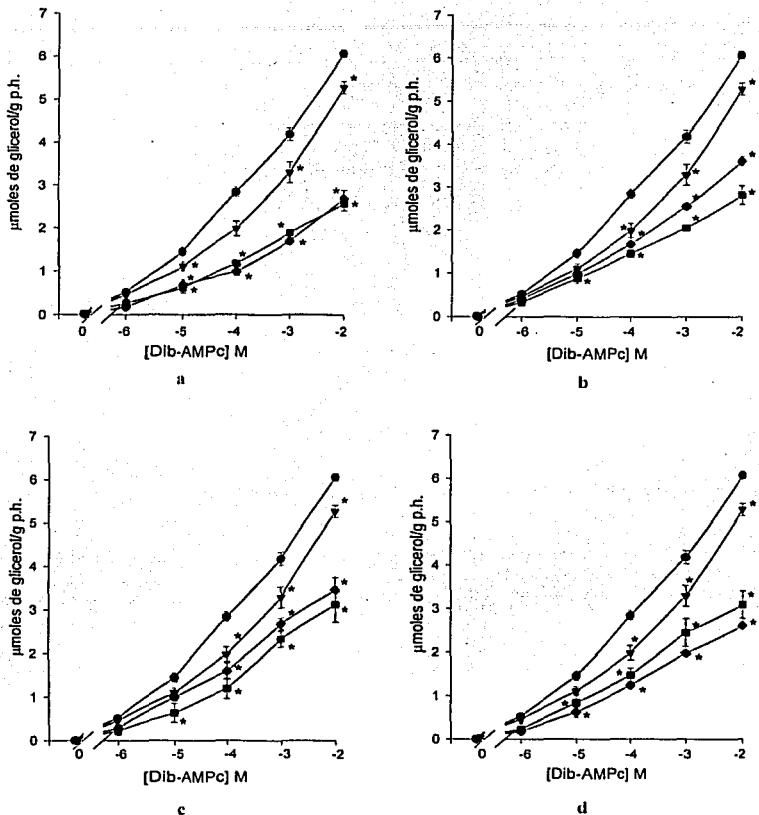


Fig. 22. Efecto de los NSAID sobre la liberación de glicerol en adipocitos aislados de rata, con 16 h de ayuno, estimulados con diferentes concentraciones de dibutilil AMPc y etanol 50 mM más acetaldehído 50 \square M. Control sin etanol y acetaldehído y sin NSAID (●), con etanol y acetaldehído y sin NSAID (▼), etanol y acetaldehído más NSAID (3×10^{-5} M) (◆) y NSAID solo (■) y NSAID del a al d, representan aspirina, naproxen, nimesulide y piroxicam respectivamente. Las condiciones de incubación y la significancia estadística son iguales a las anotadas en las figuras anteriores.

inflamatorios inhiben la lipólisis en adipocitos bañados con concentraciones de etanol y acetaldehído similares a las recuperadas en individuos intoxicados con etanol.

Participación del H_2O_2 mediante los efectos del Dib-AMPc y los NSAID

La parte final de este trabajo se refiere a la posible acción de los NSAID modulando los niveles celulares del H_2O_2 en los adipocitos. Se enfocó el proyecto en este sentido porque existen datos de la literatura en los cuales se evidencia que un exceso del H_2O_2 inhibe tanto la lipólisis estimulada por hormonas o por análogos del AMPc, como la actividad de la proteína quinasa A (Beebe *et al.*, 1985). Por lo tanto, se consideró fundamental estudiar la posible formación del agua oxigenada en el proceso de la lipólisis, por un lado estimulada con el Dib-AMPc, y por el otro inhibida por medio de los NSAID. La curva dosis-respuesta lipolítica al peróxido de hidrógeno, medida como liberación de glicerol producido por los adipocitos estimulados con Dib-AMPc (1×10^{-3} M) muestra una relación directa entre la inhibición de la respuesta lipolítica y las concentraciones elevadas del peróxido de hidrógeno (Fig. 23). Por esta razón en los experimentos iniciales se empleó una concentración final alta de agua oxigenada, pero semejante a la reportada en la literatura por otros autores (Gaudiot *et al.*, 2000) para este tipo de estudios, y que es 1mM; desde luego esta concentración es más alta que la fisiológica, aunque se demuestra experimentalmente que una vez mezclada con la solución Krebs Ringer albúmina, parte del agua oxigenada se une a la proteína y la concentración aparente desciende a 750 μ M (Fig. 24). Al agregar esa concentración de agua oxigenada a una curva dosis respuesta para el Dib-AMPc se observa que la liberación de glicerol se inhibe en 60% aproximadamente, a las concentraciones 1×10^{-4} hasta 1×10^{-2} M de Dib-AMPc (Fig. 25). Más aún, la adición de catalasa aumenta la lipólisis estimulada con Dib-AMPc a todas las concentraciones del nucleótido usadas. Además, la lipólisis sobreestimada en estas condiciones, no se inhibe por la adición de ninguno de los cuatro NSAID ensayados (Fig. 26), tal como sí se observa cuando la lipólisis es estimulada solamente con el nucleótido cíclico.

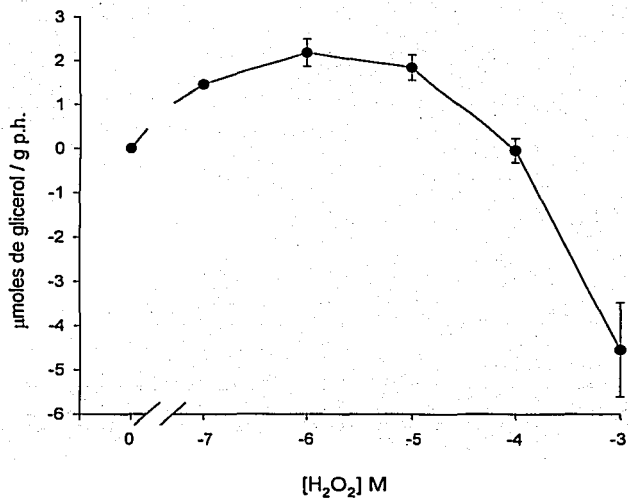


Fig. 23. Curva dosis-respuesta lipolítica al peróxido de hidrógeno, medida como liberación de glicerol resultante de la incubación de adipocitos con una concentración fija de Dib-AMPc (1×10^{-3} M) y variables de H₂O₂. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm ee.

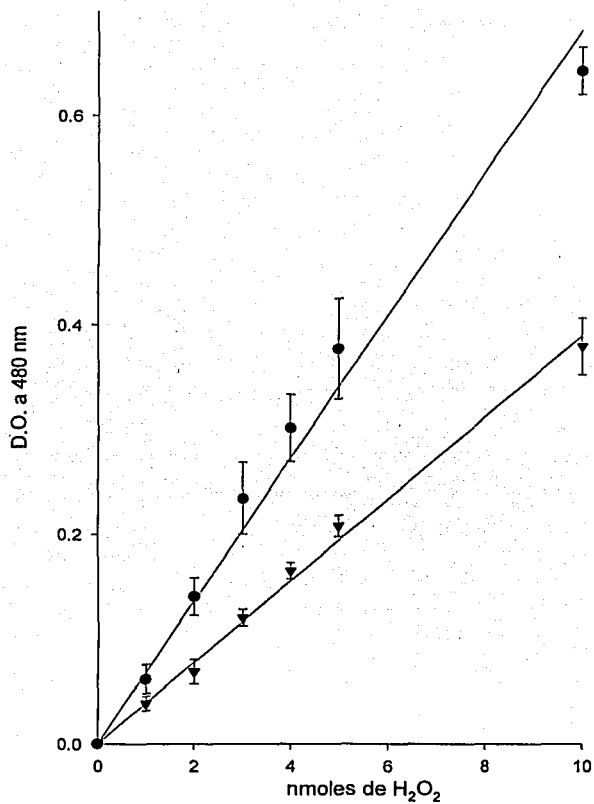


Fig. 24. Curva estándar de peróxido de hidrógeno disuelta en un amortiguador de Krebs-Ringer sin albúmina (●) (n = 3) y con albúmina (▼) (n = 12). Cada punto representa el promedio ± ee.

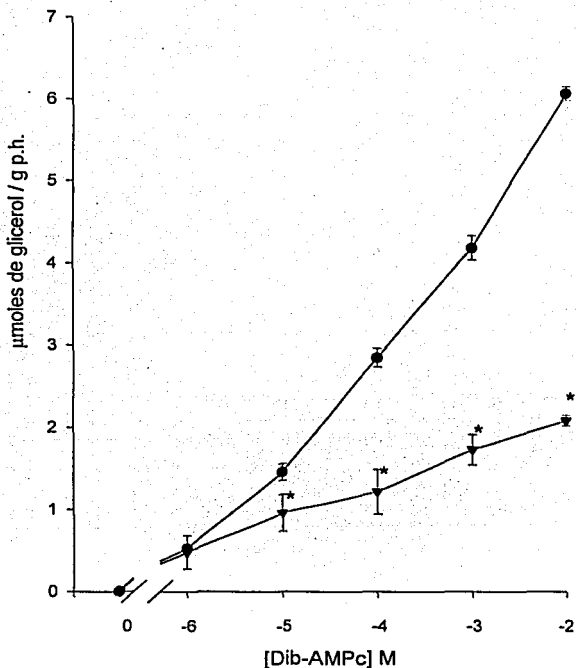


Fig. 25. Efecto del peróxido de hidrógeno (1 mM) sobre la lipólisis en adipocitos aislados de rata incubados 30 min con concentraciones crecientes de Dib-AMPC sin peróxido de hidrógeno (●) y con peróxido de hidrógeno (▼). Cada punto representa el promedio de 3 ensayos \pm ee.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

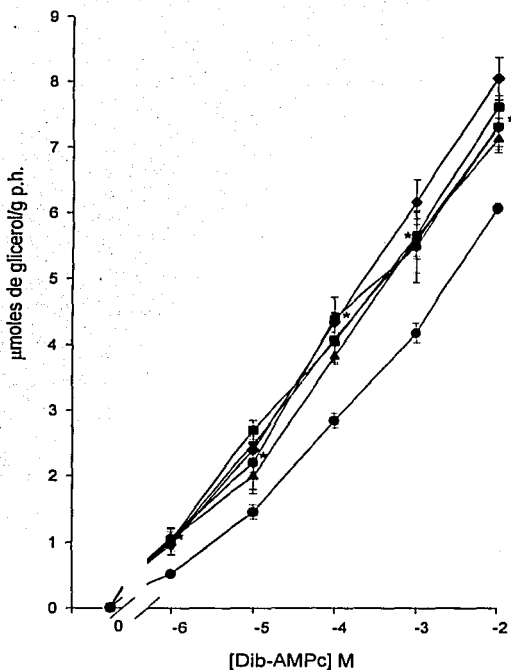


Fig. 26. Efecto de la catalasa sobre la lipólisis en adipocitos aislados de ratas con 16 h de ayuno, estimulada con Dib-AMPC en ausencia o presencia de NSAID a la concentración de 3×10^{-6} M durante 30 min. Control sin catalasa y sin NSAID. Curva dosis respuesta al Dib-AMPC sin catalasa y sin NSAID (●). Con 1000 μ U de catalasa adicionadas (▼), más aspirina (■), más naproxen (◆), más nimesulide (▲), más piroxicam (●). Cada punto representa seis ensayos individuales sin NSAID y tres ensayos con catalasa con o sin NSAID. * Significancia estadística como en figuras anteriores, comparando la curva sin y con catalasa.

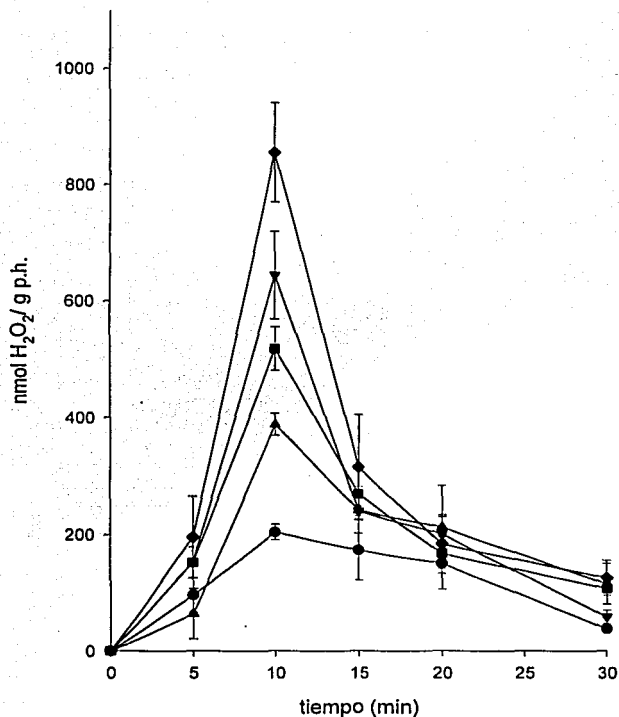


Fig. 27. Generación de peróxido de hidrógeno durante la estimulación de la lipólisis con por Dib-AMPC 1×10^{-3} M en adipocitos aislados de rata ayunada, en ausencia de NSAID (●), y en presencia de NSAID 3×10^{-5} M, aspirina (▼), naproxen (■), nimesulide (◆), piroxicam (▲). Cada punto representa el promedio de 3 ensayos \pm ee * $p < 0.05$ al comparar los valores en ausencia de anti-inflamatorio vs en presencia de algún NSAID

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La siguiente etapa consistió en cuantificar la concentración de H_2O_2 durante la estimulación de la lipólisis con el análogo del AMPc en el medio, con ese objeto se realizó un curso temporal para una concentración fija de Dib-AMPc igual a $10^{-3}M$. Se observa que los niveles de agua oxigenada son bajos en todos los tiempos estudiados, excepto a los 30 min, en donde es prácticamente nula. Al agregar los NSAID aspirina o piroxicam ($3 \times 10^{-6}M$) la producción de agua oxigenada se estimula, en sólo 10 min de incubación, en 4 a 5 veces (Fig. 27). Después de los 15 min la producción de H_2O_2 desciende.

También se estudiaron a los 10 min de incubación las modificaciones en la poza de H_2O_2 en función de las concentraciones de Dib-AMPc añadidas a los adipocitos. Si bien los valores de la poza de H_2O_2 son bajos, no superan las 140 nmolas/g p h, el perfil de la curva es poco usual, las cifras suben a concentraciones del nucleótido de 10^{-5} y 10^{-4} M, para disminuir cuando dichas concentraciones ascienden a 10^{-3} y 10^{-2} M (Fig. 28).

Los experimentos realizados después fueron incubados por 10 min y se registró la poza de H_2O_2 en función de la dosis de cada uno de los 4 NSAID seleccionados, en ausencia y en presencia de una concentración de Dib-AMPc de 10^{-3} M, seleccionada por ofrecer una muy buena respuesta lipolítica y un pobre aumento en la poza de H_2O_2 (Fig. 29). Las curvas obtenidas fueron muy similares para los 4 NSAID; en ausencia del Dib-AMPc la máxima poza de H_2O_2 fue cercana a la 1100 nmolas/g p. h. (cifra más alta 1,400 n molas/g p. h. con naproxen) alcanzada con una concentración de anti-inflamatorio de 10^{-6} M (Fig. 29), excepto para el piroxicam que fue de 10^{-2} M (Fig. 32). En dicho sistema, la adición de Dib-AMPc disminuye a cifras cercanas a 300 n molas/ g p h la poza de H_2O_2 , y la producción máxima se obtuvo con 10^{-3} M del nucleótido cíclico y 10^{-7} M de cualquiera de los anti-inflamatorios (Figs. 29-32).

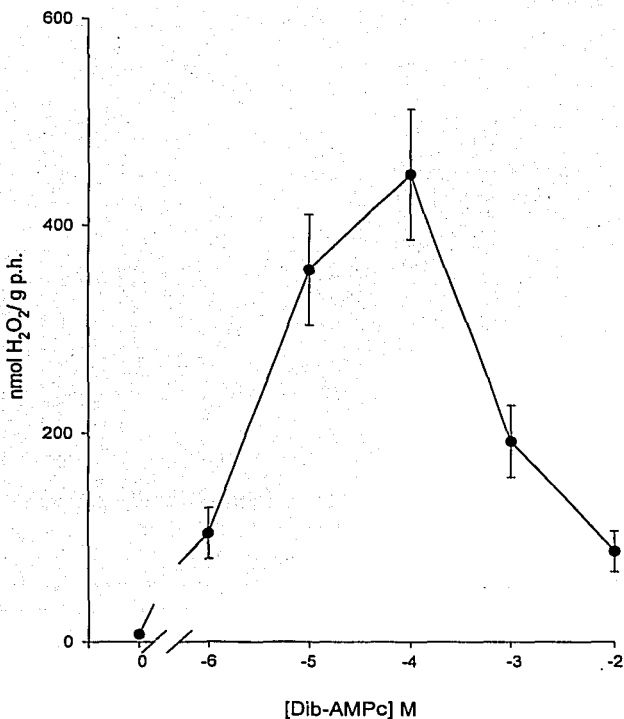


Fig. 28. Formación de peróxido de hidrógeno por adipocitos aislados de rata incubados con concentraciones crecientes de dibutilil AMPc. El tiempo de incubación fue de 10 minutos a 37° C. Cada punto representa el promedio de 7 ensayos \pm ee.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

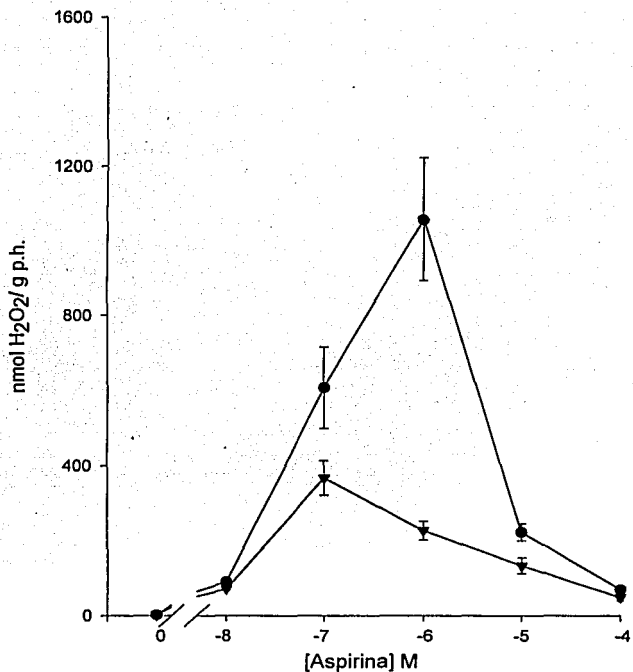


Fig. 29. Formación de peróxido de hidrógeno por adipocitos aislados de rata incubados por 10 min con concentraciones crecientes de aspirina, en ausencia (●) y en presencia (▼) de dibutil AMPc 1×10^{-3} M. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones individuales $\pm ee$ * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa al comparar las determinaciones que se hicieron en presencia de dibutil AMPc vs ausencia de dibutil AMPc.

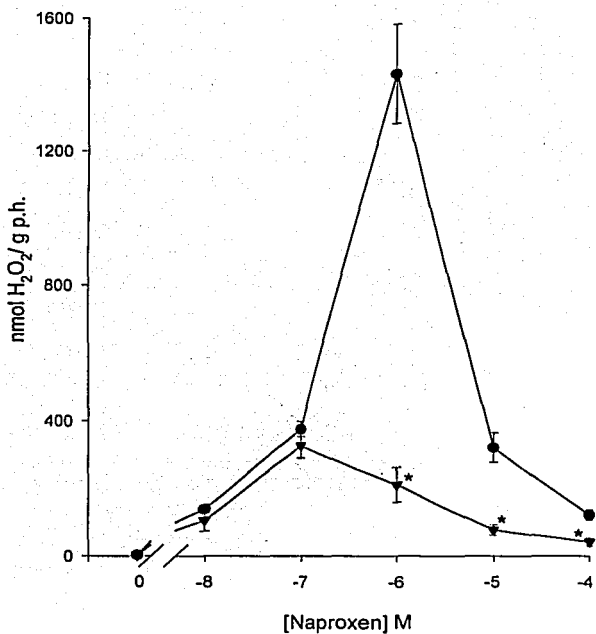


Fig. 30. Formación de peróxido de hidrógeno por adipocitos aislados de rata incubados por 10 min con concentraciones crecientes de naproxen, en ausencia (●) y en presencia (▼) de dibutiril AMPc 1×10^{-3} M. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones individuales \pm ee * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa al comparar las determinaciones que se hicieron en presencia de dibutiril AMPc vs ausencia de dibutiril AMPc.

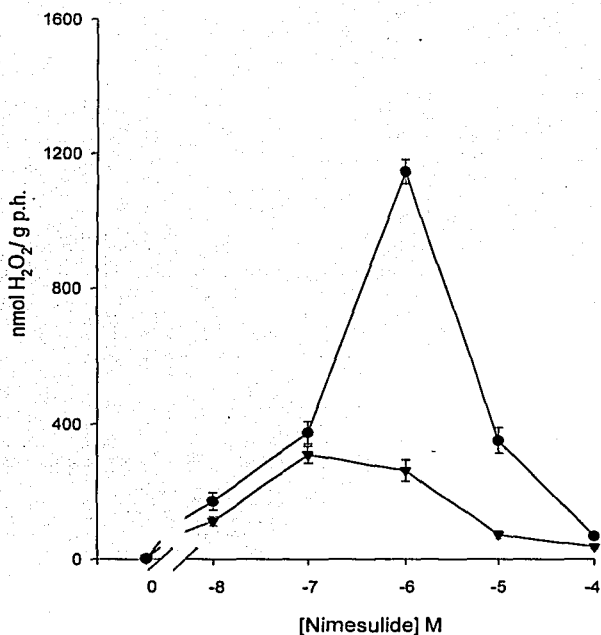


Fig. 31. Formación de peróxido de hidrógeno por adipocitos aislados de rata incubados por 10 min con concentraciones crecientes de nimesulide, en ausencia (●) y en presencia (▼) de dibutil AMPc 1×10^{-3} M. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones individuales \pm ee * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa al comparar las determinaciones que se hicieron en presencia de dibutil AMPc vs ausencia de dibutil AMPc.

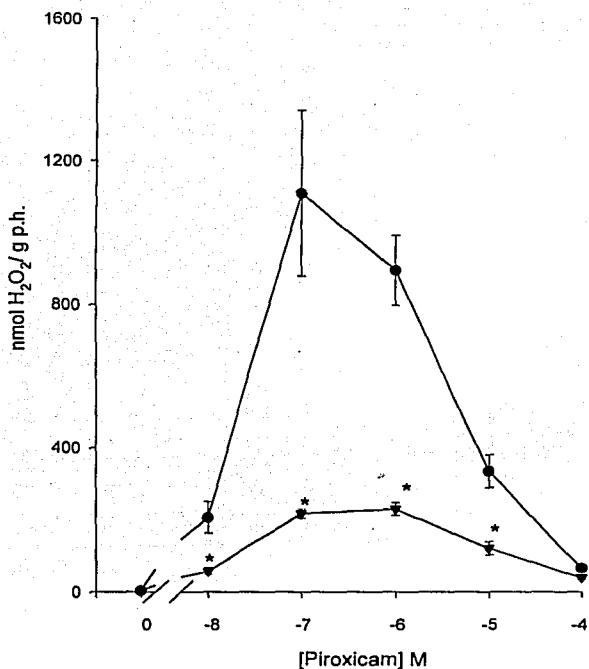


Fig. 32. Formación de peróxido de hidrógeno por adipocitos aislados de rata incubados por 10 min con concentraciones crecientes de piroxicam, en ausencia (●) y en presencia (▼) de dibutiril AMPc 1×10^{-3} M. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones individuales \pm ee * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa al comparar las determinaciones que se hicieron en presencia de dibutiril AMPc vs ausencia de dibutiril AMPc.

Estos experimentos confirman la participación del H_2O_2 en la regulación del proceso lipolítico en adipocitos aislados y plantean la posibilidad de que los NSAID inhiban la lipólisis al elevar la poza de H_2O_2 , mientras que el Dib-AMPC activa a la lipólisis lo cual coincide con una poza más baja de H_2O_2 , lo anterior es cierto cuando menos en el caso del peróxido formado con la participación de los NSAID (Figs. 27 y 28).

Estos experimentos presentan una clara evidencia de que en los adipocitos incubados con NSAID se forma una cantidad suficiente de agua oxigenada para actuar como inhibidor de la lipólisis, y que el Dib-AMPC es capaz de revertir parcialmente esta situación, al disminuir notablemente la concentración de agua oxigenada y sólo permitir una inhibición limitada de la lipólisis.

Por último, se ha pretendido en este trabajo establecer una relación entre la presencia de etanol en el medio de incubación de los adipocitos estimulados con Dib-AMPC y la producción de H_2O_2 . Para ello se incubaron los adipocitos con una cantidad fija de Dib-AMPC en el medio igual a $1 \times 10^{-3} M$ y con concentraciones crecientes de etanol, que van de 12.5 mM hasta 100 mM, con objeto de medir si se formaba peróxido de hidrógeno durante la inhibición de la respuesta lipolítica producida por el etanol (Fig. 16). En las condiciones del ensayo no fue posible detectar la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio de incubación a ninguna de las concentraciones de etanol empleadas. En otra serie de experimentos, en los que se adiciona acetaldehído en lugar de etanol en el medio de incubación de los adipocitos a concentraciones que van de 12.5 μM a 100 μM , la determinación de peróxido de hidrógeno no arrojó valores detectables por el método empleado. Cabe mencionar que en ninguna de estas dos series de experimentos (etanol y acetaldehído) estuvieron presentes los NSAID y que el acetaldehído por sí solo estimula la respuesta lipolítica del Dib-AMPC (Fig. 17).

DISCUSIÓN

En la discusión de esta tesis se pretende analizar de manera integral los datos obtenidos en el laboratorio a mi cargo y que se refieren a la capacidad de los NSAID para modificar los efectos metabólicos y tóxicos consecuentes a una intoxicación aguda con etanol. Por lo tanto, esta discusión incluye los datos publicados en los artículos señalados como antecedentes, y parte de la tesis es mostrar la continuidad del trabajo para transitar, desde el aspecto fenomenológico en el animal íntegro, hacia los cambios moleculares que permitan explicar los efectos reportados inicialmente.

Entre la lista de acciones desencadenadas por una intoxicación aguda con etanol, se escogieron para el estudio inicial en el modelo de rata a tres indicadores hepáticos y uno sanguíneo, a saber: el contenido de TAG, la poza de TBARS y la poza de glutatión total, así como el nivel de etanol en sangre. Las cifras de TBARS y la poza de glutatión son indicadores de un proceso biológico identificado como estrés oxidativo. Se conoce que el etanol eleva los niveles de TBARS (Kalish y Di Luzio, 1966) y disminuye las cifras de glutatión, particularmente el reducido (Videla *et al.*, 1980). Con objeto de modificar la respuesta lipolítica a la intoxicación alcohólica aguda se seleccionaron cuatro anti-inflamatorios no esteroideos que tuvieran diferencias en su vida media farmacológica útil, piroxicam 40 horas vs aspirina 4 h (Insel, 1990) o en la ciclooxigenasa, que inhibieran la isoforma 1 como la aspirina a dosis bajas y no selectivas como el piroxicam, naproxen; o bien selectivas para inhibir a la COX-2, como el nimesulide (Frölich, 1997).

Los resultados iniciales fueron de enorme interés, los cuatro NSAID ensayados disminuyeron los efectos que el etanol, a dosis de 5 g/kg de peso, ocasionó en el hígado: aumento en la poza de TAG, aumento en el contenido de TBARS y disminución del glutatión total (Zentella de Piña *et al.*, 1992 y 1993). Además, con algunos de los NSAID se observó una tendencia a disminuir los valores de etanol en sangre.

Para tratar de explicar la acción de los NSAID en el hígado se usaron hepatocitos aislados y se incubaron en presencia de piroxicam (Saldaña-Balmori *et al.*, 1996 y Riveros-Rosas *et al.*, 1999); el anti-inflamatorio con el que previamente se había demostrado un restablecimiento en los niveles de GSH hepático, los cuales

son abatidos por la intoxicación etílica (Zentella de Piña *et al.*, 1994). Además, el piroxicam es el anti-inflamatorio que baja los niveles de etanol en sangre a la mitad, en comparación con los animales que reciben la misma dosis de etanol en ausencia del NSAID (Zentella de Piña *et al.*, 1992). Los resultados de los trabajos de Saldaña-Balmori *et al.*, (1996) y de Riveros-Rosas *et al.*, (1999) son de primordial relevancia para avanzar en el mecanismo de acción de los NSAID al revertir las acciones del etanol. Por un lado se encontró que el piroxicam activa la oxidación de sustratos oxidables, por otro lado, antagoniza las respuestas metabólicas promovidas por la epinefrina en los hepatocitos aislados y además disminuye el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. A lo largo de la discusión se revisan estos tres aspectos.

La acción del piroxicam al activar la oxidación de diferentes sustratos entre ellos al etanol, puede ser la base molecular que explique la importante disminución del etanol en sangre que se observa en particular con este anti-inflamatorio. Los resultados independientes reportados por Moreno-Sánchez *et al.*, (1999) confirman y apoyan nuestros hallazgos, un grupo de NSAID, entre los que se encuentra el piroxicam, al ser añadidos a mitocondrias aisladas de hígado de rata, estimularon la respiración basal, desacoplaron la fosforilación oxidativa, inhibieron la síntesis de ATP y colapsaron el potencial de membrana. Desde un punto de vista práctico es de interés que un anti-inflamatorio disminuya la concentración de etanol de manera tan importante y que lo haga elevando su oxidación hepática, ya que es precisamente la velocidad de oxidación hepática del propio etanol, el factor limitante para su desaparición en sangre. El poder bajar los niveles sanguíneos de etanol puede disminuir sus efectos en el sistema nervioso central e incluso para evitar la muerte en los individuos severamente intoxicados.

El antagonismo registrado a nivel del hepatocito aislado entre las acciones de la epinefrina y el piroxicam permiten razonar que podría existir un antagonismo similar, a nivel del adipocito, entre los agonistas adrenérgicos y los NSAID. Este antagonismo sería muy relevante al aplicar dosis altas de etanol, suficientes para desencadenar una respuesta adrenérgica (Anton, 1965).

Sin embargo, en el hepatocito aislado incubado en presencia de etanol el piroxicam disminuye la lipoperoxidación, medida como poza de sustancias reactivas

al ácido tiobarbitúrico (Saldaña-Balmori *et al.*, 1996). Por consiguiente, en el resto de la discusión se revisan los efectos de los NSAID oponiéndose a los efectos del etanol en dos estíopes celulares: en el adipocito y en el hepatocito. El trabajo experimental versa sobre las acciones de los anti-inflamatorios en el adipocito aislado; las cuales repercuten sobre lo que sucede en el hepatocito, por lo que, se incluyen nuestros resultados previos obtenidos en hepatocitos aislados y en el animal integro, junto con los datos de la literatura, para proponer un esquema conjunto o integrado de los efectos opuestos del etanol y los NSAID.

Participación de los NSAID en el tejido adiposo

El etanol puede afectar la lipólisis en el tejido adiposo por dos rutas, mismas que se analizan de manera directa o a través de su acción estimulatoria sobre los niveles de catecolaminas.

Los datos que apoyan la consideración anterior los proporciona el trabajo de Horning *et al.*, (1960), quienes observaron que al administrar agonistas β adrenérgicos se estimula la lipólisis. Este hecho está aunado a la observación de Anton (1965) sobre la descarga adrenérgica importante que ocurre al administrar dosis altas de etanol (5 a 7 g de etanol por kilogramo de peso). En relación a la participación de los NSAID como inhibidores de la lipólisis estimulada, uno de los primeros trabajos es el Stone (Stone *et al.*, 1969). El autor estimula la lipólisis en el adipocito aislado de rata con varias hormonas, y ya estimulada, la inhibe con la sal sódica del ácido salicílico, principal producto metabólico de la aspirina. El autor propone como posible explicación que el ácido salicílico puede inhibir la activación de la lipasa que hidroliza a los triglicéridos, vía AMPc, o bien directamente al sistema enzimático de la lipasa.

Las observaciones anotadas prácticamente permanecen sin cambio por varios años. Sin embargo, Vik-Mo y Mjosole (1978) retoman el estudio y miden ácidos grasos y glicerol liberados de tejido adiposo subcutáneo canino y concluye que la re-esterificación total de ácidos grasos no cambia de manera importante pero la cantidad de ácidos grasos re-esterificados, relativos a la cantidad de ácidos grasos liberados, aumentó significativamente en los que recibieron la infusión de salicilato de sodio, aun sin estimular la lipólisis. Los resultados son más evidentes cuando

estímulan la lipólisis con un agonista adrenérgico: la isoprenalina. Se puede concluir que el salicilato de sodio reduce la liberación de ácidos grasos de tejido adiposo mediante un efecto combinado sobre la re-esterificación y la lipólisis.

Efectivamente, se demuestra que la acción estimuladora de la epinefrina sobre la lipólisis en adipocitos aislados de rata disminuye cuando se agrega cualquiera de los cuatro NSAID estudiados: aspirina, naproxen, nimesulide o piroxicam, a concentraciones inclusive por abajo del rango farmacológico reportado. Esta inhibición debe agregarse a la lista creciente de efectos biológicos inhibidos por los NSAID, que bien se sabe no tienen conexión aparente con la activación de la ciclooxigenasa, reportada hasta ahora como el principal mecanismo de acción para estos fármacos (Vane, 1971).

Para explicar el mecanismo por el cual los NSAID inhiben la lipólisis estimulada por hormonas se estudió si a nivel de los receptores membranales, estos fármacos pudieron crear alguna interferencia. La falta absoluta de efecto de los diferentes NSAID sobre la unión del radioligando [H^3] dihidroalprenolol a los receptores de epinefrina de las membranas celulares hepáticas (Tabla II), indican que los NSAID interfieren con la vía lipolítica hormona-estimulada en un nivel posterior. Para encontrar el probable sitio afectado, se diseñaron experimentos en los cuales se estimuló la lipólisis directamente con un análogo del AMPc, el dibutilil AMPc, y se observó que los NSAID interfieren en la vía adrenérgica ya sea a nivel de la proteína cinasa A dependiente de AMPc, o bien en la cadena de amplificación resultante (Fig. 34).

La acción antilipolítica de los NSAID permite relacionarlos con hormonas y con otros agentes que tienen en común ejercer el mencionado efecto antilipolítico en adipocitos. Cabe anotar, en primer lugar a la insulina, cuyo efecto ha sido relacionado con la producción de agua oxigenada, la cual mimetiza en buena parte la acción de la insulina, de los agentes sulfhidrilos: el ditiotreitol y el p-cloromenbenzoato (Mukherjee *et al.*, 1978). Otros autores (Muchmore *et al.*, 1982) postulan que el agua oxigenada es la mediadora de la acción antilipolítica de la insulina y que existe una relación inversa entre el agua oxigenada y la lipólisis. Incluso en una publicación reciente (Gaudiot *et al.*, 2000) se demuestra que el agua oxigenada inhibe la actividad de la proteína cinasa A en adipocitos, por lo que parece

muy probable que los NSAID inhiban la lipólisis mediante una disminución en la actividad de la proteína cinasa A mediada por el H_2O_2 . El conocimiento de estos hallazgos permitió el planteamiento de ensayos conducentes a valorar el papel de los NSAID en el metabolismo peroxidativo, midiendo directamente la producción de agua oxigenada durante la estimulación de la lipólisis con dosis crecientes de AMPc, en presencia y ausencia de los agentes inflamatorios motivo de este estudio. En primer lugar se observa que la adición de agua oxigenada a concentración 1 mM (que viene a ser 750 μ M según curva patrón realizado en una solución Ringer Krebs-albúmina, ya que la albúmina fija parte de la H_2O_2 adicionada), inhibe la liberación de glicerol medido como índice de lipólisis estimulada con AMPc (Fig. 23). En este sistema, la sola adición de catalasa evita la inhibición de la lipólisis observada con los NSAID (Fig. 25). Un apoyo importante en este esquema es el hecho de que la adición de cualquiera de los cuatro NSAID eleva la producción de agua oxigenada (Figs. 29 a 32). Cabe comentar que, si bien el pico máximo de producción de agua oxigenada ocurre en los primeros 10 min y la máxima inhibición de la lipólisis por NSAID fue medida a los 30 min, no se invalida la relación directa que existe entre la concentración de NSAID y la producción de agua oxigenada.

A continuación se plantean posibilidades sobre el origen y significado del aumento en H_2O_2 promovido por los NSAID en los adipocitos aislados. El origen más probable del H_2O_2 en los adipocitos es la activación de una NADPH (NADH) oxidasa, probablemente de la membrana celular del tipo de la descrita y caracterizada por Krieger-Brauer, regulable por hormonas y citocinas (Krieger-Brauer *et al.*, 2000).

Tal vez de mayor relevancia sea el significado en el aumento del H_2O_2 por los NSAID. Dos comentarios al respecto. Se ha descrito que los NSAID tienen un efecto hipoglucemiante del tipo de la insulina (Carlson y Ostman, 1961). Ambos, insulina y NSAID producen H_2O_2 y el H_2O_2 mimetiza los efectos de la insulina (Czech *et al.*, 1974). Parece obvio que la similitud de acciones de ambos compuestos dependan precisamente del H_2O_2 que generan. Por otra parte, el efecto molecular más conocido de los NSAID es su acción inhibitoria sobre las ciclooxigenasas lo que le valió a su descubridor (Vane 1971) el haber recibido el Premio Nobel. Actualmente se sabe que peróxidos del tipo del H_2O_2 son cofactores esenciales para la reacción catalizada por la ciclooxigenasa y así son potentes estímulos para la producción

tisular de prostaglandinas (Wolin y Mohazzab, 1997). Se abre la posibilidad de que la inhibición de los NSAID sobre la ciclooxigenasa no sea directa sino mediada por una elevación celular de la poza de H_2O_2 . Respecto a las nuevas acciones que han sido reportadas para los NSAID (Zentella de Piña *et al.*, 2000) se abre la posibilidad de que el mediador de los numerosos efectos descritos sea al menos en algunos casos, el agua oxigenada.

En concreto: los NSAID al inhibir la lipólisis estimulada por epinefrina impiden el arribo de cantidades importantes de ácidos grasos no esterificados al hígado, una de las acciones tóxicas del etanol a través de su estimulación adrenérgica (compárese Fig. 33 con Fig. 34).

Relevancia del aporte de ácidos grasos en el estrés oxidativo hepático causado por el etanol

Existen varios reportes de diferentes grupos de investigadores en los cuales se hace aparente la contribución sobresaliente de los ácidos grasos que recibe el hígado para conformar el cuadro completo de patología hepática consecuente a una intoxicación con etanol, si bien, en ocasiones, el modelo es de intoxicación crónica. Desde luego, los datos experimentales presentados en esta tesis apuntan en el mismo sentido, en este caso, a una intoxicación aguda.

La proporción de grasa en la dieta recomendada para la rata no rebasa el 10% del total de calorías (Rocha-Hernández, 1996). Los experimentos en los cuales se trata de obtener modificaciones moleculares de patología hepática incluyen el siguiente diseño: 6 a 8 semanas de duración y dieta diaria de tipo normoproteico, con 37% de calorías totales en forma de etanol y 37% de calorías totales en forma de grasa (French *et al.*, 1986); Nanji 1989; Kono *et al.*, 2000b y Nanji *et al.*, 2001). Si el contenido de grasa disminuye, también disminuyen las lesiones hepáticas (French *et al.*, 1986) y por otra parte el tipo de grasa proporcionada en la dieta es fundamental para definir las modificaciones moleculares de patología hepática. Cuando los ácidos grasos de la dieta son insaturados las lesiones hepáticas son mayores en comparación con los casos en los que se prepararon las dietas con ácidos grasos de cadena media y saturados (Kono *et al.*, 2000b). Incluso, en otros experimentos se

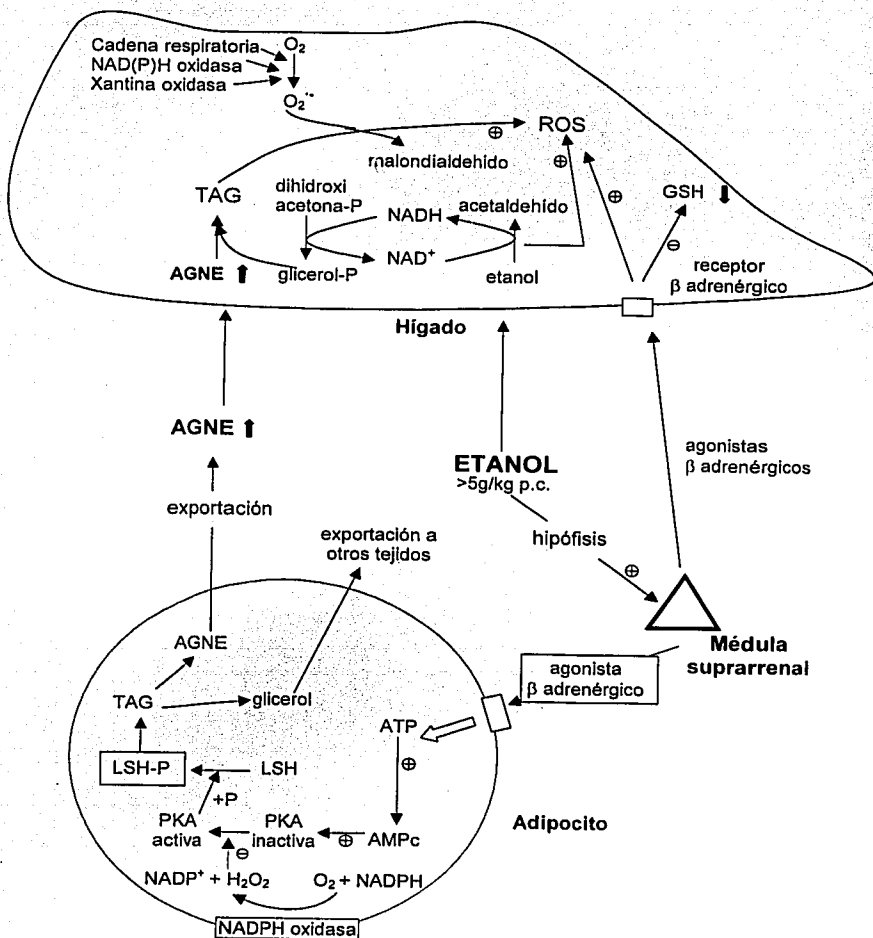


Fig. 33. Resumen de los sitios del metabolismo afectados por la ingesta aguda de etanol que se revisan en esta tesis.

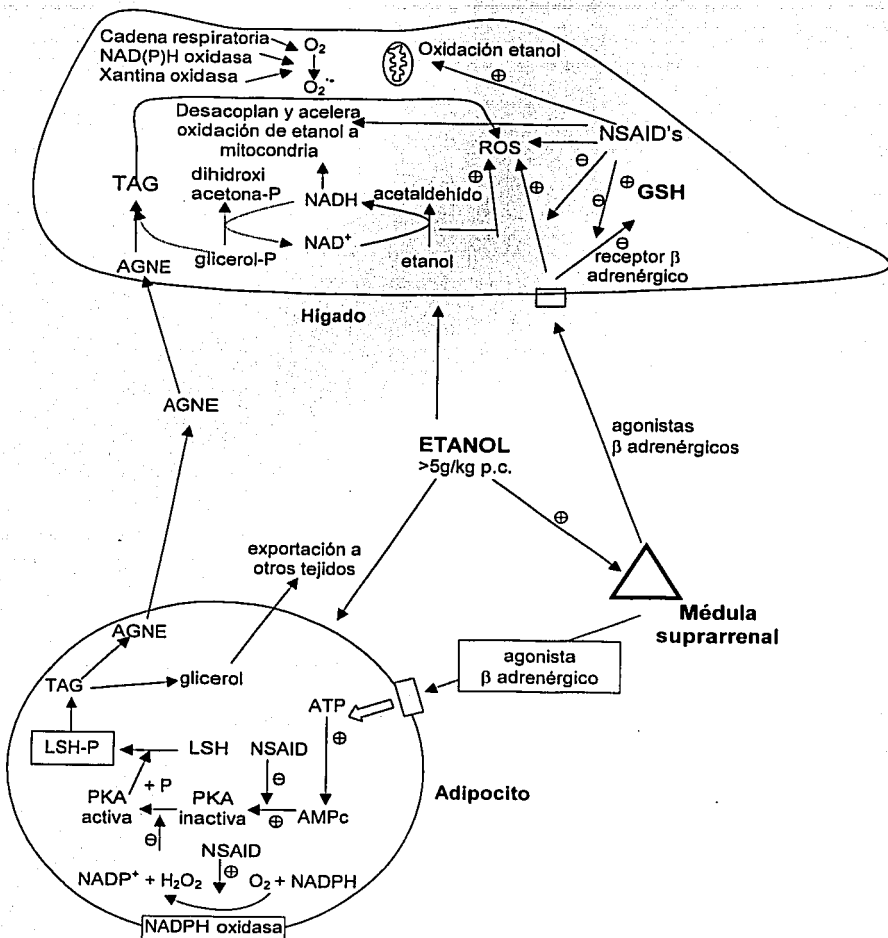


Fig. 34. Sitios de acción de los NSAID sobre el metabolismo afectado por la ingesta aguda de etanol que se revisan en esta tesis.

describe que las lesiones hepáticas llegan a ser reversibles si se sustituyen en la dieta a los ácidos grasos de cadena media y saturados, no obstante que se continúe la administración cotidiana de etanol (Nanji *et al.*, 2001).

El experimento resumido en la Fig. 10 es muy ilustrativo. Los ácidos grasos inyectados subcutáneamente se movilizan hacia el hígado en función directa a la cantidad de triacilglicéridos inyectados, e independiente de la participación de hormonas u otros sistemas de regulación (Terrazos-Luch *et al.*, 1997). En tales condiciones se obtuvo una altísima correlación directa entre la cantidad de aceite de maíz colocado subcutáneamente, y el nivel de peroxidación de lípidos medido en el hígado (Fig. 10, tomada de Terrazos-Luch *et al.*, 1997). O sea, el hígado en condiciones fisiológicas recibe un aporte definido de ácidos grasos y manifiesta niveles bajos de lipoperoxidación, cuando ese hígado es forzado a recibir un exceso de ácidos grasos, una fracción de ellos son lipoperoxidados de manera proporcional a la cantidad extra de ácidos grasos recibidos y de acuerdo con su grado de insaturación.

Una parte de los resultados experimentales de esta tesis demuestran la inhibición de la lipólisis en los adipocitos mediada por los NSAID; lipólisis que a su vez es promovida por el etanol a través de la liberación de catecolaminas; el efecto se mantiene *in vitro* en presencia de concentraciones de acetaldehído y etanol en el intervalo de concentraciones presentes en la sangre, y presumiblemente en los tejidos, de animales intoxicados con concentraciones de etanol similares a las empleadas en esta tesis (Caballero-Cruz, 1998). Los NSAID, administrados en animales intoxicados con altas dosis de etanol, simultáneamente a producir una inhibición de la lipólisis en los adipocitos, disminuyen la poza hepática de TAG (Zentella de Piña *et al.*, 1993) por lo que una de las grandes conclusiones de esta tesis es que esa disminución en la poza hepática de TAG obedece a la inhibición de la lipólisis, precisamente cuando dicha lipólisis es el resultado de una estimulación por epinefrina (Anton, 1965). Continuando con la línea de pensamiento planteada en esta sección, la menor cantidad de ácidos grasos recibida por el hígado de las ratas tratadas con etanol y uno de los NSAID, es una de las causas importantes por la cual es menor la poza de TBARS en esos hígados (Zentella de Piña *et al.*, 1993). Además, puede añadirse que al disminuir la poza de TBARS por los NSAID, a pesar

de las altas dosis de etanol empleadas para lograr la intoxicación, no sucede la reacción en cadena promovida por la lipoperoxidación, existen menos radicales libres y no se invierte o gasta tanto GSH con la finalidad de mantener las células hepáticas con bajos niveles de estrés oxidativo, tal como sucede en los animales intoxicados con etanol pero en ausencia de NSAID (Videla *et al.*, 1980). Así se observa que cuando menos el piroxicam impide que disminuyan los niveles de GSH hepático en ratas intoxicadas con etanol (Zentella de Piña *et al.*, 1994).

Acciones opuesta del etanol y los NSAID en el hepatocito

En los animales intoxicados con etanol, la administración de cuando menos uno de los NSAID, el piroxicam, además de afectar la distribución y la lipoperoxidación de los ácidos grasos, tal como se detalló en el párrafo anterior, también tiene un efecto sobre los hepatocitos, según se concluye de los trabajos de Saldaña-Balmori *et al.*, (1996), en donde se reporta que el piroxicam modifica los efectos del etanol medibles en hepatocitos aislados. Este es el tópico que se revisa a continuación y que desde luego se suma a lo ya dicho en cuanto a la redistribución de ácidos grasos, si además del etanol se administra un NSAID.

En el trabajo de Kono *et al.*, (2000a) se resume la secuencia de eventos que ocurren para lograr lo que se ha llamado las "lesiones hepáticas tempranas promovidas por el etanol". En esa secuencia, el etanol administrado crónicamente por vía oral modifica la permeabilidad de las células intestinales y así se introducen endotoxinas del tubo digestivo con lo que se activan las células de Kupffer las cuales responden de manera similar a lo que ocurre en el proceso inflamatorio, que no puede olvidarse de acuerdo con el diseño experimental (brevemente resumido en la introducción), se encuentra inmerso en altas concentraciones de etanol y de ácidos grasos (35.5% y 37% de las calorías totales, respectivamente). En ese conjunto de condiciones las células de Kupffer liberan NF-kB y TNF- α así como especies de oxígeno reactivas en forma de radical superóxido. Es significativo el hecho de que el $O_2^{\bullet -}$ generado en exceso proviene de la estimulación en la actividad de la NADPH oxidasa de las propias células de Kupffer (Kono *et al.*, 2000a). En el modelo aquí resumido es determinante la participación de las células de Kupffer, al grado de que la inactivación de dichas células con $GdCl_3$ previene las siguientes acciones del

etanol en el hígado: lesión hepática (Adechí *et al.*, 1994), hipoxia (Arteel *et al.*, 1996) y formación de radicales libres (Knecht *et al.*, 1995).

Continuando con el modelo, se establece que ambos factores y el $O_2^{\bullet -}$ llegan al hepatocito, en donde se está oxidando activamente el etanol, y en donde favorecen el mantenimiento de un estado de estrés oxidativo mayor, a medida que el mismo hepatocito esté recibiendo mayor proporción de ácidos grasos con insaturaciones.

Los NSAID pueden contrarrestar el estrés oxidativo propiciado por el etanol actuando a diferentes niveles y la suma de las acciones pueden corresponder a la disminución de las TBARS, observado en hepatocitos aislados e incubados con etanol y piroxicam (Saldaña-Balmori *et al.*, 1996), así como al restablecimiento de los niveles de GSH cuando a la intoxicación con etanol se añade el tratamiento con el mismo piroxicam (Zentella de Piña *et al.*, 1994).

Como atrapadores de radicales libres los NSAID pueden abatir directamente la poza de $O_2^{\bullet -}$ ocasionada por el etanol, así se ha demostrado para los salicilatos (Sagone y Husney, 1987) y para el piroxicam (Castrejón *et al.*, 1996 y 1997) en sistemas completamente libres de células.

CONCLUSIONES

La acción de los NSAID en cuando menos tres tipos de estirpes celulares contribuyen simultáneamente y coordinadamente para revertir algunos efectos de la intoxicación aguda con etanol (5 g/kg p c). Los NSAID:

1. Disminuyen los niveles de etanol en sangre al promover la oxidación hepática del propio etanol mediante un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.
2. Inhiben en los adipocitos la lipólisis mediada por la epinefrina, liberada a consecuencia de la elevada carga de etanol. La inhibición de la lipólisis disminuye la recepción de ácidos grasos en el hígado, con lo que a pesar de la presencia de etanol, limita el crecimiento en la poza de triacilglicéridos en el hígado, lo cual abate la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico así como el consumo elevado de glutatión.
3. Disminuyen la presencia de sustancias del oxígeno reactivas, generadas en las células de Kupffer al ser activadas por la presencia de etanol. De esta otra manera se restringe la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en la glándula hepática en general.

Por todas las acciones de los NSAID, resumidas en los tres incisos anteriores, se concluye que son los medicamentos de elección para revertir las acciones tóxicas agudas de elevadas dosis de etanol.

El etanol y los NSAID son las drogas (en estricto sentido farmacológico) más consumidas por los humanos. En esta tesis además de que se aportan nuevos conocimientos de interacción entre ambos xenobióticos, se profundiza sobre el mecanismo de acción de los NSAID. Los datos del trabajo amplían la información disponible al respecto y sobre el probable empleo simultáneo de ambos en la intoxicación aguda con etanol y el uso farmacológico de NSAID. Sin embargo, el uso crónico de ambos compuestos podría ofrecer un cuadro diferente en el cual participan otros tejidos y otros sistemas regulatorios tales como el control de la expresión genética. Considero importante acrecentar el conocimiento de la interacción entre etanol y NSAID para lograr entender mejor las ventajas y riesgos del empleo de los NSAID en los pacientes alcohólicos.

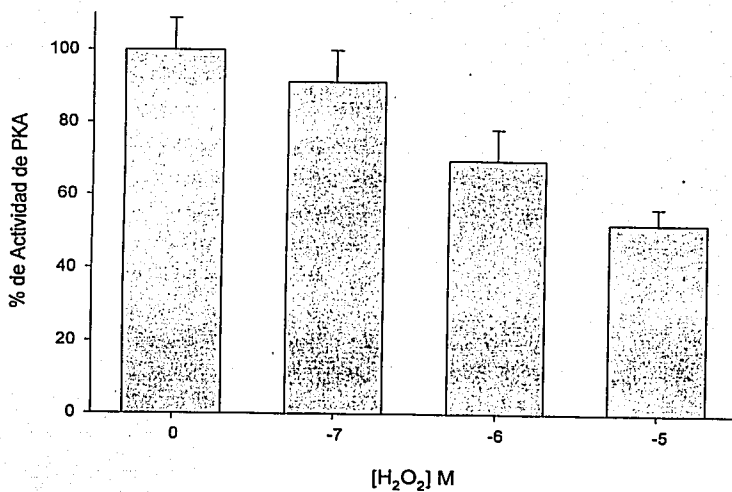
PROSPECTIVA

Como sucede con frecuencia al ampliar los horizontes por medio de la investigación científica, es mucho más lo que falta por hacer que lo ya realizado.

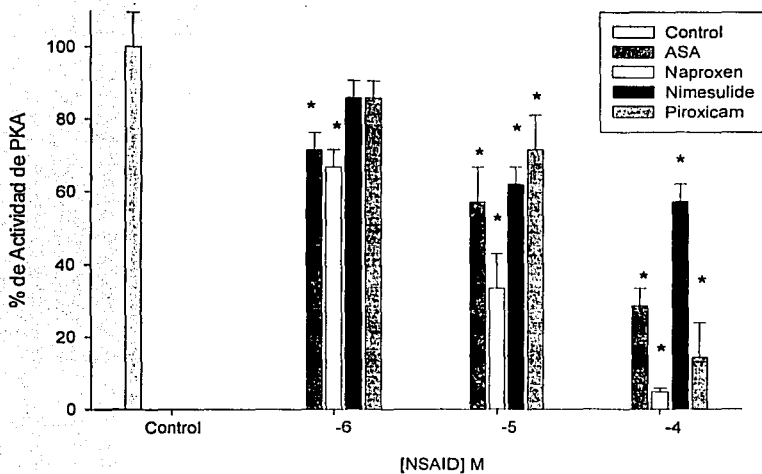
En el aspecto molecular, la elevación en la poza de peróxido de hidrógeno por acción de los NSAID merece un estudio detallado. Pareciera conveniente revisar la actividad de la NADPH oxidasa de membrana de adipocitos, la cual en experimentos recientes parece ser el sistema importante que define la velocidad de síntesis del peróxido de hidrógeno. Queda por definir también el significado biológico del aumento de peróxido de hidrógeno tanto en el adipocito como en otros tipos celulares. Por lo pronto, el H_2O_2 inhibe la proteína cinasa A purificada a partir de corazón de bovino (Fig. P-1). Incluso sería conveniente aclarar la participación del peróxido de hidrógeno en la regulación de la actividad de las ciclooxigenasas, la etapa metabólica considerada desde hace más de 30 años como la clave para entender la acción farmacológica de la aspirina y todas las "aspirin-like drugs".

Por otra parte, resulta atractivo el análisis de la acción de los NSAID sobre la actividad de la proteína cinasa A, la enzima que resulta activada por la presencia del AMPc, e inhibida probablemente por el H_2O_2 tal como se menciona en las líneas anteriores, y que es la que cataliza con el concurso del ATP la fosforilación de un buen número de enzimas, las cuales al ser fosforiladas pueden ser activadas, o por el contrario, inactivadas, dependiendo del tipo de reacción que cataliza y del tejido donde se ubican. Los experimentos preliminares realizados nos muestran una inhibición de la proteína cinasa A, con dosis ligeramente superiores a las farmacológicas, con los 4 NSAID escogidos (Fig. P-2). Una inhibición de la enzima en cuestión por los NSAID tendría enorme repercusión en la regulación metabólica de las células afectadas.

En el área clínica resulta muy atractivo el proponer un estudio para evaluar la eficacia de los anti-inflamatorios con objeto de revertir, desde el punto de vista clínico y del comportamiento humano, las acciones de una intoxicación aguda con etanol.



P1. Inhibición de la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc, de corazón de bovino por H₂O₂. Promedio ± desviación estándar, n = 3, p < 0.05 vs control.



P2. Inhibición de la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc de corazón de bovino por los NSAID. Promedio \pm desviación estándar, $n = 3$, * $p < 0.05$ vs control.

REFERENCIAS

- Abramson, S.B. and Weissmann, G. (1989). The mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis and Rheumatism** **32**: 1-9.
- Abramson, S., Korchak, H., Ludwig, R., Edelson, H., Haines, K., Levin, R.I., Herman, R., Rider, L., Kimmel, S. and Weissman, G. (1985). Modes of action of aspirin-like drugs. **Proc Natl Acad Sci USA** **82**: 7227-7231.
- Adachi, Y., Bradford, B.U., Gao, W., Bojes, H.K. and Thurman, R.G. (1994). Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. **Hepatology** **20**: 453-460.
- Anton, A.H. (1965). Ethanol and urinary catecholamines in man. **Clin Pharmacol Therap** **6**: 462-469.
- Arteel, G.E., Raleigh, J.A., Bradford, B.U. and Thurman, R.G. (1996). Acute alcohol produces hypoxia directly in rat liver tissue *in vivo*: role of Kupffer cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** **271**: G494-G500.
- Barber, A.A. and Berhein, F. (1967). Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. **Adv Gerontol Res** **2**: 355-403.
- Beebe, S.J., Redmon, J.B., Blackmore, P.F. and Corbin, J.D. (1985). Discriminative insulin antagonism of stimulatory effects of various camp analogs on adipocyte lipolysis and hepatocyte glycogenolysis. **Biol Chem** **260**: 15781-15788.
- Bilodeau, J. F., Wang, M., Chung, F.L. and Castonguay, A. (1995). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative pathways in AJ Mice. **Free Rad Biol & Med** **18**: 47-54.
- Bizzi, A. and Carlson, L.A. (1965). Stimulatory effect on glycerol release from rat adipose tissue *in vitro*. **Life Sci** **4**: 2123-2128.
- Bondy, S.C. and Pearson, K.R. (1993). Ethanol induced oxidative stress and metabolic status. **Alcoholism Clin Exp Res** **17**: 1651-1655.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** **72**: 248-254.
- Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M. and Avery, G.S. (1984). Piroxicam. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy. **Drugs** **28**: 292-323.

- Caballero-Cruz, Ivonne (1998). Modificaciones de los niveles de etanol y acetaldehído en sangre de ratas tratadas con agentes anti-inflamatorios no esteroideos. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carlson, L.A. and Östman, J. (1961). Effect of salicylates on plasma-free fatty acid in normal and diabetic subjects. **Metabolism** **10**: 781-787.
- Castrejón, S.M., Boldú, O.J.L., Muñoz, P.E., Zentella, de P. M., Piña, G.E. and Gleason, V.R. (1996). Spin-trapping studies on the effects of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID'S) on hydroxyl and hydroxyethyl free radicals *in vitro*. **Res Comm in Pharmacol Toxicol** **1**: 289-299.
- Castrejón, S.M., Zentella, de P. M., Piña, G.E., Boldú, O.J.L., Muñoz, P.E. and Gleason, V.R. (1997). Effects of piroxicam on two *in vitro* free radical production systems (phenylhydrazine autooxidation and fenton reaction) **Res Comm in Pharmacol Toxicol** **2**: 261-267.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev** **59**: 527-605.
- Dawson, A.G. (1979). Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells. **Trends Biochem Sci** **4**: 171-176.
- Donohue, T.M., Tuma, D.J. and Sorrell, M.F. (1983). Acetaldehyde adducts with proteins: binding of C¹⁴ acetaldehyde to serum albumin. **Arch Biochem Biophys** **220**: 239-246.
- Fernández-Checa, J.C., García-Ruiz, C. Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1991). Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies *in vitro* and *in vivo* and susceptibility to oxidant stress. **J Clin Invest** **87**: 397-405.
- Fernández-Checa, J.C., Hirano, T., Tsukamoto, H. and Kaplowitz, N. (1993). Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. **Alcohol** **10**: 469-475.
- Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N. García-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E. and Morales A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. **Am J Physiol** **273**: G7-G17.

- French, S.W., Miyamoto, K., Tsukamoto, H. (1986). Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. **Alcohol Clin Exp Res** **10** (6 Suppl): 13S-19S.
- Frölich, J.C. (1997). A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. **Trends Pharmacol Sci** **18**: 30-34.
- García-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Kaplowitz, N. and Fernández-Checa, J.C. (1995). Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. **Mol Pharmacol** **48**: 825-834.
- Gaudiot, N., Ribiere, C., Jaubert, A.M. and Giudicelli, Y. (2000). Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. **Am J Physiol** **279**: C1603-C1610.
- Giudicelli, Y., Brulle, D. and Nordmann, R. (1978). Influence of acetaldehyde on stimulated lipolysis and cyclic AMP formation in isolated rat fat cells. Comparison with ethanol. **Biochem Pharmacol** **27**: 2559-2561
- Giudicelli, Y., Nordmann, J. and Nordmann, R. (1972 a) Action de l'acétaldéhyde sur la lipolyse *in vitro*. Comparaison avec l'éthanol et l'acétate. **C.R. Acad Sci Paris** **274**: 2246-2248.
- Giudicelli, Y., Nordmann, J. and Nordmann, R. (1972 b) Metabolic effects of acetaldehyde on rat adipose tissue *in vitro*. **Biochim Biophys Acta** **280**: 393-407.
- Graham, M.T., Taketomi, S. and Fummo, K. (1975). Metabolic studies on the development of ethanol induced fatty liver in K KA4 mice. **J Nutr** **105**: 1500-1508.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanisms. **Biochem Pharmacol** **49**: 1341-1348.
- Honnor, R.C., Dhillon, G.R. and Londos, C. (1985). cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. **J Biol Chem** **260**: 15122-15129.
- Horning, M.G., Williams, E.A., Mailing, H.M. and Brodie, B. (1960). Depot fat as a source of increased liver triglycerides after ethanol. **Biochem Biophys Res Commun** **3**: 635-640.

- Ingelman-Sundberg M., Jörnvall, H. (1984). Induction of the ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450 by inhibitors of alcohol deshydrogenase. **Biochem Biophys Res Com** **124**: 375-382.
- Insel, P.A. (1990). Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout. In Goodman and Gilman. **The Pharmacological Basis of Therapeutics** (Ed. Pergamon Press. New York. USA. 638-651.
- Jackson, S.H., Gallin, J.L. and Holland, S.M. (1995). The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. **J Exp Med** **182**:751-758.
- Kalish, G.H. and Di Luzio, N.R. (1966). Peroxidation of liver lipids in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. **Science** **152**: 1390-1392.
- Kiessling, K.H. and Tobe, U. (1964). Degeneration of liver mitochondria in rats after prolonged alcohol consumption. **Exp Cell Res** **33**: 350-354.
- Knecht, K.T., Adachi, Y., Bradford, B.U., Iimuro, Y., Kadiiska, M., Qun-hui, X. and Thurman, R.G. (1995). Free radical adducts in the bile of rats treated chronically with intragastric alcohol: inhibition by destruction of Kupffer cells. **Mol Pharmacol** **47**: 1028-1034.
- Kono, H., Rusyn, I., Yin, M., Gabele, E., Yamashina, S., Dikalova, A., Kadiiska, M.B., Connor, H.D. Mason, R.P., Segal, B.H., Bradford, B.U., Holland, S.M. and Thurman, R.G. (2000a). NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. **J Clin Invest** **106**: 867-872.
- Kono, H., Enomoto, N., Connor, H.D., Wheeler, M.D., Bradford, B.U., Rivera, C.A., Kadiiska, M.B., Mason, R.P., and Thurman, R.G. (2000b). Medium-chain triglycerides inhibit free radical formation and TNF- α production in rats given enteral ethanol. **Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol** **278**: G467-G-476.
- Krebs, H.A. (1968). The effects of ethanol on the metabolic activities of the liver. **Adv Enzym Regul** **6**: 467-480.
- Krebs, H.A. (1973). Pyridin nucleotides and rate control. **Symp Soc Exp Biol** **27**: 299-318.

- Krieger-Brauer, H.I., Medda, P.K., Sattel, B. and Kather, H. (2000). Inhibitory effect of isoproterenol on NADPH-dependent H_2O_2 generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by $\beta\gamma$ -subunits derive from G_s . **J Biol Chem** **275**: 2486-2490.
- Lafontan, M. and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **J Lipid Res** **34**: 1057-1091.
- Langman, M.J. (1988). Ulcer complications and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am J Med** **84**: 15-19.
- Lewis, A.J. and Furst, D.W. (eds). Nonsteroidal antiinflammatory drugs. Mechanism and clinical use. Marcel Dekker, New York, 1987.
- Lieber, C.S. and Spritz, N. (1966). Effects of prolonged ethanol intake in man: Role of dietary, adipose, and endogenously synthesized fatty acids in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. **J Clin Invest** **45**: 1400-1412.
- Martensson, J., Lai, C.K. and Meister, A. (1990). High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. **Proc Natl Acad Sci USA** **87**: 7185-7189.
- Mendenhall, C.H.L. (1987). Alcoholic hepatitis in: Schiff L and Schiff E. (eds): Diseases of the liver. **Lippencott J B Philadelphia Sixth edition**. 669-681.
- Moreno-Sánchez, R., Bravo, C., Vazquez, C., Ayala, G., Silveira, L.H. and Martínez-Lavin, M. (1999). Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. **Biochem Pharmacol** **57**: 743-752.
- Muchmore D.B., Little, S.A., and Hoër, C. (1982). Counterregulatory control of intracellular hydrogen peroxide production by insulin and lipolytic hormones in isolated rat epididymal fat cells: A role of free fatty acids. **Biochemistry** **21**: 3886-3892.
- Mukherjee, S.P., and Lynn, W.S. (1977). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in adipocyte plasma membrane and its activation by insuline. **Arch Biochem Biophys** **185**: 69-76.
- Mukherjee, S.P., Lane, R.H., and Lynn, W.S. (1978). Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulphydryl reagents. **Biochem Pharmacol** **27**: 2589-2594.

- Nanji, A.A., Mendenhall, C.L. and French, S.W. (1989) Beef fat prevents alcoholic liver disease in the rat. **Alcohol Clin Exp Res** **13**: 15-19.
- Nanji, A.A., Jokelainen, K., Tipoe, G.L., Rahemtulla, A., Dannenberg, A.J. (2001). Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. **J Pharmacol Exp Ther** **299**: 638-644.
- Neville, D.M. Jr. (1968). Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. **Biochim Biophys Acta** **154**: 540-552.
- Nikkila, E.A. and Ojala, K. (1976). Role of hepatic L. α glycerophosphate and triglyceride synthesis in production of fatty liver by ethanol **Proc Exp Biol Med** **113**: 814-
- Nilsson, N.O. and Belfrage, P. (1978). Effects of acetate, acetaldehyde and ethanol on lipolysis in isolated rat hepatocytes. **J Lipid Res** **19**:737-741.
- Olivecrona, T., Hernell, O., Jonson, O., Fex, G., Wallinder, L., and Sandgren, O. (1972). Effect of ethanol on some enzymes inducible by free refeeding **Q J Stud Alcohol** **33**: 1-13.
- Patel, L., Abate, C., Curran, T. (1990). Altered protein conformation on DNA binding by Fos and Jun. **Nature** **347**: 572-575.
- Reboucas, G., Isselbacher V. (1961). Studies on pathogenesis of ethanol induced fatty liver synthesis and oxidation of fatty acids by liver. **J Clin Invest** **40**: 1355-
- Reitz, R.C. (1979). Effect of ethanol ingestion on lipid metabolism. **Prog Lipid Res** **18**: 87-115.
- Reyes-Salcido, V., Villalobos-Molina, R. (1999). Patterns of adrenoreceptor change during liver regeneration of Wistar Kyoto rat: a binding study. **Arch Med Res** **30**: 89-92.
- Riveros-Rosas, H., Zentella de Piña, M., Guinzberg, R., Saldaña-Balmori, Y., Julián-Sánchez, A., Saavera-Molina, A. y Piña, E. (1999). Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam in isolated rat hepatocytes. **Eur J Pharmacol** **380**: 49-59.

- Rocha-Hernández, Alma Eugenia (1996). Efecto del nivel de los lípidos dietéticos sobre la relación glutatión reducido-glutatión oxidado (GSH/GSSG) hepático y sanguíneo en las ratas intoxicadas en forma aguda con etanol. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias: Bioquímica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodbell, M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. **J Biol Chem** **229**: 375-380.
- Rossiter, P., Slater, T.F. (1973). The effects of antioxidants on the concentrations of reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide and of triglyceride in rat liver after the ethanol administration of ethanol. **Biochem Soc Trans** **1**: 933-938.
- Runkel, R., Chaplin, M., Boost, G., Segre, E. and Forchielli, E. (1972). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of naproxen in various laboratory animals and human subjects. **Chem Pharm Bull** **61**: 703-716.
- Sagone, A.L. and 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-Hernández, A. y Piña, E. (1996). Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes **Eur J Pharmacol** **317**: 225-229.
- Scheig, R. and Isselbacher, K.H.J. (1965). Pathogenesis of ethanol-induced fatty liver: III. In vivo and in vitro effects of ethanol on hepatic fatty acid metabolism in rat. **J Lipid Res** **6**:269-27.
- Schuckit, M.A. and Irwin, M. (1988). Diagnosis of alcoholism. **Med Clin N Am** **72**: 1133-1153.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. and Ames, B.N. (1990). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proc Natl Acad Sci USA** **91**: 10771-10778.
- Slater, T.F., Sawyer, B.C. and Straüli, U.D. (1964). Changer in liver nucleotide concentration in experimental liver injury. II acute ethanol poisoning. **Biochem J** **93**: 267-270.
- Stone, D.B., Brown, J.D. and Steele, A.A. (1969) Effect of sodium salicylate on induced lipolysis in isolated fat cells of the rat. **Metabolism** **18**: 620-624.

- Stryer, L. (1995). Metabolismo de los ácidos grasos. en: **Bioquímica**. Editorial Reverté. Bilbao, España. 604-628.
- Terrazos-Luch, J., Corona-García, S., Zentella de Piña M., Ramírez-González, M.D. and Piña, E. (1997). **Proc West Pharmacol Soc** **40**: 97-99.
- Thurman, R.G., Ley, H.G. and Scholz, R. (1972). Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. **Eur J Biochem** **25**: 420-430.
- Todd, P.A. and Clissold, S.P. (1990). Naproxen. A Reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states. **Drugs** **40**: 91-137.
- Turrens, J.F. and Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J** **191**: 421-427.
- Turrens, J.F., Alexandre, A. and Lehninger, L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys** **237**: 408-411.
- Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature** **231**: 232-235.
- Videla, L.A., Fernandez, V., Ugarte, G. and Valenzuela, A. (1980). Effect of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. **FEBS Letters** **111**: 6-9.
- Vik-Mo, H., and Mjosole, D. (1978). Mechanism for inhibition of free fatty acid mobilization by nicotinic acid and sodium salicylate in canine subcutaneous adipose tissue in situ. **Scand J Clin Lab Invest** **38**: 209-216.
- Warnick, G.R. (1986). Enzymatic methods for quantification of lipoprotein lipids. **Methods Enzymol** **129**: 101-123.
- Williams, G.D., Grant B.F., Stitson, F.S., Zobeck, T.S., Aitken S.S. and Noble, J. (1988). Trends in alcohol-related morbidity and mortality. **Public Health Rep** **103**: 592-597.
- Windholz, M. (1983). **The Merck-Index**. Décima edición. Merck & Co. Rahway, U.S.A.

- Wolln, M.S. and Mohazzab-H, K.M. (1997). Mediation of signal transduction by oxidants. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defenses. **Cold Spring Harbor Laboratory Press** pp. 21-48.
- Zentella de Piña, M., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., Riveros-Rosas, H., Piña, E. (1989). Effects of moderate chronic ethanol consumption on rat liver mitochondrial functions. **Alcohol** 6: 3-7.
- Zentella de Piña, M., Díaz Belmont, A., Rodríguez Lizárraga, M. y Piña, E. (1991). Importance of age upon the increase in HDL₂- Cholesterol in the Alcoholic. **Arch. Invest Med Mex** 22:323-327.
- Zentella de Piña, M., Hernández-Tobías, A., Saldaña-Balmori, Y., Díaz-Belmont, A. and Piña, E. (1992). Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. **FEBS Lett** 298: 1923-1925.
- Zentella de Piña, M., Saldaña-Balmori, Y., Hernández-Tobías, A. and Piña, E. (1993). Non-steroidal anti-inflammatory drugs lower ethanol mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. **Alcoholism Clin Exp Res** 17: 1228-1232.
- Zentella de Piña, M., Corona, S., Rocha-Hernández, A.E., Saldaña-Balmori, Y., Cabrera, G. and Piña, E. (1994). Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication, **Life Sciences** 54: 1433-1439.
- Zentella de Piña, M., Pimentel Velazquez, L., Vázquez Meza, H., Piña Zentella, G. y Riveros Rosas, H. (2000). Nuevas acciones de los antiinflamatorios no esteroideos. **Bol Educ Bioq** 19: 174-181.
- Zentella de Piña, M., Vázquez-Meza, H., Piña-Zentella, G., Pimentel, L., and Piña, E. (2002). Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine-and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes. **J Pharmacy Pharmacol** 54: 577-582.

ANEXOS:

1. Marta Zentella de Piña, Aida Hernández-Tobías, Yolanda Saldaña-Balmori, Armando Díaz-Belmont, and Enrique Piña (1992). Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. **FEBS Lett** **298**: 123-125.
2. Martha Zentella de Piña, Yolanda Saldaña-Balmori, Aida Hernández-Tobías, and Enrique Piña (1993). Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. **Alcoholism Clin Exp Res** **17**: 1228-1232.
3. M. Zentella de Piña, S. Corona, A.E. Rocha-Hernández, Y. Saldaña-Balmori, G. Cabrera and E. Piña, (1994). Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication, **Life Sciences** **54**: 1433-1439.
4. Lenka Pimentel-Velazquez, M. Dolores Ramirez-Gonzales, Martha Zentella de Piña & Enrique Piña (1996). Piroxicam inhibits epinephrine-induced stimulation of glycerol production in isolated rat adipocytes. **Proc West Pharmacol Soc** **39**: 31-32.
5. Miguel Castrejón S. José Luis Boldú O., Eduardo Muñoz P., Martha Zentella de P., Enrique Piña G. and Roberto Gleason V. (1996). Spin-trapping studies on the effects of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID'S) on hydroxyl and hydroxyethyl free radicals *in vitro*. **Res Comm in Pharmacol Toxicol** **1**: 289-299.
6. Yolanda Saldaña-Balmori, Martha Zentella de Piña, Raquel Guinzberg, Alma Rocha-Hernández, Enrique Piña (1996). Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes **Eur J Pharmacol** **317**: 225-229.
7. Javier Terrazos-Luch, Sergio Corona-García, Martha Zentella de Piña, M. Dolores Ramírez-González & Enrique Piña-Garza (1997). Butylated hydroxytoluene prevents hepatic damage induced by food oil. **Proc West Pharmacol Soc** **40**: 97-99.
8. M. Castrejón S. M. Zentella, de Piña, E. Piña, J.L. Boldú O., E. Muñoz P. and R.J. Gleason, V. (1997). Effects of piroxicam on two *in vitro* free radical production systems (phenylhydrazine autooxidation and fenton reaction) **Res Comm in Pharmacol Toxicol** **2**: 261-267.

9. Héctor Riveros-Rosas, Martha Zentella de Piña, Raquel Guinzberg, Yolanda Saldaña-Balmori, Adriana Julián-Sánchez, Alfredo Saavera-Molina, Enrique Piña (1999). Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes. **Eur J Pharmacol** **380**: 49-59.
10. M. Zentella de Piña, H. Vázquez-Meza, G. Piña-Zentella, L. Pimentel and E. Piña (2002). Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine-and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes. **J Pharmacy Pharmacol** **54**: 577-582.

Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug

Marta Zentella de Piña^{a,b}, Aida Hernández-Tobías^a, Yolanda Saldaña-Balmori^a, Armando Díaz-Belmont^b and Enrique Piña^a

^aDepto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México and ^bClinica para la atención de problemas relacionados con el alcohol, Hospital General de México, Secretaría de Salud, México

Received 23 December 1991

The non-steroidal anti-inflammatory drug, piroxicam, prevents the hepatic increase of triacylglycerols and malondialdehyde resulting from the acute intoxication of rats with ethanol. In addition, in the intoxicated rats, piroxicam consistently produces a decrease in the levels of blood ethanol in comparison with control animals. It is suggested that the anti-inflammatory compound stimulates ethanol oxidation.

Ethyl alcohol; Alcoholic intoxication; Non-steroidal anti-inflammatory agent; Alcoholic hepatitis; Malonates; Piroxicam

1. INTRODUCTION

Piroxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), administered in rats simultaneously with CCl_4 , partially prevented the increases in serum activities of two aminotransferases, maintained liver lipoperoxidation and triacylglycerides (TAG) contents at normal values, and attenuated the liver morphological changes caused by the hepatotoxic compound [1]. For these reasons we searched for the putative action of piroxicam preventing the biochemical alterations produced in the whole animal by an extremely common hepatotoxic compound: ethanol.

2. MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (200–225 g) were fasted 16 h before treatment and divided into four groups: control, receiving isocaloric amounts of glucose (as 40% w/v solution) with regard to the doses of ethanol and equivalent amounts of piroxicam vehicle solution; ethanol, receiving 3 or 5 g of ethanol/kg body weight (as 30% solution) and equivalent amounts of piroxicam vehicle solution; piroxicam, receiving isocaloric amounts of glucose and piroxicam 10 mg/kg body weight (as 7.5 mg/ml in a 25% glycerol/water solution v/v); and ethanol plus piroxicam, receiving ethanol 3 or 5 g/kg and piroxicam 10 mg/kg body weight. The administered compounds were given by orogastric via (OGV) unless otherwise indicated. In most of the experiments rats were killed by decapitation, blood was collected in EDTA and liver samples were taken to evaluate TAG, protein and malondialdehyde (MDA). TAG

Abbreviations: NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; MDA, malondialdehyde; TAG, triacylglycerides; OGV, orogastric via; IPV, intraperitoneal via.

Correspondence address: M. Zentella de Piña, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. Postal 70159, 04510 México, D.F., México. Fax: (525) 548 3603.

were determined by the method described by Gottfried et al. [2] directly in liver homogenates prepared in double distilled water (1:9, w/v). MDA was quantified by the barbituric acid method [3], modified as recommended by Hernández-Muñoz et al. [4]. Protein was determined by the Bradford colorimetric method [5]. Blood ethanol was assayed essentially by the method of Bernt and Gutman [6]. Hematocrit was measured with standard clinical laboratory techniques.

In some experiments rats were sacrificed 2 h after treatment, stomachs were excised and weighed, the content of each stomach was carefully recovered with the aid of saline solution in order to measure ethanol gastric content. In another series of experiments, rats were maintained after treatment in individual metabolic cages and urine was collected to determine ethanol concentration.

Reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ethanol analytical grade was purchased from Baker. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test.

3. RESULTS

The well known increase in liver TAG content produced by ethanol was nearly blocked by piroxicam, whereas the NSAID alone exhibited non-significant alteration in these TAG (Fig. 1).

Glucose or piroxicam did not change MDA levels used here as an index of hepatic lipoperoxidation, ethanol treatment showed a significant increase of MDA content between 8 and 12 h after intoxication, being maximal at 8 h; piroxicam produced a statistically significant diminution of MDA values reached with ethanol alone (Fig. 2).

Since alcohol oxidation is required to augment the lipoperoxidation index in liver [7] and since piroxicam treatment avoids the increase in MDA promoted by ethyl alcohol (Figs. 1 and 2), an inhibition in ethanol oxidation and a consequent rise in its blood levels due to piroxicam administration could be expected. Nevertheless, in rats intoxicated with ethanol by OGV, the

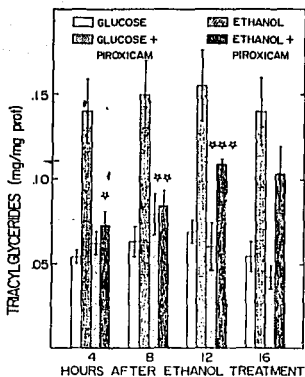


Fig. 1. Effect of piroxicam on ethanol-promoted lipid accumulation in liver. Levels of TAG in the liver of rats at different times after treatment. The dose of ethanol was 5 g/kg of body weight by OGV. Piroxicam was administered consecutively to glucose or ethanol and by the same route. Range of individual assays (*n*) from 4 to 15; *P* values comparing ethanol group vs ethanol + piroxicam group; **P* < 0.001, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.05.

curve of blood ethanol as a function of its administration was lowered with piroxicam, either used by OGV or intraperitoneal via (IPV) (Fig. 3). This action of piroxicam was also observed when ethyl alcohol, 3 g/kg, was provided by IPV (data not shown).

Ethanol content in the stomachs of rats receiving 5 g of ethanol per kg of body weight by OGV 2 h before was 4.62 ± 1.14 mmol/g of stomach (*n*=4), when ethanol was given alone, and it was 6.22 ± 1.51 (*n*=4) when ethanol was supplemented with piroxicam; the difference was without statistical significance (*P* < 0.2). Similarly, the treatment with piroxicam produced no difference in the amount of ethanol eliminated by urine from rats treated

with 3 g of ethanol per kg of body weight by IPV; i.e. 6 nmol/h and 5 nmol/h with and without piroxicam, respectively. Furthermore, the hematocrit value was the same in both groups of animals.

4. DISCUSSION

Administration of the NSAID impaired the hepatic increase in TAG content and in MDA generation promoted by ethanol treatment (Figs. 1 and 2). These 'protective' actions of piroxicam toward alcohol intoxication coincided temporarily with its capacity to decrease blood ethanol levels (Fig. 3), which cannot be attributed to a delay in alcohol absorption from the gastrointestinal tube since the effect was present in animals receiving the toxic compound by IPV, and piroxicam did not modify the rate of absorption of ethanol by the stomach. In addition, the NSAID neither stimulated the elimination of ethanol by the kidney, nor originated hemodilution. Therefore, it appears that piroxicam caused an increase in ethanol oxidation probably due to an induction in the synthesis of nonspecific oxidases, as has been reported, for example, with barbiturates [8]. The activation in ethanol disappearance caused by piroxicam contrasted with the reported effect of aspirin, the prototype of NSAIDs, decreasing the activity of gastric alcoholic dehydrogenase in human subjects and in rat models at low ethanol doses [9].

DiLuzio and Stege clearly showed that peroxidative lipid degradation products formed after ethanol consumption were markedly reduced when ethanol metabolism was blocked by pyrazole, which diminishes acetaldehyde formation, and were augmented by disulfiram, an inhibitor that promotes acetaldehyde accumulation [7]. Thus, the increase in ethanol oxidation promoted by piroxicam should be accompanied by a similar or higher increase in acetaldehyde oxidation (there is a report on the induction of cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by drugs [8]) in order to discourage a rise in lipoperoxidation and in turn in MDA levels.

Some consequences of a piroxicam-mediated lower blood ethanol level might include the diminution of liver

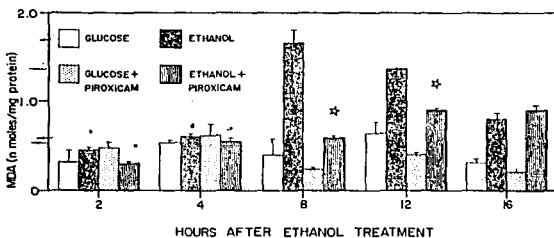


Fig. 2. Effect of piroxicam on ethanol-promoted liver peroxidation. Levels of MDA in the liver of rats at different times after receiving the treatment indicated in the figure. Other indications as in Fig. 1. *n* from 3 to 7. **P* < 0.001 comparing ethanol vs. ethanol plus piroxicam.

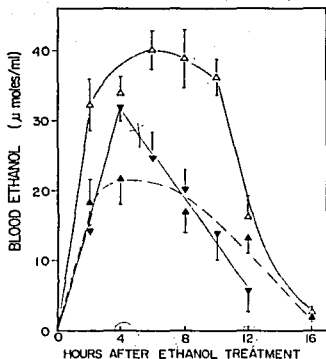


Fig. 3. Role of piroxicam on time course ethanol levels in blood. All animals received 5 g/kg ethanol by OGV plus: (Δ - Δ), 0.1 ml saline by OGV; (\triangle - \triangle), 0.1 ml 20 mg/ml piroxicam by OGV; and 20 mg/ml piroxicam by IPV. (∇ - ∇). For 2 h $n=8$, and $n=5$ in other data. Other indications as in Fig. 1. Values of P are reported comparing results of ethanol vs. ethanol + piroxicam at each of the different times: $P < 0.001$, 8 h OGV, 2 h and 10 h IPV; $P < 0.01$, 6 h and 8 h IPV; $P < 0.05$, 2 and 4 h OGV, 12 h IPV.

TAG content (Fig. 1), a minor cellular transformation to hydroxyethyl free radical [10,11] and therefore no activation of lipoperoxidation, and also the reported decrease in the duration of hypnosis [12]. Finally, the action of piroxicam limiting lipoperoxidation and MDA production (Fig. 2) might also be related to the

reported action of NSAIDs to scavenge, or to inhibit, the generation of free radicals [13,14].

Acknowledgements: This work was supported by Grant IN-21048 from DGAPA-UNAM, México.

REFERENCES

- [1] Diaz-Helmont, P.A., Zentella de Piña, M., Rodríguez, L. and Piña, E. (1990) *Clinical Res.* 38, 533.
- [2] Gottfried, S.P. and Rosenberg, B. (1973) *Clin. Chem.* 9, 1077-1078.
- [3] Ottolenghi, A. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 79, 355-363.
- [4] Hernández-Muñoz, R., Glender, W., Díaz, M.M., García-Sainz, A. and Chagoya de Sánchez, V. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 2599-2604.
- [5] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [6] Berni, E. and Gutmann, I. (1974) in: *Methods of Enzymatic Analysis* (H.U. Bergmeyer, Ed.), Vol. 3, 2nd edn, Verlag Chemie, Academic Press, New York, pp. 1499-1502.
- [7] DiLuzio, N.R. and Stege, T.E. (1977) in: *Hepatology: Research and Clinical Issues* (M.M. Fisher and J.G. Rankin, Eds.) Alcohol and the Liver, Vol. 3, pp. 45-62, Plenum Press, New York.
- [8] Parke, D.V. (1971) in: *Acute Barbiturate Poisoning* (H. Matthew, Ed.) Chapter 2, Excerpta Medica, Amsterdam.
- [9] Roine, R., Gentry, T., Hernández-Muñoz, R., Baraona, E. and Lieber, C.S. (1990) *J. Am. Med. Assoc.* 264, 2406-2408.
- [10] Reinke, L.A., Lai, E.K., Duthose, G.M. and McCay, P.B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9223-9227.
- [11] Knecht, K.T., Bradford, H.U., Mason, R.P. and Thurnan, R.G. (1990) *Mol. Pharmacol.* 38, 26-30.
- [12] Ramírez-González, D., Campos, S.E., Yáñez, G.E., Zentella de Piña, M., Hernández Tobias, A. and Saldaña-Balmori, Y. (1991) 1991 Western Pharmacology Society Annual Meeting, January 27th-February 1st, 1991, Acapulco, Gro. México, p. 41.
- [13] Sagone Jr., J.R. and Husney, R.M. (1987) *J. Immunol.* 138, 2177-2183.
- [14] Kaplan, H.B., Edelson, H.S., Korchak, H.M., Given, W.P., Abramson, S. and Weissmann, G. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 371-378.

T E I S S e c t i o n

Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Lower Ethanol-Mediated Liver Increase in Lipids and Thiobarbituric Acid Reactive Substances

Martha Zentella de Piña, Yolanda Saldaña-Balmori, Aida Hernández-Tobias, and Enrique Piña

Four nonsteroidal antiinflammatory drugs—namely, acetylsalicylic acid, naproxen, nimesulide, and dipyrone—were assayed to search their capability in preventing the hepatic increase of triacylglycerols and thiobarbituric acid reactive substances, as an indication of lipid peroxidation, resulting from the acute intoxication of rats with ethanol. The four antiinflammatory compounds inhibited the ethanol-mediated increase in triacylglycerols and thiobarbituric acid reactive substances. Furthermore, each one of these antiinflammatory drugs produced distinctive actions on blood ethanol levels: a temporal diminution with aspirin and naproxen, no changes with nimesulide, and an increase with dipyrone. It is concluded that the nonsteroidal antiinflammatory drugs contributed to controlling hepatic lipid peroxidation, and hence the oxidative stress promoted by ethanol intoxication.

Key Words: Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, Ethanol, Triacylglycerides, Free Radicals, Oxidative Stress.

SITUATIONS WHICH augment oxidant exposure, or compromise antioxidant capacity, are commonly referred to as oxidative stress.¹ Oxidative stress has long been known to cause lipid peroxidation (LP)¹ and increased LP *in vivo* after acute ethanol intoxication was reported more than 25 years ago.² On these bases, ethanol can be included in the list of xenobiotics capable of producing oxidative stress. Moreover, assessment of oxidative stress is complicated by the lack of a universal oxidant stress product or marker.³ Colorimetric assay, thiobarbituric acid (TBA) for malondialdehyde (MDA), and other substances, is probably the most widely used single test for measuring LP.⁴

Pretreatment with antioxidants was shown to be effective against ethanol-induced LP.² Interestingly, this pretreatment was effective also in preventing ethanol-induced fatty liver.⁵ However, it is not apparent why a nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID), piroxicam, inhibits hepatic increase of TBA reactive substances (TBARS) and triacylglycerols (TAGs) measured after the acute intoxication of rats with ethanol.⁶ Furthermore, in the intoxicated animals, piroxicam produced a decrease in the levels

of blood ethanol in comparison with control ones.⁶ The purpose of this work is to learn whether different NSAIDs share with piroxicam the action of preventing the increase in TAGs and TBARS, caused by ethanol intoxication. These experiments could be important due to the widespread clinical use of NSAIDs.⁷

METHODS

Male Wistar rats (200–225 g) were fed *ad libitum* with a commercial diet (Nutricubos from Purina, Mexico). The content of minerals and vitamins in the diet was maintained constant, according to the producer. The animals were fasted 24 hr before treatment, but free access to water was permitted. Rats were divided into four groups and treated as follows: glucose, receiving gavage glucose 37.5 kcal/kg body weight (as a 40% w/v solution) plus a corresponding amount of NSAID vehicle; ethanol, receiving gavage ethanol 37.5 kcal/kg body weight (as a 30% solution) plus equivalent amounts of the NSAID vehicle; glucose plus a NSAID, receiving gavage glucose as in the control group and one of the following NSAIDs: acetylsalicylic acid (ASA), dipyrone, naproxen, or nimesulide, at the doses indicated below; and ethanol plus a NSAID, receiving gavage ethanol as in the ethanol groups and one of the listed NSAIDs at the doses described in the following paragraphs. Each one of the NSAIDs, dissolved in NaCl (0.9%), was given orogastrically immediately after glucose or ethanol solutions. Doses of NSAIDs used were as follows: acetylsalicylic acid as aspirin (commercial presentation from Bayer) 56 mg/kg body weight, approximately one-half of the daily doses quoted by Insel⁸ for patients with rheumatic fever; in a different model, 56 mg of ASA/kg is as effective as 10 mg/kg body weight piroxicam,⁹ which was the dose used to inhibit the ethanol-mediated increase of TBARS and TAG liver content.⁶ In experiments elapsing more than 8 hr, a second identical dose of ASA was given 8 hr after the first administration, because the elimination half-life for ASA might be shorter than 1 hr.⁸ Dipyrone (Neo-melubrina from Hoechst), 43 mg/kg body weight, and naproxen (Naxen from Syntex), 7 mg/kg body weight, were used at equivalent doses to those suggested for their use in humans (ref. 10 for dipyrone and ref. 7 for naproxen). Due to the high therapeutic index of nimesulide (Mesulid from Lakeside) lethal dose₅₀/effective dose₅₀ = 260,¹¹ it was used at the doses of 30 mg/kg body weight, which is five times higher than the dose recommended for human use.¹¹

Rats were killed by decapitation 4, 8, and 12 hr after treatment. Blood samples were collected in EDTA for ethanol determination and liver homogenates prepared in double distilled water for protein, TBARS, and TAGs determinations. TAGs were extracted with heptane and hydrolyzed with KOH as described by Gottfried and Rosenberg¹²; glycerol was then oxidized with periodate and the resulting formaldehyde condensed with acetylacetone to form a yellow dehydroxylutidine derivative, measured colorimetrically.¹³ TBARS was determined by minor modifications to the TBA original method¹⁴: the liver homogenate was passed through a cheesecloth and a 0.2 ml aliquot incubated with 1.0 ml of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.0) for 30 min at 37°C, 1.5 ml acetic acid (20%) (pH 2.5), and 1.5 ml TBA (0.8%) were then added. The mixture was

From the Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (M.Z.P., Y.S.-B., A.H.-T., E.P.); and Clínica para la atención de problemas relacionados con el Alcoholismo, Hospital General de México (M.Z.P.).

Received for publication July 20, 1992; accepted May 11, 1993

This work was supported in part by Grant IN-207292 from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México.

Reprint requests: Martha Zentella de Piña, M.D., Apartado Postal 70-159, México, 04510, D.F.

Copyright © 1993 by The Research Society on Alcoholism.

110

then placed in boiling water for 45 min, the cold tubes with 1 ml KCl (2%) and 5 ml butanol:pyridine (15:1) were mixed vigorously, and absorbance of the organic layer was measured at 532 nm. The liver homogenate aliquot was substituted by the phosphate buffer or by known amounts of TBA reactive substances in the phosphate buffer in the blank tube and in the calibration curve, respectively. When the NSAIDs were tested for their capability to interfere with the color development (i.e., acting as free radical scavengers during the incubation step), they were included at the final concentrations indicated below, in the 0.2 ml homogenate, phosphate buffer or the known amounts of TBA reactive substances. No attempts were made to evaluate the eventual interference of color development produced by the liver metabolites originated from the NSAIDs used. Results are reported as MDA concentrations required to develop an equivalent color to the one developed by the TBARS from the liver.

Three different concentrations of NSAIDs were used in the TBARS test, and they were selected on the following basis. The first concentration was prepared assuming that the doses of each one of the administered NSAIDs is uniformly distributed in the total body water of the animal; the concentration of the NSAIDs was 0.08 mg/ml for ASA, 0.06 mg/ml for dipyrone, 0.01 mg/ml for naproxen, and 0.042 mg/ml for nimesulide. A second comparative concentration 5-fold higher was prepared. A third concentration was conducted by liver homogenization, which diluted the tissue sample by a factor of 7; that way, the final concentration in the homogenate became 11.4 µg/ml for ASA, 8.5 µg/ml for dipyrone, 1.4 µg/ml for naproxen, and 6.0 µg/ml for nimesulide.

Protein was quantified by Bradford colorimetric method.¹³ For the blood ethanol determination the spectrophotometric method of Berni and Gutmann,¹⁴ using alcohol dehydrogenase, was used. For statistical analysis Student's *t* tests were performed, and *p* values calculated and included in the corresponding figure.

RESULTS

Identical standard curves with known amounts of TBARS were obtained when each 1 of the 4 NSAIDs was added at the three selected concentrations described in "Methods." With one single exception, dipyrone, the other three NSAIDs at the three indicated concentrations did not modify the TBARS test when they were included in the homogenate of rat liver treated with glucose or with ethanol, or when the colorimetric assay was performed with or without the 30 min incubation at 37°C (see "Methods"). Dipyrone lowered the development of color from TBARS in the liver extract of rats treated with glucose or ethanol in 55% when the NSAID was added *in vitro* at a concentration of 0.3 mg/ml, which is more than five times higher than the calculated concentration of dipyrone in the total body water and 35 times higher than the calculated concentration in the homogenate where the assay for TBARS was made. These results were obtained whether or not the test was incubated at 37°C for 30 min. In short, under the conditions described herein, the *in vitro* presence of NSAIDs, at the concentrations presumably present in the homogenates, do not interfere with the development of color for TBARS and therefore can be considered an indication of LP *in vivo*.

One glucose- and one ethanol-treated rat were included in each experiment. Because four NSAIDs were tested, at the end of the experimental period, data from near 20 rats from either the glucose or ethanol groups were available in each one of the selected times (4, 8, or 12 hr). For this

reason each value in the glucose- or in the ethanol-treated group within the four figures included corresponds to ~20 determinations of blood ethanol, TBARS, and TAGs liver content.

The doses of ethanol used in this work produced an increase in hepatic content of TAGs and TBARS, which was clearly evident 4 hr after the intoxication and was quantitatively more important when the action of ethanol elapsed for 8 or 12 hr (Fig. 1).

Aspirin, in one single dose or after a second administration 8 hr later, has minor effects on the hepatic content of TAGs and TBARS from control rats treated with glucose; this NSAID produced a diminution of the TAG and TBARS values reached with ethanol alone (Fig. 1). Diminution in TBARS was statistically significant 8 hr following the first ASA administration, but a second dose of ASA was used to keep the TBARS values below the ones found with ethanol alone. Another effect of this drug, either after one or two administrations, was to lower at 8 hr the concentration of blood ethanol (Fig. 1).

Although dipyrone produced some changes in the liver values of TAGs and TBARS of rats receiving glucose, the important action of this compound was to promote a significant decrease in the liver content of TAGs and TBARS in ethanol-intoxicated rats (Fig. 2). Dipyrone treatment for 4 or 8 hr resulted in a statistically significant increase in the concentration of blood ethanol (Fig. 2). Naproxen was effective in lowering the values of TAGs and TBARS in the liver of rats treated with ethanol (Fig. 3). This NSAID also promoted minor actions in the glucose-treated rats (Fig. 3) and lowered blood ethanol 4 hr after treatment (Fig. 3).

In regard to the hepatic values of TAG and MDA recovered from rats receiving glucose or ethanol, nimesulide exhibited similar actions as the other NSAIDs studied herein (i.e., no changes in the control rats and significant decreases in the values from ethanol-intoxicated rats) (Fig. 4). Nimesulide produced minor modifications on the concentration of blood ethanol (Fig. 4).

DISCUSSION

All animals received the same diet. The fasting periods were comparable among the different experimental groups; therefore, the influence of minerals and vitamins from the diet on LP¹⁷ was maintained constant in the trial, and in this way is most probably unrelated to the actions described for the NSAIDs.

It is documented that the TBARS test lacks specificity and requires numerous controls⁴; nevertheless, it is the most widely used single test for measuring LP.⁴ Within the controlled experimental conditions described in this study, the quantified TBARS appear to represent a reliable indication of LP *in vivo*. That the four NSAIDs tested effectively decrease the LP stimulated by ethanol might be strengthened by the fact that they also diminished the

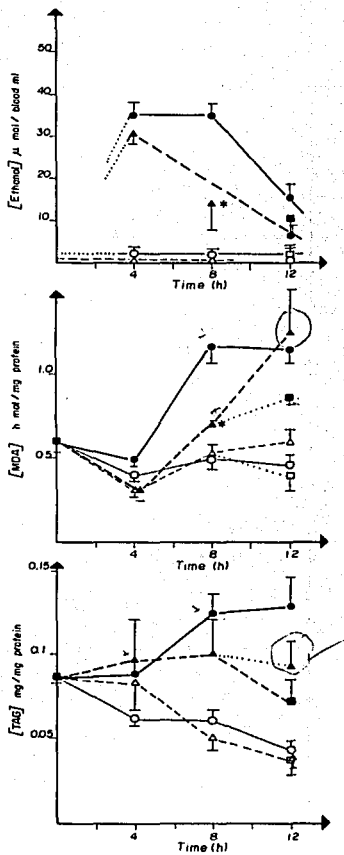


Fig. 1. Effect of ASA on time course biochemical indicators. Experimental groups: glucose (○), receiving gavage glucose 37.5 kcal/kg body weight, as a 40% w/v solution, plus 0.9% NaCl in equivalent amounts used to dissolve ASA; ethanol (□), receiving gavage ethanol 37.5 kcal/kg body weight, as a 30% solution, plus 0.9% NaCl in equivalent amounts used to dissolve ASA; glucose plus ASA (one dose) (△—△), glucose as previously indicated with one single dose of 56 mg ASA/kg body weight dissolved in 0.9% NaCl; glucose plus ASA (two doses) (△...□), glucose as previously indicated and two identical doses of 56 mg ASA/kg body weight dissolved in 0.9% NaCl; the first dose was given at the beginning of the experiment and the second one was given 8 hr later; ethanol plus ASA (one dose) (△—△), ethanol and one single dose of ASA as indicated, and ethanol plus ASA (two doses) (△...■), ethanol and two identical doses of ASA as previously indicated. Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparing ethanol group

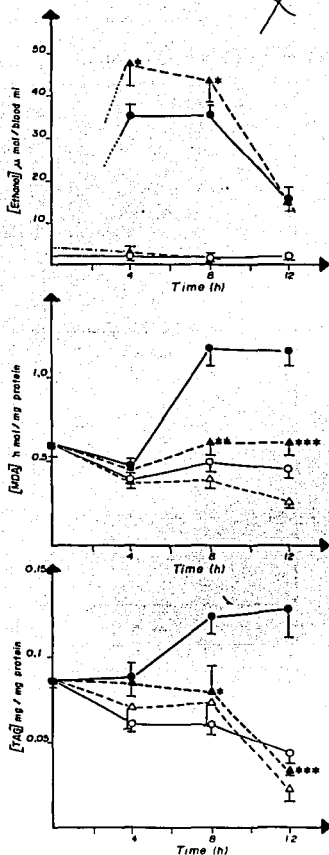


Fig. 2. Dipyrone effects on time course biochemical indicators. Groups: glucose (○), receiving gavage glucose 37.5 kcal/kg body weight, as 40% w/v solution, and 0.9% NaCl in equivalent amounts to dissolve dipyrone; ethanol (□), receiving gavage ethanol 37.5 kcal/kg body weight, as 30% solution, and 0.9% NaCl in equivalent amounts to dissolve dipyrone; glucose plus dipyrone (△), glucose as previously indicated and 43 mg/kg body weight dipyrone in 0.9% NaCl; ethanol plus dipyrone (one dose) (△...□), ethanol as previously indicated and one dose of 43 mg/kg body weight dipyrone in 0.9% NaCl; ethanol plus dipyrone (two doses) (△...■), ethanol as previously indicated and two identical doses of 43 mg/kg body weight dipyrone in 0.9% NaCl. Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparing ethanol group vs. ethanol plus NSAID group ($n = 18$ for glucose and ethanol groups and $n = 5$ for glucose plus dipyrone and ethanol plus dipyrone groups).

vs. ethanol plus ASA group ($n = 18$ for glucose and ethanol groups and $n = 4$ for glucose plus ASA, one or two doses, and for ethanol plus ASA, one or two doses).

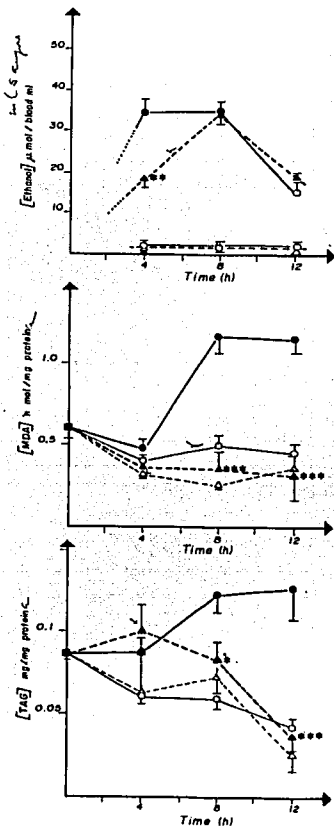


Fig. 3. Effect of naproxen on time course biochemical indicators. Groups: glucose (○) and ethanol (●) as indicated in Fig. 2; glucose plus naproxen (△), ethanol plus naproxen (▲), ethanol as indicated in Fig. 2 and 7 mg/kg body weight naproxen in 0.9% NaCl. Statistics and n values as in Fig. 2.

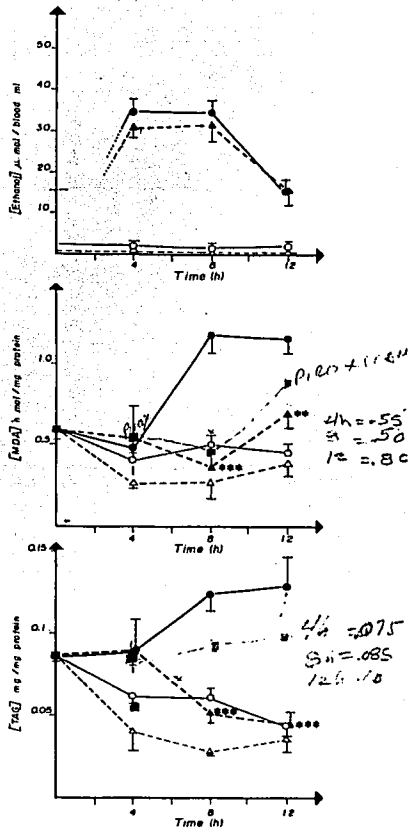


Fig. 4. Nimesulide effect on time course biochemical indicators. Groups: glucose (○) and ethanol (●) as indicated in Fig. 2; glucose plus nimesulide (△), ethanol plus nimesulide (▲), ethanol as indicated in Fig. 2 and 30 mg/kg body weight nimesulide in 0.9% NaCl. Statistics and n values as in Fig. 1.

liver increase in TAG content, equally promoted by an acute ethanol intoxication. In a similar way, treatment with antioxidants also controls ethanol-induced LP and fatty liver.^{2,3} Furthermore, the described actions of the presently studied compounds are shared by piroxicam,⁶ another member of the NSAIDs family, thus giving a positive answer to the question depicted in the introduction to this study.

Because quite different doses of the NSAIDs were used herein, a strict comparison on the relative potency of these drugs reversing liver TBARS and TAG increases is not reliable. Thus a more detailed study is required to correlate the quantitative differences in the described actions of the selected NSAIDs used with their reported pharmacokinetic properties, such as effective doses, measured blood concentrations, and specific half-lives.

However, the action of the NSAIDs was distinctive related to the level of blood ethanol. Inasmuch as aspirin and naproxen lowered temporarily the concentration of ethanol in blood, nimesulide was without effect, but dipyron increased its concentration. In a previous work it has been shown that piroxicam was effective in consistently decreasing the level of blood ethanol.⁶

The rather high doses of NSAIDs used in this work and in a previous one⁶ do not minimize their remarkable similar actions on reverting TBARS and TAG increases in the liver as effects of ethanol intoxication. At this stage of the experimental work, a possible mechanism of these NSAIDs actions is only speculative. The anti-LP effect of the NSAIDs described herein might be related to the well-established action of these drugs on the cyclooxygenase inhibition,¹¹ but a more direct activity of the NSAIDs working as free radical scavengers has been described for some of them,^{19,20} and this possible mechanism cannot be ruled out.

It might be concluded then that the NSAIDs used contribute to the control of the oxidative stress and the TAG accumulation observed in the liver and promoted by the acute intoxication with ethanol, the most extensively toxic compound consumed by humans.^{21,22}

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gabriel Moreno for technical assistance and Dr. H. J. Delgado for help in statistical analysis.

REFERENCES

- Pacifici RE, Davies KJA: Protein degradation as an index of oxidative stress, in Packer L, Glazer AN (ed): *Oxygen Radicals in Biological Systems. Part B. Oxygen Radicals and Antioxidants. Methods in Enzymology*, vol 186. San Diego, Academic Press, 1990, p 485
- Kalish GH, Di Luzio NR: Peroxidation of liver lipids in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. *Science* 152:1390-1392, 1966
- Burk RF, Hill KE: Use of perfused organs in measurement of drug-induced oxidant stress, in Packer L, Glazer AN (ed): *Oxygen Radicals in Biological Systems. Part B. Oxygen Radicals and Antioxidants. Methods in Enzymology*, vol 186. San Diego, Academic Press, 1990, p 759
- Gutteridge JMC, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135, 1990
- Di Luzio NR: Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by the simultaneous administration of antioxidants. *Life Sci* 3:113-118, 1964
- Zentella de Piña M, Hernández-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Diaz-Belmont A, Piña E: Biochemical ethanol effects affected by a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett* 298:123-125, 1992
- Insel PA: Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents; drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout, in Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds): *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed 8. New York, Pergamon Press, 1990, p 638
- Wiseman EH: Review of preclinical studies with piroxicam: Pharmacology, pharmacokinetics and toxicology. *Roy Soc Med Int Cong Symp Ser* 1:11-23, 1978
- Brooks PM, Day RO: Nonsteroidal antiinflammatory drugs—Differences and similarities. *N Engl J Med* 324:1716-1725, 1991
- Mandel HG, Davison C: Nonnarcotic analgesics and anti-inflammatory agents. II. Nonsteroidal agents and drugs used in gout, in Di Palma J R (ed): *Drill's Pharmacology in Medicine*, ed 4. New York, McGraw-Hill, 1971, p 404
- Swingle KF, Moore GGI, Grant TJ: 4-Nitro-2-phenoxy-methanesulfonamide (R-805): A chemically novel anti-inflammatory agent. *Arch Int Pharmacodyn* 221:132-139, 1976
- Reiner M, Magni E: Efficacy and safety of nimesulide in the short term treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Ther Res* 31:906-912, 1982
- Gottfried SP, Rosenberg B: Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 19:1077-1078, 1973
- Ottolenghi A: Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch Biochem Biophys* 79:355-363, 1959
- Bradford MM: A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
- Bernt E, Gutmann I: Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD⁺, in Bergmeyer HM (ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 3, ed 2. New York, Verlag Chemie, Academic Press, 1974, p 1499
- Machlin LJ, Bendich A: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1:441-445, 1987
- Wane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature (New Biol)* 231:232-235, 1971
- Sagone AL, Husney RM: Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: Evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems. *J Immunol* 138:2177-2183, 1987
- Abramson S, Edelson H, Kaplan H, Ludewig R, Weissmann G: Inhibition of neutrophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 77:3-6, 1984
- Williams GD, Grant BF, Stinson FS, Zobeck TS, Aitken SS, Noble J: Trends in alcohol-related morbidity and mortality. *Public Health Rep* 103:592-597, 1988
- Multi-authorial: Secretaría de Salud, Sistema Nacional de Encuestas de Salud, Encuesta Nacional de Adicciones, Alcohol. México, Secretaría de Salud, 1990



RESTORATION BY PIROXICAM OF LIVER GLUTATHIONE LEVELS DECREASED BY ACUTE ETHANOL INTOXICATION.

M. Zentella de Piña*, S. Corona*, A.E. Rocha-Hernández**,
Y. Saldaña Balmori*, G. Cabrera* and E. Piña*.

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and

**Departamento de Producción Animal:

Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Postal address:

A. Postal 70159, México 04510, D.F. MEXICO.

(Received in final form February 18, 1994)

Summary

The effect of piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, on blood ethanol and on triacylglycerols, malondialdehyde and glutathione levels in liver of fed rats acutely intoxicated with ethanol was studied. As previously reported for fasted rats, piroxicam in fed rats decreases the concentration of ethanol in blood and inhibits the hepatic increase of triacylglycerols and malondialdehyde consequent to ethanol administration. In addition, the hepatic depletion of reduced and reduced plus oxidized glutathione observed 8 and 12h after gavage of ethanol was reversed when piroxicam was administered simultaneously with ethanol. The importance of the finding is discussed in light of the paramount participation of glutathione during the cellular oxidative stress.

Key Words: piroxicam, ethanol, alcohol intoxication, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, glutathione

Acute ethanol intoxication produces, in the liver cells, a typical situation commonly referred to as oxidative stress (1); in this case characterized by an increase in lipid peroxidation (LP) (2,3), in which maximum enhancement coincides with a depletion in the pool of reduced glutathione (GSH) (4-6). GSH is a physiological free radical quencher with ability to protect cells against the deleterious effects of reactive oxygen intermediates and free radicals (7). On the other side, it seems convenient to keep in mind that the most widely used single test for measuring LP, consecutive to an excess in the pool of cellular free radicals (8), is the thiobarbituric acid assay for malondialdehyde (MDA) and related reactive substances (TBARS) (9).

Since piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, partially prevents the liver increase of triacylglycerols (TAG) and TBARS resulting from the acute intoxication of fasted rats with ethanol (10), the idea of this paper was to extend this observation to fed rats and, most importantly, to study the action of piroxicam on an antioxidant cellular system, such as the hepatic pool of GSH, and GSH plus oxidized glutathione (GSH + GSSG).

Materials and Methods

Male Wistar rats (150 - 200 g) fed ad libitum with a standard Purina Chow, were allotted into four groups: glucose, receiving isocaloric amounts of glucose (as 40% w/v solution) with regard to the dose of ethanol and equivalent amounts of piroxicam vehicle solution; ethanol, receiving 5 g of ethanol/kg body weight (as 30% solution) and equivalent amounts of piroxicam vehicle solution; glucose + piroxicam, receiving isocaloric amounts of glucose and piroxicam 10 mg/kg body weight (as 7.5 mg/ml in a 25% glycerol/water solution v/v); and ethanol + piroxicam, receiving ethanol 5 g/kg and piroxicam 10 mg/kg body weight. The administered compounds were given by orogastric via. In order to avoid diurnal variations that could influence the interpretation of the data the animals were systematically sacrificed at 5 P.M., complete treatment was finished 8 or 12 h before. Rats were allowed free access to food and water after given glucose or ethanol, with or without piroxicam.

Rats were lightly anaesthetized with ethyl ether and subjected to an incision in the abdomen to expose the organs. Two pieces of liver were taken out, blood washed and immediately introduced in liquid N₂, within the next 24 h one was used to measure oxidized glutathione (GSSG) and the other one to measure GSH + GSSG. A sample of blood was quickly withdrawn by heart puncture and placed in ice cold 0.33 N perchloric acid to quantify ethanol by the spectrophotometric technique of Berni and Gutmann (11). The remaining liver was then pulled out and homogenated in ice cold bidistilled water (1:9 w/v) to assay TAG, TBARS and protein. TAG were determined by the method described by Gottfried and Rosenberg (12). Lipid peroxidation was quantified by the TBARS method as carefully detailed by Zentella de Piña *et al.* (13). The extinction coefficient of MDA $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (14) was used and the obtained value is considered as the TBARS content. Protein was determined as described by Bradford (15) by using bovine albumin as standard. In order to measure GSH + GSSG, one of the samples maintained in liquid N₂ was weighed and homogenized in 1.6 ml ice cold 1 M perchloric acid in 2 mM EDTA, the mixture was centrifuged at 5000 g for 10 min at 4°C and the supernatant was adjusted in the range of pH 5 - 7, at 4°C, with a solution containing 2 M KOH and 0.3 M N-morpholinopropanesulfonic acid. The sample was centrifuged again and GSH + GSSG was quantified immediately in an aliquot of the supernatant following method I detailed by Akerboom and Sies (16). GSSG was measured in the other liver sample maintained in liquid N₂, and was weighed and homogenized in 1.6 ml of a solution containing 1 M perchloric acid, 2 mM EDTA and 50 mM N-ethylmaleimide. The mixture was centrifuged at 4°C and the supernatant was brought to pH 6.0, at 4°C with 2 M KOH plus 0.3 M N-morpholinopropanesulfonic acid, the precipitate was eliminated by centrifugation and, in the supernatant, the excess of N-ethylmaleimide was removed by extraction with diethyl ether and the remaining ether was eliminated under reduced pressure (16). An aliquot of 0.5 ml from these washed samples was used to assay GSSG by the method IV described by Akerboom and Sies (16). For either GSSG or GSH + GSSG, the calculation was based on the standard curves prepared for each individual experiment; the content of GSH was calculated by the difference of both previous values.

The following reagents were from Sigma Chemical Co., St Louis, Mo. USA: 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid); nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form; glutathione reductase Type IV (from bakers yeast); glutathione oxidized disodium salt; ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA) disodium salt; trizma

base; 2-thiobarbituric acid; potassium chloride; sodium m-arsenite; potassium hydroxide; N-ethylmaleimide; N-morpholino propanesulfonic acid. Piroxicam solutions were prepared from commercial presentations (Feldene, from Pfizer).

Other reagents were analytical grade from Merck-México.

Results and Discussion

The well known ethanol mediated increase in liver TAG content was blocked by piroxicam treatment for 8 h (Fig. 1). In a similar way, the values of TBARS were lowered in 8 h to the values found in control animals by simultaneous administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug (Fig. 2). Piroxicam treatment also produced a statistically significant diminution in the concentration of blood ethanol measured 8 h (ethanol + saline 40.16 ± 3.26 μ moles of ethanol/ml of blood, $n = 4$, vs ethanol + piroxicam 28.1 ± 0.94 μ moles ethanol/ml of blood, $n = 4$, $p < 0.01$) and 12 h (ethanol + saline 36.48 ± 2.84 μ moles ethanol/ml of blood, $n = 4$, vs ethanol + piroxicam 30.57 ± 1.03 μ moles ethanol/ml of blood, $n = 4$, $p < 0.04$) after gavage with the hepatotoxic compound. Therefore, the action of piroxicam reversing some effects of acute ethanol intoxication is observed in fasted rats (10) as well as in fed animals (Figs. 1 and 2). It is unclear whether piroxicam produces other effects directly in the liver or indirectly by keeping blood ethanol concentrations low. Piroxicam decreased ethanol blood levels, as we reported previously in similar experiments (10), and because blood ethanol levels decreased in the saline-treated group between 8 and 12 hours, but not in the piroxicam group. It seems that absorption might be delayed in the latter group.

The results of hepatic glutathione levels recorded in fed rats subjected to different treatments are included in Tables I and II. In rats receiving glucose, treatment with piroxicam for 8 to 12 h produced a decrease in the content of hepatic GSH and GSSG, without statistical significance. Noticeably, aspirin, the classical nonsteroidal anti-inflammatory drug, or sodium salicylate, depressed rat hepatic GSH from 60 to 70% of control levels in 4 h (17). Ethanol lowered the content of GSH and GSSG 8 and 12 h after the intoxication, the statistical significance for each case is included in the footnotes of Tables I and II. The decrease in GSH by acute ethanol intoxication is widely documented (4-6). It is higher in fasted rats (6), but has been recorded also in fed animals (4). The values reported for GSSG in rat liver are one order of magnitude higher in some papers (6) as compared to the numbers included in Tables I and II. This very low amount of GSSG found in the samples considered in Tables I and II is in accord with other reports in which precaution against autooxidation were taken (16, 18, 19). Conflicting results have been documented for the liver content of GSSG in response to acute ethanol intoxication, either a 119% increase (6) or a 35% diminution (20). The results of this paper show a decrease of 37 and 45% in hepatic GSSG values 8 and 12 h, respectively, after ethanol gavage (Tables I and II). The most interesting point in regard to glutathione is that in rats intoxicated with ethanol, piroxicam treatment resulted in a statistically significant increase for the values of GSH and GSSG recorded 8 and 12 h after the administration of the anti-inflammatory compound (Tables I and II). Thus, the deleterious effect of ethanol lowering the hepatic pool of glutathione was reverted by piroxicam. Of importance to this work, piroxicam administration enhances brain glutathione levels in the rat (21). The effect of acute ethanol intoxication on GSH turnover, utilizing a pulse of 35 S cysteine, indicates a

decreased synthesis of hepatic glutathione but a major increased loss of GSH from the liver provoked by a fuge through the hepatic plasma membrane (20). The preferential role of piroxicam reverting the actions of ethanol intoxication on hepatic glutathione turnover deserves further study.

In this way, both indicators of hepatic molecular response due to acute ethanol intoxication, such as an increase in TBARS and a diminution in GSH, were reverted by piroxicam treatment. The results of this paper are of potential relevance for the following facts: ethanol is the most extensively toxic compound consumed by humans (22), glutathione is probably the more abundant metabolite with a paramount role as an oxidant defense against oxidative stress (23), and the nonsteroidal anti-inflammatory drugs register a wide-spread clinical use (24).

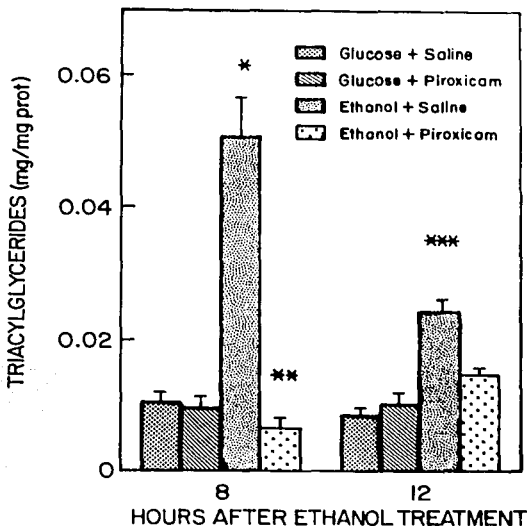


FIG. 1

Effect of piroxicam on the content of hepatic triacylglycerols from fed rats receiving, by orogastric via, isocaloric doses of glucose or ethanol, equivalent to 5 g of ethanol/kg body weight. Piroxicam was administered immediately after glucose or ethanol gavage. The data represent average \pm standard error (SE). Range of individual assays (n) from 4 to 6.

* $p < 0.008$ comparing glucose + saline vs ethanol + saline at 8 h.

** $p < 0.006$ comparing ethanol + saline vs ethanol + piroxicam at 8 h.

*** $p < 0.001$ comparing glucose + saline vs ethanol + saline at 12 h.

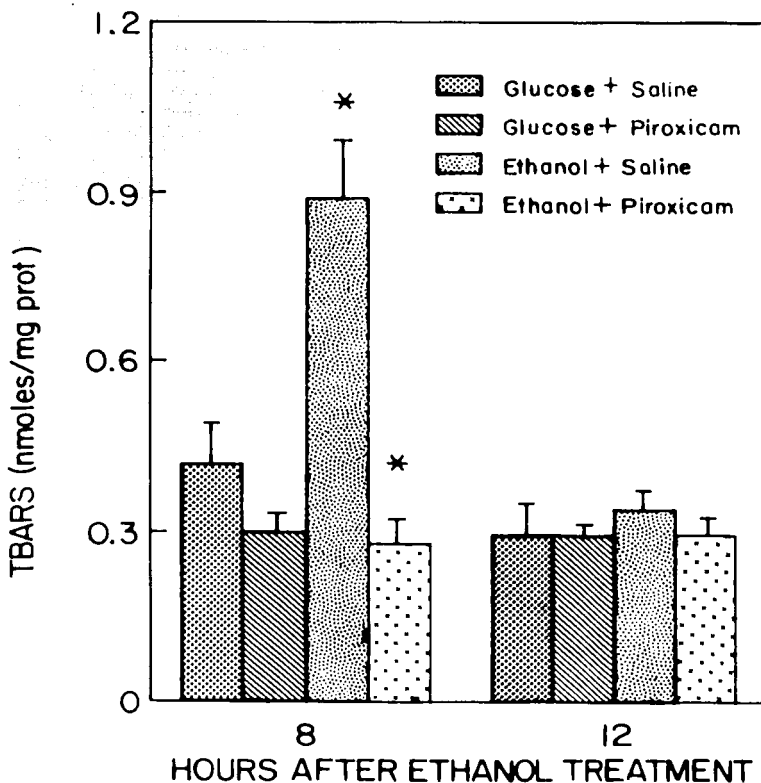


FIG. 2

Effect of piroxicam on the hepatic values of TBARS from fed rats receiving, by orogastric via, isocaloric doses of glucose or ethanol, equivalent to 5g of ethanol/kg body weight. Piroxicam was administered immediately after glucose or ethanol gavage. The data represent average \pm standard error (SE). Range of individual assays (n) from 5 to 6.

* $p < 0.001$ comparing glucose + saline vs ethanol + saline at 8 h, or comparing ethanol + saline vs ethanol + piroxicam at 8 h.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE I

Effect of 8 h Piroxicam Treatment on the Pool Values of Hepatic Glutathione in Rats

Treatment ^a	GSH	GSSG	GSH + GSSG
Glucose + Saline	4.59 ± 0.35 ^b (5)	0.027 ± 0.002 (5)	4.62 ± 0.35 (5)
Glucose + Piroxicam	3.61 ± 0.20 (4)	0.024 ± 0.004 (4)	3.63 ± 0.20 (4)
Ethanol + Saline	3.03 ± 0.37 ^c (5)	0.017 ± 0.002 ^e (5)	3.05 ± 0.37 ^e (5)
Ethanol + Piroxicam	4.13 ± 0.12 ^d (4)	0.036 ± 0.006 ^f (4)	4.17 ± 0.11 ^d (4)

^a Fed rats were gavaged with isocaloric doses of glucose or ethanol, equivalent to 5 g of ethanol/kg body weight. Piroxicam (10 mg/kg body weight) was administered by orogastric via at the indicated groups and immediately after glucose or ethanol.

^b Data are in μ moles/g wet liver and correspond to the mean \pm SE with the number of rats in parentheses.

^c Glucose + saline vs ethanol + saline $p < 0.01$.

^d Ethanol + saline vs ethanol + piroxicam $p < 0.03$.

^e Glucose + saline vs ethanol + saline $p < 0.03$.

^f Ethanol + saline vs ethanol + piroxicam $p < 0.01$.

Other comparisons without statistical significance.

TABLE II

Effect of 12 h Piroxicam Treatment on the Pool Values of Hepatic Glutathione in Rats

Treatment	GSH	GSSG	GSH + GSSG
Glucose + Saline	5.30 ± 0.28 (4)	0.020 ± 0.005 (4)	5.32 ± 0.29 (4)
Glucose + Piroxicam	4.12 ± 0.45 (5)	0.013 ± 0.001 (5)	4.13 ± 0.45 (5)
Ethanol + Saline	3.48 ± 0.37 ^a (5)	0.011 ± 0.001 (5)	3.49 ± 0.37 ^a (5)
Ethanol + Piroxicam	4.44 ± 0.35 (5)	0.015 ± 0.001 ^b (5)	4.46 ± 0.35 (5)

^a Glucose + saline vs ethanol + saline $p < 0.007$.

^b Ethanol + saline vs ethanol + piroxicam $p < 0.03$.

Other indications as in Table I

120

Acknowledgements

This work was supported by Grant IN-208992 from DGAPA, UNAM, México. The authors are grateful to Mrs. Sharon S. Morey for her help in the preparation of the manuscript, to Mr. Gabriel Morano Campero for technical assistance and to Mrs. Rosa María Hidalgo for typing the manuscript.

References

1. H. SIES, *Oxidative stress*, H. Sies (ed), 1-7, Academic Press, San Diego(1985).
2. N.R. DI LUZIO, *Life Sci.* 3 113-118 (1964).
3. R. NORDMANN, C. RIBIERE and H. ROUACH, *Free Rad. Biol. Med.* 12 219-240 (1992).
4. L.A. VIDELA, V. FERNANDEZ, G. UGARTE and A. VALENZUELA, *FEBS Lett.* 171 6-10 (1980).
5. L.A. VIDELA and A. VALENZUELA, *Life Sci.* 31 2395-2407 (1982).
6. A. VALENZUELA, C. LAGOS, K. SCHMIDT and L.A. VIDELA, *Biochem. Pharmacol.* 34 2209-2212 (1985).
7. A. MEISTER, *Science* 220 472-477 (1983).
8. T.F. SLATER, *Free Radical Mechanisms in Tissue Injury*, T.F. Slater (ed), 171-197, Pion, London (1972).
9. J.M.C. GUTTERIDGE and B.HALLIWELL, *Trends Biochem. Sci.* 15 129-135 (1990).
10. M. ZENTELLA DE PIÑA, A. HERNANDEZ-TOBIAS, Y. SALDAÑA BALMORI, A. DIAZ BELMONT and E. PIÑA, *FEBS Lett.* 298 123-125 (1992).
11. E. BERTN and I. GUTMANN, *Methods of Enzymatic Analysis* Vol. 3, 2nd edn, H.U. Bergmeyer (ed), 1499-1502, Verlag Chemie, Academic Press, New York (1974).
12. S.P. GOTTFRIED and B. ROSENBERG, *Clin. Chem.* 9 1077-1078 (1973).
13. M. ZENTELLA DE PIÑA, Y. SALDAÑA-BALMORI, A. HERNANDEZ-TOBIAS and E. PIÑA, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17 (1993).
14. T.J. PLAYER, D.J. MILLS and A.A. HORTON, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78 1397-1402, (1977).
15. M.M. BRADFORD, *Anal. Biochem.* 72, 248-254, (1976).
16. T.P.M. AKERBOOM and H. SIES, *Methods in Enzymology*, Vol. 77 William B. Jakoby (ed), 373-382, Academic Press Inc., New York (1981).
17. N. KAPLOWITZ, J. KUHNENKAMP, L. GOLDSTEIN and J. REEVE, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272 240-245 (1980).
18. H. GÜNTHERBERG and S. RAPAPORT, *Acta Biol. Med. Ger.* 20 559-564 (1968).
19. E. BEUTLER and C.WEST, *Anal. Biochem.* 81 458-460 (1977).
20. H. SPEISKY, A. MACDONALD, G. GILES, H. ORREGO and Y. ISRAEL, *Biochem. J.* 225 565-572 (1985).
21. L. MICHELI, G. GIORGI, A.I. FIASCHI, D. CERRETANI, *Pharmacol. Res.* 22 31-34 (1990).
22. G.D. WILLIAMS, B.F. GRANT, F.S. STINSON, T.S. ZOBECK, S.S. AITKEN and J. NOBLE, *Public Health Rep.* 103 592-597 (1988).
23. A. LARSSON, S. ORRHENIUS, A. HOLMGREN, B. MANNERNIK (eds.) *Functions of glutathione*. Raven Press, New York, (1983).
24. P.A. INSEL, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edn. 8 th. A.G. Gilman, T.W. Rall A.S. Nies and P. Taylor (eds), 638, Pergamon Press, New York (1990).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Piroxicam Inhibits Epinephrine-Induced Stimulation of Glycerol Production in Isolated Rat Adipocytes

LENKA PIMENTEL-VELAZQUEZ*, M. DOLORES RAMIREZ-GONZALES, MARTHA ZENTELLA DE PIÑA & ENRIQUE PIÑA

Department of Biochemistry, School of Medicine, National University of Mexico, México 04510, DF

Previous data from our laboratory [1,2] have shown that several nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), a group of drugs extensively used in clinical medicine [3], partially prevent the ethanol-induced increase in fasted rats of hepatic triacylglycerides and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), the latter measured as an indicator of cellular oxidative stress [4]. In addition, it is also known that the NSAID piroxicam consistently produces a decrease in the levels of blood ethanol in comparison to control animals [1].

The accumulation of triacylglycerides been attributed to a stimulatory effect of ethanol on fatty acid biosynthesis by the liver [5]. Another possibility is that the increase in liver triacylglyceride content results from the mobilization of fat depots. The aim of this work was to determine whether piroxicam has an action on lipolysis in a simple biological system such as the isolated rat adipocyte.

METHODS: Adipose tissue was obtained from epididymal fat pads of male Wistar rats, body weight 200-240 g. Fat epididymes were extracted from 3 rats, previously anesthetized with ether, and suspended in 2.3 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer plus 1% albumin, pH 7.37. The tissue was cut and then incubated at 37°C for 60 min with collagenase, type I (1 mg/ml). After disaggregation, adipocytes were washed and centrifuged three times. The supernatant was discarded.

Adipocytes were separated into six groups. Approximately 200 mg of adipocytes for each assay were resuspended in 200 µl of buffer. The first group was incubated in a final volume of 2 ml with different concentrations of epinephrine (20 µl added to bring final concentration to 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ and 10⁻⁴ M) using Ringer-Krebs containing 3% albumin. The second group was incubated with different concentrations of piroxicam (10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ and 10⁰ M). The third and fourth groups were incubated with different concentrations of epinephrine (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ and 10⁻⁴ M) combined with piroxicam at either 10⁻³ M or 10⁻² M. A fifth group was incubated with different concentrations of piroxicam (10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ and 10⁰ M) and a constant concentration of epinephrine equal to 5x10⁻⁸ M. The sixth group was incubated as a control in buffer without epinephrine or piroxicam. All groups were incubated at 37°C for 90 min. Glycerol release, a direct measure of lipolysis, was measured as described by Baranowski using ATP (0.15 M) and NAD⁺ (0.04 M) [6]. All the reagents were from SIGMA.

Analysis of variance was used for analysis of data. A difference was considered significant when p < 0.05.

RESULTS: Figure 1 shows the dose-response curve for epinephrine-stimulated lipolysis. The maximum production of glycerol, 150 µmol/g wet weight of cells, occurred at 10⁻⁴ M epinephrine. The ED₅₀ for epinephrine was 5x10⁻⁶ M. Piroxicam also stimulates lipolysis in a dose-dependent manner, with the maximum effect occurring at 10⁻⁶ M (Fig. 2). At higher concentrations, decreased lipolysis is seen.

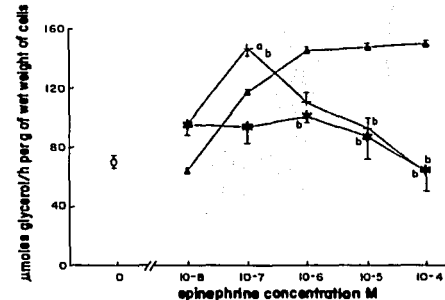


Figure 1. Effect of different concentrations of epinephrine on glycerol release in isolated rat adipocytes. Adipocytes were incubated with: different concentrations of epinephrine (▲); different concentrations of epinephrine in the presence of 10⁻³ M piroxicam (●); or different concentrations of epinephrine in the presence of 10⁻² M piroxicam (+). The control group is marked as (○). All groups were incubated for 90 min at 37°C. Vertical bars indicate SEM for four rats per group. *p < 0.05 compared with the control group, †p < 0.05 compared to epinephrine alone.

Adipocytes were incubated in the presence of different concentrations of epinephrine and a constant concentration of piroxicam (10⁻³ M or 10⁻² M) to test how lipolysis was affected by the NSAID. When piroxicam concentration was 10⁻³ M and epinephrine concentration was 10⁻⁸ M (Fig. 1), the levels of glycerol (95 µmol/g wet weight) were higher than when adipocytes were incubated only

with epinephrine (64 $\mu\text{mol/g}$). At 10^{-7} M epinephrine, glycerol production was also higher in the presence of piroxicam (146 $\mu\text{mol/g}$; $p < 0.05$) when compared with the values attained with epinephrine alone (117 $\mu\text{mol/g}$). Higher concentrations of epinephrine lead to a clear fall in the levels of glycerol produced in the presence of 10^{-5} M piroxicam.

On the other hand, when adipocytes were incubated with 10^{-7} M piroxicam in the presence of different concentrations of epinephrine, an inhibition of lipolysis was observed when compared with those cells that were incubated only with epinephrine ($p < 0.05$), except for the 10^{-8} M epinephrine concentration.

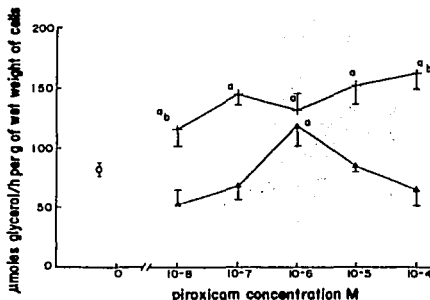


Figure 2. Effect of different concentrations of piroxicam on glycerol release in isolated rat adipocytes. The cells were incubated with: different concentrations of piroxicam (●); and different concentrations of piroxicam in the presence of 5×10^{-8} M epinephrine (+). The control group is marked as (○). All groups were incubated for 90 min at 37°C . Vertical bars indicate SEM for five rats per group. * $p < 0.05$ compared with the control group. * $p < 0.05$ compared to piroxicam alone.

Finally, when adipocytes were incubated with a constant concentration of epinephrine equal to the ED_{50} (5×10^{-8} M), and different concentrations of piroxicam, the levels of glycerol were superior to those found in adipocytes incubated with piroxicam alone (Fig. 2). The only exception was for 10^{-6} M piroxicam, where the levels of glycerol were 132 $\mu\text{mol/g}$, 145 $\mu\text{mol/g}$ and 118 $\mu\text{mol/g}$ for cells incubated with epinephrine plus piroxicam, epinephrine alone, and piroxicam alone, respectively.

DISCUSSION: Our results show a dual effect of piroxicam: (i) alone (10^{-6} M), it can stimulate lipolysis; and (ii) in the presence of high concentrations of epinephrine it can inhibit lipolysis.

When cells are incubated with a constant concentration of piroxicam (10^{-5} M) and different concentrations of epinephrine, a clear dual effect of piroxicam is seen. At 10^{-7} M epinephrine, the levels of glycerol are significantly above those of the control group (146 $\mu\text{mol/g}$ wet weight and 81 $\mu\text{mol/g}$, respectively, $p < 0.05$). On the other hand, at 10^{-4} M epinephrine, the levels of glycerol are significantly lower in the presence of piroxicam than seen in the cells incubated only with epinephrine (63 $\mu\text{mol/g}$ and 150 $\mu\text{mol/g}$, respectively, $p < 0.05$).

At first, these results suggested that the NSAID inhibition of lipolysis occurs only in the presence of high concentrations of epinephrine. But when the cells were incubated with a constant 10^{-7} M piroxicam and different concentrations of epinephrine, the levels of glycerol were always near to those of the control group (Fig. 1). This make us to conclude that the lipolytic inhibitory effect of piroxicam not only depends of the epinephrine concentrations but also of those of the NSAID.

Furthermore, when the adipocytes were incubated with a constant 5×10^{-8} M epinephrine with different concentrations of piroxicam, the results do not show a lipolytic inhibitory effect of the NSAID (Fig. 2); the levels of glycerol were always higher than those of the control group, and higher than those found for the cells incubated only with 10^{-8} M epinephrine (116 $\mu\text{mol/g}$ for the group with epinephrine, 5×10^{-8} M, and piroxicam, 10^{-8} M; 71 $\mu\text{mol/g}$ for the control group; and 64 $\mu\text{mol/g}$ for the group given only epinephrine, 10^{-8} M, $p < 0.05$). The last affirms that the effect of piroxicam depends of the concentration of epinephrine.

Piroxicam inhibits the epinephrine-mediated lipolytic effect. Further experiments are needed in order to know if piroxicam interacts at the level of the adrenergic receptor, the messenger, or if it has a direct action on the hormone-dependent lipase.

REFERENCES

- Zentella de Piña M, Hernandez-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Díaz Belmont A & Piña E: FEBS 298: 123 (1992).
- Zentella de Piña M, Corona S, Rocha-Hernandez AE, Saldaña Balmori Y, Cabrera G & Piña E: Life Sci 54: 1443 (1992).
- Insel PA: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed. (eds) PA Goodman Gilman, TW Rall, AS Nies & P Taylor, Pergamon, New York 1990, p. 638.
- Bondy SC & Pearson KR: Alcohol Clin Exp Res 17: 651 (1993).
- Lieber CS & Spritz N: J Clin Invest 45: 1400 (1966).
- Baranowski T: J Biol Chem 180: 535 (1949).

SPIN-TRAPPING STUDIES ON THE EFFECTS OF NON-STEROIDAL
ANTIINFLAMMATORY DRUGS (NSAID'S) ON HYDROXYL AND
HYDROXYETHYL FREE RADICALS *IN VITRO*.

Miguel Castrejón S. * (1), José Luis Boldú O. **, Eduardo Muñoz P. **,
Martha Zentella de P. *, Enrique Piña G. * and Roberto Gleason V. ** (2).

* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

** Departamento de Estado Sólido, Instituto de Física.

Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 04510, México, D. F.

(1) Inscrito en el Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina;
Becario, CONACYT.

(2) Inscrito en el Programa de Doctorado en Física de Materiales, CICESE.

Abstract

Recent work has shown that several non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) prevent free-radical mediated biochemical changes in rat liver after acute intoxication with ethanol. The precise mechanism by which these agents induce such effects is not known. Thus, the influence of NSAIDs on hydroxyl and hydroxyethyl free radical production in a Fenton type reaction system was tested *in vitro* using spin-trapping techniques. The drugs chosen were considered as representatives of each of the NSAIDs families and included acetylsalicylic acid, naproxen, diclofenac, phenylbutazone, mefenamic acid, piroxicam (PIR) and nimesulide. Among these drugs, only piroxicam showed the ability to reduce the EPR (Electron Paramagnetic Resonance) signal intensity of oxygen- and carbon-centered radical adducts in a dose dependent fashion and also to induce the formation of different adduct species. Possible interaction with reaction media metals was ruled out using divalent cation chelators during the assay. Other NSAIDs showed no meaningful effect in the range of concentrations tested. It is proposed that piroxicam is a hydroxyl free-radical scavenger that may form less-reactive radical species in order to explain those effects found under *in vivo* conditions. Other NSAIDs failed to reproduce such effects *in vitro* at least with the radical species tested. Thus, these drugs may have a different mechanism of action than piroxicam or a different spectrum for scavenging free-radical species other than hydroxyl radicals.

Please send correspondence and reprint requests to: Miguel Castrejón Sosa, M. D., Depto. De Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. A. Postal 70159, México, D. F. 04510, México. Fax: (525)5483603.

Introduction.

Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are widely used compounds in the treatment of nonspecific inflammatory disorders. Many of their therapeutic effects have been explained to date in terms of the well documented inhibitory action of these drugs on the synthesis of such intercellular mediators as prostaglandins and thromboxanes (Wolf, 1984). However, the existence of other possible mechanisms of action, such as direct interaction with intracellular mediators, has become evident. Chemical diversity of these drugs is indeed a fact that supports the possibility of many more modes of action, not yet described, for these agents (Abramson, Korchak *et al*, 1985).

Through *in vitro* radiolysis techniques in aqueous diluted solutions, it has been shown that some of these NSAIDs are capable of interacting with hydroxyl radicals, turning themselves into free-radicals ("scavenger effect") and thus lowering the hydroxyl radical concentration in the reaction media (Hiller and Wilson, 1983). However, it is not known if all of the NSAIDs share the same effect or if it is reproducible in *in vivo* situations.

Studies carried out in *in vitro* free-radical production systems, using phenylhydrazine autooxidation and the Fenton reaction as models, have shown that captopril, an antihypertensive drug, initially considered a free-radical scavenger, inhibited radical production by interacting with transition metals (i.e., iron, copper) included in the reaction media as electron donors (Jay, Cuellar, *et al*, 1991). This could be an alternative mechanism, theoretically at least, for other drugs to be able to induce similar effects.

Recently, it has been shown that piroxicam (4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridil)-2 H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide) (PIR), an NSAID, at a therapeutic concentration (i.e., 100 μ M), prevents increased levels of lipid peroxidation derived compounds in rat liver extracts induced by acute ethanol ingestion (Zentella de Piña, Hernández-Tobias, *et al*, 1992). Since lipid peroxidation is used as an indirect marker of free-radical formation *in vivo*, it was suggested that PIR may inhibit free radical production or act as a free-radical scavenger itself. Although it has been demonstrated that other NSAIDs exert similar changes decreasing the hepatic lipid peroxidation promoted by ethanol (Zentella de Piña, Saldaña-Balmori, *et al*, 1993), the precise molecular mechanism of such effects is not known.

Since free-radical overproduction has been implicated in the pathogenesis of ethanol-related hepatic diseases (Videla, and Valenzuela, 1982), such as cirrhosis, a better understanding of the action of these drugs could lead to a more rational therapeutic strategy in the prevention and management of these clinical entities.

Previous Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy studies using spin-trapping techniques demonstrated that ibuprofen (2-(4-isobutyl-phenyl) propanoic acid), another NSAIDs, was able to scavenge hydroxyl radicals and formed a different kind of radical species in the process (Hamburger, and Mc Cay, 1990). Similar *in vitro* studies carried out in our laboratory have shown that PIR induces phenyl radical (phe.) (a non-oxygen centered radical) formation in a dose-dependent fashion but failed to reproduce this effect when tested with hydroxyethyl radicals (et-HO.) (an oxygen-centered radical) in the reaction media (Castrejón, Boldú, *et al*, 1996). These results appear to contradict those obtained in the *in vivo* studies previously mentioned. However, since alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN), a non-selective spin-trap was used in this initial stage, the possibility that PIR may induce the formation of different free-radical species than those obtained under basal conditions (i.e. phe. or et-HO. radicals) could not be ruled out. If such radical species are truly formed and turned out to be less reactive than those initially produced, *in vitro* experiments would totally agree with results obtained under *in vivo* conditions.

In order to determine the possible mechanism of action of NSAIDs that explain their *in vivo* effects, we decided to undertake *in vitro* spin-trapping studies using both a hydroxyl radical (HO.) producing system and a more selective spin trap, 5,5-dimethylpyrrolidine-N-oxide (DMPO). The NSAIDs chosen were considered to be representative of each of the seven chemical families of these drugs and were the following: acetylsalicylic acid (ASA), naproxen (NAX), phenylbutazone (PHB), nimesulide (NMS), mefenamic acid (MFA), diclofenac (DCF) and PIR.

Materials And Methods.

The reaction system contained ferrous sulfate (1 μ M), DMPO (10 mM), all in a potassium phosphate buffer (150 mM; pH 7.4), for a final reaction volume of 400 μ L.

Radical formation was started by the addition of hydrogen peroxide (H_2O_2) (1 mM). Another series of studies was carried out in the presence of ethanol (100 mM) in the reaction media. Reaction products were measured after 4 minutes of incubation at room temperature, in an anaerobic atmosphere, using a glove box filled with gaseous nitrogen under saturation conditions.

The concentrations of NSAIDs tested were 6, 12, 25, 50, 100 and 200 μM of each drug (PIR, ASA, NAX, PHB, NMS, MFA and DCF). All drug concentrations represent the therapeutic range for their pharmacologic use.

The effect of diethylene-triamine-pentaacetic acid (DETAPAC), a divalent-cation chelating agent, at a 100 μM concentration, in the first series of studies was also evaluated.

EPR measurements were recorded using a Varian E-line Century Series E112 band-X spectrometer, with a rectangular TE102 cavity. Spectra were achieved with 1 Gauss p.p. modulation at 100 KHz. Other recording conditions were: Central Field 3339 Gauss, sweep 100 Gauss, time constant 0.5 sec., sweeping time 4 minutes.

All the reactants were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and were of the highest purity grade available.

Results.

Characteristic EPR spectra of the hydroxyl radical adduct of DMPO (DMPO-OH.) ($a_N=14.8\pm 0.2$ Gauss; $a_H=14.8\pm 0.2$ Gauss) (Buettner, 1987) were obtained under baseline conditions. When PIR was added to the reaction system, the height of DMPO-OH. signals was decreased in a dose-dependent mode; a five-fold decrease was observed with a 200 mM final drug concentration. Simultaneously, a different signal pattern was recorded ($a_N=16.0\pm 0.2$ Gauss; $a_H=22.8\pm 0.2$ Gauss) (Buettner, 1987) and its maximum height reached when using top PIR concentrations (Figure 1).

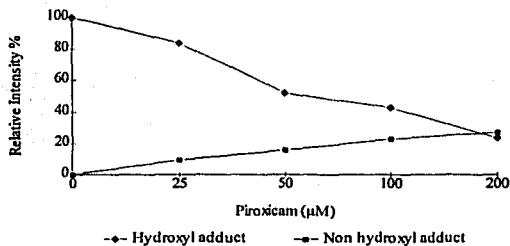


Figure 1.- Effect of PIR on DMPO-HO[•] adduct production in an *in vitro* Fenton reaction system. Reaction medium included 1 mM ferrous sulfate, 10 mM DMPO, 1 mM H₂O₂, 150 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. Note the dose dependent effect of PIR on the above described system; top curve describes the fall of DMPO-HO[•] signal's medium height and bottom curve the rise of non DMPO-HO[•] signal (dose range: 25-200 µM). Recording conditions were: central field 3330 Gauss, sweep 100 Gauss, modulation frequency 100 KHz, amplitude 1 Gauss p.p., time constant 0.25 sec., sweeping time 4 min.

Similar results were obtained when testing PIR in the presence of DETAPAC in the reaction medium (Figure 2). No signals were recorded when PIR (at a 100 µM dose) was added to a reaction medium lacking ferrous sulfate but containing every other reactant.

In those experiments carried out in the presence of ethanol, typical hydroxyethyl radical-DMPO adduct (DMPO-etHO[•]) signals were recorded ($a_{H\beta} = 16.2 \pm 0.2$ Gauss; $a_{H\alpha} = 23.4 \pm 0.2$ Gauss) (Buettner, 1987). Although an initial mild increase at 25 µM PIR concentration was shown, a similar decrease of signal intensity resulted at 50, 100 and 200 µM doses of PIR; maximum (60%) of signal reduction was also achieved at a 200 µM dose (Figure 3). No different signals from those corresponding to DMPO-etHO[•] were obtained in this case.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

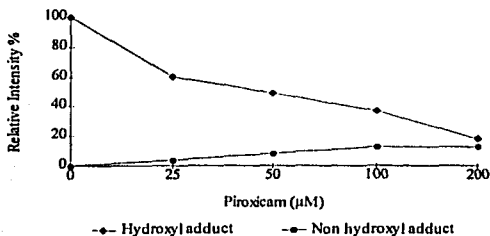


Figure 2.- Effect of PIR on DMPO-HO[•] production in a Fenton reaction *in vitro* system containing 100 mM DETAPAC. Reaction media composition is the same as in figure 2, excepting the presence of the chelating agent at the previously mentioned concentration. Note the aforementioned described dose dependence of the DMPO-HO[•] signals' decrease and the non-DMPO-HO[•] increase. The dose range used is the same as in figure 1, as well as the recording conditions.

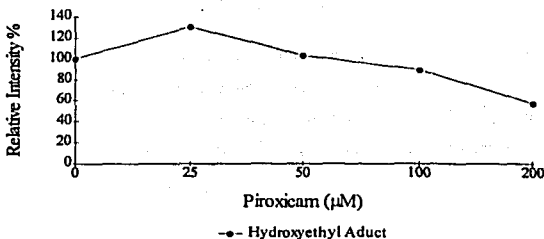
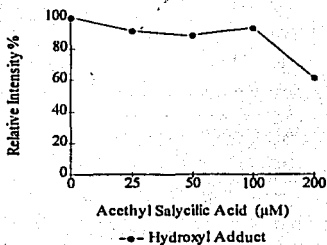
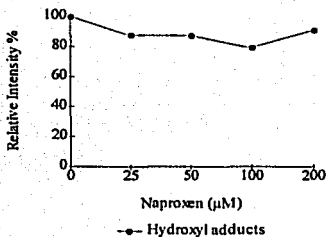


Figure 3.- Effect of PIR on DMPO-etHO[•] production in a Fenton type *in vitro* reaction system. Reaction medium is the same as in previous figures, with the addition of 100 mM ethanol. Note that the previously mentioned dose dependent effect is consistent in decreasing the DMPO-etHO[•] signal medium height and that the overall effect is very similar to the one found in figures 1 and 2; There were no non-DMPO-etHO[•] signals detected. Dose range employed and recording conditions were the same as described previously.

When the other NSAIDs were tested, similar results were not produced. ASA showed nearly a 40% of signal reduction at a 200 μM concentration, without any significant change at lower concentrations (Figure 4a). NAX showed a maximal 20% signal reduction at 200 μM concentration but failed to improve the effect with 200 μM achieving a less than 10 % of reduction (Figure 4b), PHB and NMS showed no effect at all (Figures 4c and d). MFR and DSF caused a maximal 15% and 20% reduction respectively, but both drugs failed to show a concentration dependent effect (Figures 4e and f). In none of these experiments, were new radical species formed, as a consequence of the presence of the NSAIDs in the reaction media.



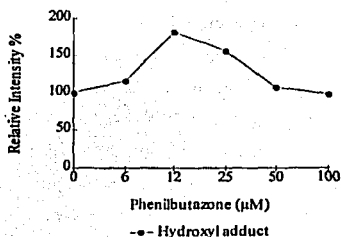
4a



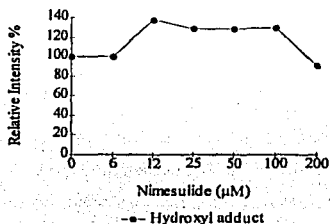
4b

Figure 4 continued on next page...

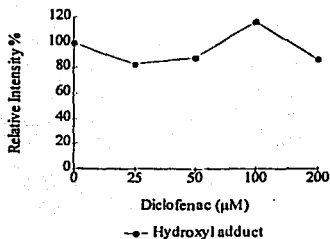
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



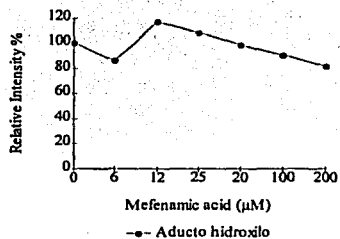
4c



4d



4e



4f

Figure 4.- Effect of NSAIDs on DMPO-HO[•] production in an *in vitro* Fenton type reaction. Reaction medium composition is the same as before. Figure 4a shows the effect of ASA; figure 4b the effect of NAX; figure 4c the effect of PHB; figure 4d the effect of NMS ; figure 4e the effect of MFA; and figure 4f the effect of DCF. Dose range employed and recording conditions were the same as before.

Studies carried out with the ethanol-containing reaction media showed similar results as those described above (data not shown).

Discussion.

The results of the present *in vitro* study suggest that PIR acts as a free radical scavenger. Since the height of the EPR signal is proportional to the number of free radicals produced in the medium, putative scavengers should be able to reduce the signal-

height of spin-adducts derived from the radical species to be scavenged (Blasig, Ebert, *et al.*, 1988). In view of the fact that PIR exerted such an effect in our investigation, we concluded that the drug is capable of reacting with HO. radicals formed during the Fenton reaction and of generating new free radical species.

An alternative explanation for our findings could be an interaction of the NSAIDs with the divalent metals in the incubation medium. If the metals were chelated, HO. radicals would not be formed in the absence of an adequate reducing agent. Such a possibility is ruled out when testing PIR in the presence of DETAPAC, a chelating agent that enhances free-radical formation when used as part of Fenton type reactions, as reported by previous studies (Jay, Cuellar, *et al.*, 1992). Under these conditions, DETAPAC would prevent PIR-metal complex formation without interfering with radical production. However, PIR produced its effect even in the presence of DETAPAC, thus excluding a possible interaction with iron. On the other hand, radical formation was not induced in the absence of iron sulfate in the reaction media even when PIR was present. This indicates that metals and no other reactant (including PIR) could serve as an electron donor in the reaction medium.

Moreover, in both instances (with and without DETAPAC), a different signal from that corresponding to DMPO-HO. was recorded. Since EPR signals are more or less radical-specific, we concluded that a different kind of radical was being formed as hydroxyl radicals were being scavenged. Consistent with previously mentioned studies carried out with ibuprofen (Jay, Cuellar *et al.*, 1991), our data suggest that PIR may be forming an organic carbon-centered species of free-radical when scavenging HO., as indicated by the analysis of the hyperfine splitting pattern of the EPR spectra obtained (Buetner, G. R., 1987). Further studies are needed for the identification of the specific PIR derived DMPO adduct formed under these conditions.

It is also evident from the studies carried out in the presence of ethanol that PIR can scavenge carbon-centered radicals as et-HO. radicals. This finding may explain the previously mentioned effects of PIR observed in our laboratory (Castrejón, Boldú, *et al.*, 1996) when the drug was tested during the autoxidation of phenylhydrazine. In such experiments, phenylhydrazine was used as a source of phe., a carbon-centered radical, and PBN as the spin-trap. PIR increased the PBN-phe. adduct signal's medium height, in a dose-dependent fashion, by inducing the formation of different carbon-centered free-radical species (i.e., PIR-radicals) that could also be spin-trapped, under those conditions. It would seem that PIR has a relatively broad-spectrum scavenging action.

The results described in this report are of particular interest when trying to explain those obtained under *in vivo* conditions. PIR prevents biochemical changes in the rat liver induced during acute ethanol intoxication apparently by scavenging free radicals. Interaction with metals for such an effect would seem a probable mechanism in light of

our results. Moreover, since PIR simultaneously led to the production of different radical species than those originally formed, it is possible that PIR may induce the production of less reactive, thus less harmful, radicals under these conditions. Both actions would make PIR a very useful agent in preventing such changes in experimental as well as in clinical situations.

Furthermore, it is well known that HO \cdot is formed during the early stages of alcohol induced hepatic changes and that it is a primary enhancer (by autopropagation mechanisms) of alcohol induced free-radical mediated changes (Videla, and Valenzuela, 1982). If PIR is capable of scavenging different free radical species (i.e., oxygen-centered and carbon-centered), then it may probably be acting from the initiation of the chain of events that result from ethanol metabolism as well as in the later stages, when carbon-centered radicals are formed from membrane lipids and other organic molecules. Such a diverse role would be highly desirable in a drug intended to be used in the prevention of free radical formation.

Although PIR was shown to be effective in our studies, the other NSAIDs tested (ASA, NAX, PHB, NMS; MFA and DCF) failed to show a clear-cut effect. Of particular interest is the fact that none of these compounds demonstrated an ability to generate different signals than those obtained under basal conditions. This finding along with the fact that no reduction greater than 40% (in the case of ASA) could be achieved using any of these drugs, compared with the 80% decrease reached with PIR, leads us to conclude that other NSAIDs may not have a hydroxyl-radical scavenging effect. This finding is not consistent with previous *in vivo* studies. Nevertheless, such effects could be explained if a scavenger action for radical species other than HO \cdot could be achieved by these drugs. Many different species of radicals may be generated in the model used under the *in vivo* conditions. Since free-radicals show the ability to autopropagate, turning other molecules in the surrounding media into radicals themselves, it may be a difficult task to characterize the nature of all the different radical species formed.

In summary, alcohol-related diseases are frequently associated with the ability to overproduce highly reactive free radicals. Some of the consequent diseases are progressive and irreversible, as in the case of cirrhosis. Strategies to prevent these degenerative processes are desirable. In this regard therapeutic agents such as PIR may prove useful.

Acknowledgment

This investigation was supported, in part, by grant IN-210094 from DGAPA, UNAM, México.

References

- Abramson, S.; Korchak, H.; Ludewig, R.; Edelson, H.; Haines, K.; Levin, R.I.; Herman, R.; Rider, L.; Kimmel, S.; Weissmann, G. (1985); Modes of action of aspirin-like drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7227-7231.
- Blasig, I. E.; Ebert, B.; Hanke, T.; Lowe, H. (1988); Hydroxyl radical scavenging action of cardioactive drugs compared to standard antioxidants: an ESR-spin trap study. Pharmazie. 43:139-140.
- Buettner, G.R. (1987); Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts. Free Rad. Biol. Med. 3:259-303.
- Castrejón, M.; Boldú, J.L.; Muñoz, E.; Zentella de Piña, M.; Piña, E.; Gleason, R. (1996); Effects of piroxicam on two *in vitro* free-radical production systems (phenylhydrazine autooxidation and Fenton reaction). Submitted for publication at Free Radical Res. Commun. (November, 1996.)
- Hamburger, S. A.; Mc Cay, P.B. (1990); Spin trapping of ibuprofen radicals: evidence that ibuprofen is a hydroxyl radical scavenger. Free Rad. Res. Commun. 9:337-342.
- Hiller, K.O.; Wilson, R.L. (1983); Hydroxyl-free radicals and antiinflammatory drugs: biological inactivation studies and reaction rate constants. Biochem. Pharmacol. 32:2109-2111.
- Jay, D.; Cuéllar, A.; Jay, E.G.; Garcia, D.; Gleason, R.; Muñoz, E. (1992); Study of a Fenton type reaction: effect of captopril and chelating reagents. Arch. Biochem. Biophys. 298:740-746.
- Jay, D.; Cuéllar, A.; Zamorano, R.; Muñoz, E.; Gleason, R. (1991); Captopril does not scavenge superoxide: captopril prevents O_2^- production by chelating copper. Arch. Biochem. Biophys. 290:001-005.
- Videla, L.A.; Valenzuela, A. (1982); Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: Metabolic interrelations and pathological implications. Life Sci. 31:2395-2407.
- Zentella de Piña, M.; Hernández-Tobías, A.; Saldaña -Balmori, Y.; Díaz-Belmont, A.; Piña, E. (1992); Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Lett. 298:123-125.
- Zentella de Piña, M.; Saldaña-Balmori, Y.; Hernández-Tobías, A.; Piña, E. (1993); Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. Alcohol. Clin. Exp. Res. 17:1228-1232

COPYRIGHT © 1996 BY
PJD PUBLICATIONS LIMITED, P.O. BOX 966, WESTBURY, NY 11590



Reprinted from

European Journal of Pharmacology

European Journal of Pharmacology 317 (1996) 225–229

Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes

Yolanda Saldaña-Balmori, Martha Zentella de Piña *, Raquel Guinzberg,
Alma Rocha-Hernández, Enrique Piña

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. Postal 70159, México 04510 D.F., México

Received 12 August 1996; revised 6 September 1996; accepted 10 September 1996



European Journal of Pharmacology

The EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY publishes full length papers, short communications and rapid communications on the mechanisms of action of chemical substances affecting biological systems. The journal also considers short reviews (not exceeding 12 pages in print) intended to debate recent advances in rapidly developing fields that are within its scope.

Full length papers and short communications are grouped under the following headings: Behavioral pharmacology, Neuropharmacology and analgesia, Cardiovascular pharmacology, Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology, Endocrine pharmacology, Immunopharmacology and inflammation, and Molecular and cellular pharmacology.

Manuscripts submitted to the journal are accepted on the understanding that: (1) they are subject to editorial review, (2) they have not been and will not be published in whole or in part in any other journal, and, (3) the recommendations from the declaration of Helsinki and the internationally accepted principles in the use of experimental animals have been adhered to.

Abridged 'General instructions' for authors are published at the end of each issue. Essential detailed instructions will be found in the 'Notice to authors', published once yearly (for 1996, in Vol. 295, No. 1, page vii).

Founded in 1967. Founding editors: David de Wied and Jacques van Rossum.

Editors: W.H. GISPEN, Utrecht (chairman) J. BRUINVELS, Utrecht P.P. NIJKAMP, Utrecht D.H.G. VERSTEEG, Utrecht

Honorary editor: D. DE WIED

Editorial board:

C. ADVENIER, Paris
K. AKTORIES, Freiburg im Breisgau
J. ARNT, Valby
P.J. BARNES, London
L. BARTHÓ, Pécs
G. BIGGIO, Cagliari
D.S. BREDD, San Francisco
O.E. BRODDE, Halle
H. BULT, Wilrijk
T.F. BURKS, Houston
F. CATTABENI, Milan
L.X. CUBEDDU, Caracas
M.G. DARLISON, Hamburg
S. ELLIS, Washington
M. ENDOH, Yamagata
J.A. GARCÍA-SÁINZ, Mexico City
G.F. GEBHART, Iowa City
M. HAMON, Paris
D. HOYER, Basel
E.C. HULME, London
D.A. KHARKEVICH, Moscow

Z. KLEINROK, Lublin
G. LAMBRECHT, Frankfurt/M
M. LAZDUNSKI, Valbonne
R. LEFEBVRE, Gent
X.Y. LI, Shanghai
S.A. LIPTON, Boston
M.J. LOHSE, Würzburg
W. LÖSCHER, Hannover
J.M. LUNDBERG, Stockholm
G.S. MARKS, Kingston
T. MASAKI, Kyoto
J. McCULLOCH, Glasgow
D.N. MIDDLEMISS, Harlow
K.P. MINNEMAN, Atlanta
H. MÖHLER, Zürich
F. MORONI, Florence
E.E. MÜLLER, Milan
S. NAHORSKI, Leicester
D.G. NICHOLLS, Dundee
H.R. OLPE, Basel
J.M. PFEILSCHIFTER, Basel

J.P. PIN, Montpellier
R. QUIRION, Verdun
J.A. RIBEIRO, Oeiras
P.J. ROBINSON, Newcastle
N. SAITO, Kobe
A. SARIA, Innsbruck
P.R. SAXENA, Rotterdam
A. SCHOUSBOE, Copenhagen
R. SCHULZ, München
W. SCHÜTZ, Wien
P. SKOLNICK, Bethesda
M. SOKOLOVSKY, Tel Aviv
J.C. STOCLET, Strasbourg
J.C. STOFF, Amsterdam
V.I. TEICHBERG, Rehovot
P.B.M.W.M. TIMMERMANS, Wilmington
T. TOMITA, Nagoya
D.J. TRIGGLE, Buffalo
B.J.R. WHITTLE, London
J. WIKBERG, Uppsala
R.J. WINQUIST, Ridgefield

Consultants:

B. AHRÉN, Malmö; E.A. BARNARD, London; E. BEUBLER, Graz; J. BOCKAERT, Montpellier; G. BURNSTOCK, London; R. BUSSE, Frankfurt/M; S.J. COOPER, Durham; R. COUTURE, Montreal; J.M. CRAWLEY, Bethesda; S.E. DAHLÉN, Stockholm; W. DE JONG, Strasbourg; G. DI CHIARA, Cagliari; H.N. DOODS, Biberach; G.J. DUSTING, Parkville; S.K. FISHER, Ann Arbor; A.W. FORD-HUTCHINSON, Dorval; J.R. FOZARD, Basel; B.B. FREDHOLM, Stockholm; D. GANTEN, Berlin-Buch; J.F. GIUDICELLI, Le Kremlin-Bicêtre; A.R. GREEN, London; R.J. GRYGLEWSKI, Kraków; A. HERMAN, Antwerpen; P. HOLZER, Graz; J.P. HUIDOBRO-TORO, Santiago; S.D. IVERSEN, Oxford; K.H. JAKOBS, Essen; H. KARAKI, Tokyo; S.J. KONTUREK, Kraków; R. LAVERTY, Dunedin; B.E. LEONARD, Galway; B.R. LUCCHESI, Ann Arbor; C.A. MAGGI, Florence; I.G. MARSHALL, Glasgow; M.J. MILLAN, Croissy-sur-Seine; R.J. MILLER, Chicago; A.H. MÜLDER, Amsterdam; T. NABESHIMA, Nagoya; R.J. NAYLOR, Bradford; M. NIELSEN, Roskilde; D.J. NUTT, Bristol; M. OTSUKA, Tokyo; J.M. PALACIOS, Barcelona; J.R. PARRATT, Glasgow; J.N. PENNEFATHER, Clayton; M. RAITERI, Genova; U. RAVENS, Essen; B.P. ROQUES, Paris; W. SCHLEGEL, Genève; H. SCHEOMAKER, Bagnac; K. SCHRÖR, Düsseldorf; K.F. SEWING, Hannover; P. SNEDDON, Glasgow; S.H. SNYDER, Baltimore; W. SOUDJIN, Leiden; N. SPERELAKIS, Cincinnati; K. STARKE, Freiburg im Breisgau; H.A.J. STRUYKER BOUDIER, Maastricht; J.R. WALTERS, Bethesda; J. ZAAOSMA, Groningen

Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes

Yolanda Saldaña-Balmori, Martha Zentella de Piña*, Raquel Guinzberg,
Alma Rocha-Hernández, Enrique Piña

Departamento de Biotecnología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. Postal 70159, México 04510 D.F., México

Received 12 August 1996; revised 6 September 1996; accepted 10 September 1996

Abstract

It has been reported that piroxicam prevents the hepatic increase of triacylglycerides and thiobarbituric acid-reactive substances observed after acute ethanol intoxication in rats and also causes a decrease in blood ethanol concentration. The aim of this study was to assess the effect of piroxicam on these 3 metabolic indicators, using isolated rat hepatocytes incubated with ethanol or lactate, supplemented or not with epinephrine. Epinephrine stimulated the consumption of lactate, but not of ethanol. In the isolated hepatocytes, and in a dose-dependent fashion, piroxicam alone raised the consumption of lactate and ethanol, increased the triacylglyceride pool in cells incubated with lactate or ethanol, and decreased the content of thiobarbituric acid-reactive substances in cells incubated with ethanol, but not with lactate. Epinephrine blocked these actions of piroxicam, except the lowering of the content of thiobarbituric acid-reactive substances. Thus, piroxicam helps to control the oxidative stress produced in isolated hepatocytes by ethanol.

Keywords: Epinephrine; Ethanol; Isolated hepatocyte; Piroxicam; Thiobarbituric acid-reactive substance; Triacylglyceride

1. Introduction

Ethanol is the most extensively toxic compound consumed by humans (Williams et al., 1988; Multi-authorial, 1990). Ninety percent of people drink alcohol, 40–50% of men have temporary ethanol-induced problems, and 10% of men and 3–5% of women develop pervasive ethanol-related problems (alcoholism). Even light drinking may adversely interact with other medications and temporary heavier drinking can exacerbate most medical illnesses (Schuckit and Irwin, 1988). Acute ethanol intoxication is an unresolved therapeutic episode: means to ameliorate the temporary toxic actions of high doses of ethanol are absent in the medical armamentarium. Thus compounds with a potential protective effect against the acute metabolic actions of ethanol deserve additional study. Previous data from our laboratory (Zentella de Piña et al., 1992, 1993) have shown that some nonsteroidal anti-inflammatory drugs partially prevent the increase in liver triacylglycerides and thiobarbituric acid-reactive substances, the latter measured as an indication of cellular oxidative stress (Bondy and Pearson, 1993). Both substances are produced during acute

intoxication of fasted rats with ethanol. In addition, one of the anti-inflammatory drugs tested, namely piroxicam, consistently produced a decrease in the levels of blood ethanol in comparison with those of control animals (Zentella de Piña et al., 1992). The aim of this work was to study the effect of piroxicam on the 3 studied indicators – triacylglycerides, thiobarbituric acid-reactive substances and ethanol consumption – in a simpler biological system, such as isolated rat liver cells, in order to facilitate the study of the actions of these nonsteroidal anti-inflammatory drugs, compounds which are extensively used in clinical medicine (Inset, 1990).

Ethanol was replaced by lactate in the control experiments, and the effect of piroxicam on the 3 above-mentioned indicators was also recorded. Epinephrine was routinely included in the assays since ethanol, in the doses used in the *in vivo* experiments reported before (Zentella de Piña et al., 1992), increases the concentration of epinephrine (Brodie and Maikel, 1963). Additionally, in a completely different system, nonsteroidal anti-inflammatory drugs antagonized the antihypertensive effect of β -adrenoceptor antagonists (Johnson et al., 1994). Thus, we explored whether some of the beneficial actions of piroxicam in ethanol intoxication might be a consequence of a

* Corresponding author. Tel.: (52-5) 623-2168; Fax: (52-5) 616-2419.

combined action of epinephrine and the anti-inflammatory compounds.

2. Materials and methods

Male Wistar rats (200–250 g) were fed ad libitum on a commercial diet (Nutricubos from México) supplemented with minerals and vitamins in order to achieve an optimal growth rate. Animals were fasted 48 h before treatment, but free access to water was permitted. Isolated hepatocytes were prepared by the method of Berry and Friend (1969) as detailed previously (Guinzberg et al., 1987). Cell viability was assayed by the trypan blue exclusion method; experiments were performed when 90% viability was recorded. The isolated cells were incubated as described in the figure legends. After incubation, triacylglyceride content, thiobarbituric acid-reactive substances production, lactate and ethanol consumption and protein concentration were quantified. Each assay was routinely performed in duplicate.

Triacylglycerides were extracted with heptane and hydrolyzed with KOH as described (Gottfried and Rosenberg, 1973). Glycerol was then oxidized with periodate and the resulting formaldehyde condensed with acetylacetone to form a yellow dehydrolutidine derivative, which was measured colorimetrically. Lipid peroxidation was quantified by the thiobarbituric acid-reactive substances method previously described in detail (Zentella de Piña et al., 1993). The concentration of thiobarbituric acid-reactive substances in the samples can be calculated using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wills, 1969). For ethanol or lactate quantification, 50- μl aliquots of the complete incubation mixture, including hepatocytes, were placed in 400 μl of ice-cold 0.33 M perchloric acid, at zero time and after 1 h of incubation. Tubes were stirred and then centrifuged; samples of the supernatants were used to measure either ethanol or lactate. Ethanol was quantified by the Berni and Gutmann technique (Berni and Gutmann, 1974): the amount of ethanol, in the presence of an excess of NAD^+ and alcohol dehydrogenase (alcohol:NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.1), is proportional to the amount of NADH formed, which was measured spectrophotometrically. Lactate was determined by the Gutmann and Wahlefeld method (Gutmann and Wahlefeld, 1974) according to the same principle but replacing alcohol dehydrogenase by lactate dehydrogenase (L-lactate:NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27). Protein was determined as described (Bradford, 1976), using bovine albumin as standard. Statistical analyses were made by analysis of variance (Zar, 1984a) for each piroxicam concentration, followed by pairwise comparisons by Tukey (Zar, 1984b) or by Fisher (Levy, 1976). Data recorded in control cells vs. those obtained in cells treated with each concentration of piroxicam were compared by using the Student *t*-test. A difference was considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

The consumption of lactate or ethanol by the isolated hepatocytes is presented in Fig. 1. As expected, in the absence of piroxicam, epinephrine stimulated the utilization of lactate ($P < 0.05$) but not ethanol in hepatocyte cells obtained from fasted rats. Piroxicam alone increased, in a dose-dependent fashion, the consumption of lactate, this increase being significant when the concentration of the anti-inflammatory drug reached 10^{-6} M ($P < 0.05$) and 10^{-5} M ($P < 0.01$), compared to the values recorded without piroxicam. Simultaneous addition of epinephrine and piroxicam resulted in an apparent mutual antagonism of the effects of the compounds. Individual values varied widely and the effect was not statistically significant. Similarly, piroxicam alone increased ethanol consumption; the response was dose-dependent from 10^{-9} M to 10^{-6} M ($P < 0.05$ for 10^{-6} M). The actions of the anti-inflammatory drug on ethanol utilization were the same in hepatocytes incubated in the presence of epinephrine, but the increase was not statistically significant (Fig. 1).

The content of triacylglycerides at the end of the 60-min incubation was similar in hepatocytes incubated with lactate or ethanol, with or without epinephrine (Fig. 2). Independent of the presence or absence of epinephrine, piroxicam produced a dose-dependent rise in the pool of triacylglycerides: the difference between the triacylglyceride content of cells incubated with lactate without piroxicam vs. that of cells incubated with 10^{-5} or 10^{-4} M piroxicam was significant at $P < 0.05$; for cells incubated with ethanol without piroxicam and those incubated with 10^{-6} M piroxicam the difference was significant at $P < 0.05$, with 10^{-5} M piroxicam the difference was significant ($P = 0.021$), and with 10^{-4} M piroxicam the difference was significant also ($P = 0.014$). The differences in triacylglyceride content were significant by analysis of vari-

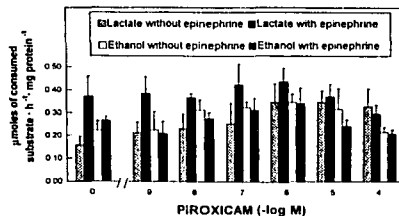


Fig. 1. Effect of piroxicam, in the absence or in the presence of $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ epinephrine, on the consumption of lactate or ethanol by isolated hepatocytes. Isolated rat liver cells, equivalent to $10\text{--}15 \text{ mg}$ of protein, were incubated under continuous shaking in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, supplemented with 50 mM sodium lactate pH 7.4 or 50 mM ethanol, in an atmosphere of O_2/CO_2 (19:1), for 60 min, at 37°C . Each bar represents the average \pm standard error with $n = 4\text{--}9$.

ance test at 10^{-5} M piroxicam. Pairwise comparisons by Fisher's least-significant difference test indicated that with 10^{-5} M piroxicam the difference in triacylglyceride content between cells incubated with ethanol without epinephrine vs. with ethanol and with epinephrine was just significant ($P = 0.049$) and the difference between cells incubated with ethanol without epinephrine vs. those incubated with lactate with epinephrine was significant at $P = 0.017$ (Fig. 2). The combination of epinephrine and piroxicam produced a moderate stimulation, which was not significant, in the triacylglycerides pool of hepatocytes incubated with lactate. This stimulation was not observed in the cells incubated with ethanol.

Without piroxicam, but in the presence of epinephrine, the isolated liver cells had lower values of thiobarbituric acid-reactive substances when incubated with ethanol instead of with lactate ($P < 0.05$, Fig. 3). No significant differences were observed among the other 3 groups of cells incubated in the absence of piroxicam, namely, lactate or ethanol without epinephrine, and lactate with epinephrine. The anti-inflammatory compounds show a tendency to decrease the amount of thiobarbituric acid-reactive substances in liver cells incubated with lactate but without epinephrine. The piroxicam-induced lowering of the content of thiobarbituric acid-reactive substances in cells was more evident when ethanol was the substrate ($P < 0.05$ comparing control values vs. 10^{-4} piroxicam) and was observed even in the presence of epinephrine (Fig. 3).

Significant differences in the amount of thiobarbituric acid-reactive substances were found by analysis of variance for 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M piroxicam. Tukey's pairwise comparison for 10^{-6} M piroxicam indicated differences in thiobarbituric acid-reactive substances between cells incubated with ethanol with epinephrine and those incubated with lactate with epinephrine ($P = 0.033$); for 10^{-5} M piroxicam, the difference between cells incubated with ethanol without epinephrine and cells incubated with lactate with epinephrine was significant at $P = 0.033$, and

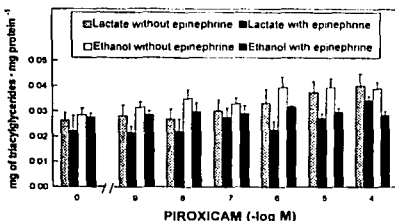


Fig. 2. Effect of piroxicam, in the absence or in the presence of 1×10^{-6} M epinephrine, on the pool of triacylglycerides in isolated hepatocytes incubated with lactate or ethanol. Experimental conditions and symbols are as described in Fig. 1.

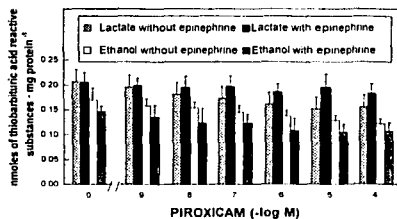


Fig. 3. Effect of piroxicam, in the absence or in the presence of 1×10^{-6} M epinephrine, on the content of thiobarbituric acid-reactive substances in isolated hepatocytes incubated with lactate or ethanol. Experimental conditions and symbols are as described in Fig. 1.

for cells incubated with ethanol with epinephrine vs. cells incubated with lactate with epinephrine the difference was significant at $P = 0.011$; finally for 10^{-4} M piroxicam, cells incubated with ethanol without epinephrine vs. cells incubated with lactate with epinephrine the difference was significant at $P = 0.029$, and for cells incubated with ethanol with epinephrine vs. cells incubated with lactate with epinephrine the difference was significant at $P = 0.016$.

4. Discussion

This paper describes attempts to characterize the actions of a nonsteroidal anti-inflammatory drug that counteracts some of the acute effects of ethanol in the rat. With this aim isolated hepatocytes in which lactate consumption was increased by epinephrine (Fig. 1) were adopted as a simpler and more reliable model than the whole animal. Therefore, previous results obtained with piroxicam treatment of ethanol-intoxicated rats (Zentella de Piña et al., 1992) were compared with the data recorded in this work with isolated cells incubated with ethanol and increasing doses of the anti-inflammatory compound.

In rats acutely intoxicated with ethanol, piroxicam consistently produces a decrease in the blood concentration of ethanol in comparison with control animals without piroxicam. On that basis, it was suggested that piroxicam stimulates hepatic ethanol oxidation (Zentella de Piña et al., 1992). The increase in ethanol consumption observed in hepatocytes incubated without epinephrine (Fig. 1), but with doses of piroxicam considered in the therapeutic range (Insel, 1990), is compatible with the previous suggestion. Interestingly, piroxicam alone stimulated also, and to a greater extent, the consumption of lactate by hepatic cells from fasted rats (Fig. 1). Studies designed to elucidate whether the effect of piroxicam on lactate consumption includes a stimulation of its oxidation or of its conversion to some storage molecule (glycogen or triacylgly-

erides) are required. In regard to the piroxicam-mediated stimulation of substrate oxidation, an alternative that should be experimentally considered includes activation of the NADH shuttle, leading to recycling of NAD^+ and thereby overcoming the limiting step in their hepatic oxidation (Meijer et al., 1975; Brand and Murphy, 1987, for a general review).

The nonsteroidal anti-inflammatory drug prevents the hepatic increase in triacylglycerides resulting from acute intoxication of rats with ethanol (Zentella de Piña et al., 1992). In the isolated hepatocytes incubated without epinephrine, piroxicam produced opposite results: a dose-dependent significant increase in the pool of triacylglycerides (Fig. 2). It is of interest that such an increase was directly proportional to the amount of substrate consumed (with a correlation coefficient, $r = 0.85$), independent of whether the substrate was lactate or ethanol, but only in the absence of epinephrine. In any event, the *in vitro* results (Fig. 2) are opposite to the *in vivo* ones (Zentella de Piña et al., 1992). In this respect it could be concluded that the action of piroxicam in the whole rat, whereby the ethanol-mediated accumulation of hepatic triacylglycerides is avoided, is related to the mobilization of storage lipids from adipose tissue. There are reports that acute ethanol administration activates the liberation of free fatty acid from adipose tissue (Di Luzio, 1963) and that a different nonsteroidal anti-inflammatory drug, acetyl salicylic acid, inhibits this mobilization (Carlson et al., 1965). The interference of epinephrine in the action of piroxicam on triacylglycerides in isolated hepatocytes (Fig. 2) deserves further study.

In rats acutely intoxicated with ethanol, piroxicam can lessen the hepatic increase in malondialdehyde produced by the hepatotoxic compound (Zentella de Piña et al., 1992). In a similar fashion, the anti-inflammatory drug decreased the content of malondialdehyde, here reported as thiobarbituric acid-reactive substances (Fig. 3), in hepatocytes incubated with lactate or ethanol. Assuming that thiobarbituric acid-reactive substances are indicative of cellular oxidative stress, the results in Fig. 3 are consistent with *in vitro* studies showing an inhibitory action of piroxicam on the release of superoxide radicals from activated neutrophils (Kaplan et al., 1984) and from isolated Kupffer cells in primary cultures (Miranda et al., 1995). Although the underlying mechanism for this protective action of piroxicam remains unknown, it is of interest that piroxicam, both *in vivo* and *in vitro*, and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs *in vivo* (Zentella de Piña et al., 1993) share the action of preventing the hepatic increase in thiobarbituric acid-reactive substances resulting from the acute exposure to ethanol. This information could be important due to the widespread clinical use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Insel, 1990).

In the *in vivo* experiments, piroxicam prevented the hepatic increase in triacylglycerides and thiobarbituric acid-reactive substances elicited by alcohol intoxication. It

was then considered that a smaller pool of triacylglycerides might result in a lower production of thiobarbituric acid-reactive substances (Zentella de Piña et al., 1992). Moreover, in the *in vitro* studies piroxicam alone produced an inverse relationship between triacylglycerides (Fig. 2), which increased, and thiobarbituric acid-reactive substances (Fig. 3), which decreased. Therefore, these indicators of the response to piroxicam are independent, at least at the level of isolated liver cells.

Our data are insufficient to document an epinephrine-piroxicam interaction, like the one analyzed between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and β -adrenoceptor antagonist (Johnson et al., 1994). In general, the actions of piroxicam were best observed in the absence of added epinephrine.

In conclusion, in isolated rat liver cells piroxicam contributes to controlling the oxidative stress produced by incubation with ethanol. This simple model for studying the action of piroxicam is suitable for use in further studies.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Héctor J. Delgadillo for his support in statistical analysis, to Gabriel Moreno-Campero for technical assistance and to Mrs. Rosa María Hidalgo for the secretarial collaboration. This research was partially funded by Grant No. IN210094 from DGAPA, UNAM, México.

References

- Bent, E. and I. Gutman, 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edn., ed. H.U. Bergmeyer (Verlag Chemie-Academic Press, New York, NY) p. 1399.
- Berry, M.N. and D.S. Friend, 1969. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 43, 506.
- Bondy, S.C. and K.R. Pearson, 1993. Ethanol induced oxidative stress and metabolic status. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17, 651.
- 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. Biochem.* 72, 248.
- Brand, M.D. and M.P. Murphy, 1987. Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol. Rev.* 62, 141.
- Brodie, B.B. and R.P. Maikel, 1963. Role of the sympathetic nervous system in drug-induced fatty liver. *Ann. NY Acad. Sci.* 104, 1059.
- Carlson, L.A., J. Boberg and B. Hogstedt, 1965. Some physiological and clinical implications of lipid mobilization from adipose tissue. In: *Handbook of Physiology-Adipose Tissue*, eds. A.E. Renold and G.F. Cahill (American Physiological Society, Washington, DC) p. 643.
- Di Luzio, N.R., 1963. Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants. *Physiologist* 6, 169.
- Gouffred, S.P. and B. Rosenberg, 1973. Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triacylglycerides. *Clin. Chem.* 19, 1077.
- Guinzberg, P.R., I. Laguna, A. Zentella, R. Guzmán and E. Piña, 1987.

- Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.* 245, 371.
- Gutmann, I. and A.W. Wahlefeld, 1974, L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD, in: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edn., ed. H.V. Bergmeyer (Verlag Chemie-Academic Press, New York, NY) p. 1464.
- Insel, P.A., 1990, Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout, in: *Goodman and Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edn., eds. A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies and P. Taylor (Pergamon Press, New York, NY) p. 638.
- Johnson, A.G., T.V. Nguyen and R.O. Day, 1994, Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 121, 289.
- Kaplan, H.B., H.S. Edelson, H.M. Kotchak, W.P. Given, S. Abramson and G. Weissmann, 1984, Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on human neutrophil functions in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 33, 371.
- Levy, K.J., 1976, A multiple range procedure for independent correlations. *Educ. Psychol. Meas.* 36, 27.
- Meijer, A.J., G.M. Van Weerkom, J.R. Williamson and J.M. Tager, 1975, Rate-limiting factors in the oxidation of ethanol by isolated rat liver cells. *Biochem. J.* 150, 205.
- Miranda, J.S., C. Jolley, H. Holube, D. Earnest, I.G. Sipes and M.D. Ramirez-González, 1995, Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (AINES) on Kupffer cell function (Kc). *Gac. Med. Mex.* 131, 78.
- Multi-authorial, 1990, Secretaría de Salud, Sistema Nacional de Encuestas de Salud, Encuesta Nacional de Adicciones, Alcohol, México, Secretaría de Salud.
- Schuckit, M.A. and M. Irwin, 1988, Diagnosis of alcoholism. *Med. Clin. N. Am.* 72, 1133.
- Williams, G.D., B.F. Grant, F.S. Siltson, T.S. Zobeck, S.S. Aitken and J. Noble, 1988, Trends in alcohol-related morbidity and mortality. *Public Health Rep.* 103, 592.
- Wills, E.D., 1969, Lipid peroxide formation in microsomes. The role of non-haem iron. *Biochem. J.* 113, 325.
- Zar, J.H., 1984a, Multisample hypotheses: the analysis of variance, in: *Biostatistical Analysis*, 2nd edn. (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ) p. 163.
- Zar, J.H., 1984b, Multiple comparisons. The Tukey test, in: *Biostatistical Analysis*, 2nd edn. (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ) p. 186.
- Zentella de Piña, M., A. Hernández-Tobías, Y. Saldaña-Balmori, A. Diaz-Belmonte and E. Piña, 1992, Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett.* 298, 123.
- Zentella de Piña, M., Y. Saldaña-Balmori, A. Hernández-Tobías and E. Piña, 1993 Non-steroidal anti-inflammatory drugs lower ethanol mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17, 1228.

Butylated Hydroxytoluene Prevents Hepatic Damage Induced by Food Oil

JAVIER TERRAZOS-LUCH, SERGIO CORONA-GARCÍA, MARTHA ZENTELLA-DE PIÑA*, M. DOLORES RAMÍREZ-GONZÁLEZ & ENRIQUE PIÑA-GARZA

Departments of Biochemistry & Pharmacology, Faculty of Medicine, National University of Mexico, P.O. BOX 70-159, Mexico City 04510, Mexico

SUMMARY: A rapid and reproducible model of fatty liver in rats was developed by injecting corn oil (sc). In preliminary experiments, the mortality due to acute ethanol intoxication was significantly higher in this model of acutely fattened animals [1]. Lipid peroxidation is a process that involves free radicals and consumes as substrate unsaturated fatty acids, which are present in great amounts in corn oil. Thus, in this work we explored whether the acute loads of corn oil increased hepatic lipid peroxidation. The three markers of cellular oxidative stress measured in fatty livers from rats injected with corn oil were: the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), liver content of triacylglycerides (TAG), and total glutathione (GSH-GSSG). All were significantly modified. We also studied the effect of butylated hydroxytoluene (BHT), a free radical scavenger frequently used in the food industry to prevent lipid oxidation [2,3], and found that it prevented the effect of corn oil on TBARS and TAG but enhanced the depletion of GSH-GSSG caused by the acute administration of large loads of corn oil.

INTRODUCTION: Corn oil is a vehicle frequently used to prepare injections of water-insoluble drugs. This vehicle is used for either acute or chronic treatments based on the assumption that has no effects on its own. However, in previous work from our laboratory we noticed that acute loads of corn oil significantly enhances the lethality of ethanol in mice [1]. Hence, in this work we studied whether acute loading with corn oil could induce oxidative stress in rat liver and whether a lipid antioxidant such as butylated hydroxytoluene [2,3] could modify the effect of large loads of fat given acutely.

MATERIALS AND METHODS:

Animals. Male Wistar rats (180-220 g body weight) were bred at the vivarium of the Faculty, fed with Purina rat chow and water *ad libitum*, and kept under a regular light-dark cycle (10:14 h) in acrylic cages with wood shavings.

Experimental groups. The animals were randomly distributed in four groups as follows: *Control* (1 ml of corn oil, po, four times every 12 h); *Corn oil* (1 ml po of corn oil and 4 ml of corn oil/sc four times every 12 h); *BHT* (0.12 mg or 1500 mg/kg of body weight/po diluted in 1 ml of corn oil, four times every 12 h). The doses of BHT were selected taking as a reference the concentration of BHT used as a food additive and the value of the LD₅₀ for rats as reported by Deichmann

[4]; *Corn oil plus BHT* treated rats received either 0.12 or 1500 mg/kg, po, of BHT diluted in 1 ml of corn oil plus 4 ml of corn oil/sc four times every 12 h.

Animals were killed by decapitation 12 h after treatment. The liver was excised immediately and kept on ice and processed within the following hour for TBARS, TAG, GSH-GSSG and protein content.

Biochemical determinations. Liver homogenates were prepared in double distilled water (1:9, w/v). TBARS, TAG and GSH-GSSG were measured following the methods described by Zentella *et al.* [5], Gottfried *et al.* [7], and Akerboom [6], respectively. TBARS and TAG are expressed per mg of protein, measured by the method of Bradford, using bovine serum albumin as standard [8].

Statistical analysis. Results are expressed as the mean value \pm standard error. Comparisons were made by analysis of variance followed by Student's *t* test when appropriate. A significant difference is accepted with $p < 0.05$.

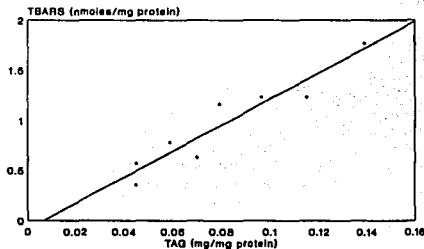


Figure 1. Graphical analysis of the data from Table 1. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS): nmol/mg of protein; Triacylglycerides (TAG): mg/mg protein. The Figure illustrates how the extent of hepatic lipid peroxidation depends on the amount of TAG available.

RESULTS: An acute load of large quantities of corn oil significantly increased the liver content of TBARS and TAG (57.6% and 94.9% over control values, $p < 0.05$) and caused a significant depletion of total GSH (26% of control value, $p < 0.05$) (Table 1). The administration of BHT alone significantly decreased the content of TBARS and TAG, but only in those groups that received 1.5 g/kg po (44% and 76% of control value, respectively; $p < 0.05$). By contrast, with either dose of BHT (0.12 or 1500 mg/kg; po), total GSH content in the liver was lower

Table 1. Effect of BHT on the corn oil-induced fatty liver in rats

Treatment	TBARS (nmol/mg protein)	TAG (mg/mg protein)	GSH-GSSG (μ mol/g wet weight)
Control	0.78 \pm 0.10 (20)	0.059 \pm 0.008 (15)	7.04 \pm 0.3 (12)
Corn oil	1.23 \pm 0.16* (19)	0.115 \pm 0.001* (16)	5.14 \pm 0.62* (12)
BHT (0.12 mg/kg)	0.63 \pm 0.10 (4)	0.070 \pm 0.012 (5)	5.05 \pm 1.09* (7)
BHT (1500 mg/kg)	0.35 \pm 0.23* (7)	0.045 \pm 0.004* (6)	3.79 \pm 0.84* (6)
Corn oil plus BHT (0.12 mg/kg)	1.16 \pm 0.22* (6)	0.079 \pm 0.009** (5)	4.02 \pm 0.91* (6)
Corn oil plus BHT (1500 mg/kg)	0.56 \pm 0.05** (5)	0.045 \pm 0.007** (6)	3.40 \pm 0.36** (5)

The figures given are mean value \pm standard error estimated for the number of rats indicated in parenthesis: * $p < 0.05$, when compared with the values measured in the control group; ** $p < 0.05$, comparing the corn oil treated group versus the BHT plus corn oil treated group.

than in the control group (71% and 54% of control values; $p < 0.05$).

When BHT was given in combination with the large load of corn oil, the levels of TBARS, TAG and total GSH were lower than those observed in the corn oil-treated group. However, there were significant differences ($p < 0.05$) for TAG with the low dose of BHT and in the three indicators of oxidative stress when 1500 mg/kg (po) of BHT were used (Table 1): 45, 39 and 66% of the corn oil-treated group for TBARS, TAG and GSH-GSSG, respectively.

When the different levels of TBARS attained are plotted as a function of their corresponding concentrations of TAG, a significant correlation was obtained ($r = 0.97$; $p < 0.05$); i.e. the extent of hepatic lipid peroxidation is in direct relation with the amount of fat (TAG) available (Fig. 1). No correlation was found between the total content of GSH and TAG or TBARS; i.e. the levels of TAG or TBARS do not vary as a function of the GSH-GSSG available.

These results indicate that corn oil indeed produces a significant fatty liver and oxidative stress that triggers a depletion of GSH. These data also indicate that BHT significantly attenuates the oxidative stress caused by corn oil. This is probably due to a further mobilization of GSH from the liver.

DISCUSSION: Our results indicate that BHT, a food additive used as an antioxidant, can effectively prevent the oxidative stress caused by the acute load of large doses of corn oil in rat liver. This effect appears to be associated with a significant reduction in the hepatic content of total GSH (Table 1).

Total GSH includes the reduced (GSH) and oxidized form (GSSG) which normally are in equilibrium due to the endogenous coupling to vitamins C and E which interplay within a redox system using a net intake of electrons from

NADH [9]. It is well documented that when total GSH is measured the reduced form is in greater proportion. Thus, the total serves as a valid indication of the antioxidant activity of the tissue [6]. However, when the quantity of xenobiotic exceeds the capacity of this system, GSSG tends to accumulate and is quickly eliminated in the bile [10]. In this work we provided the liver tissue with a huge concentration of unsaturated lipids which, as shown by the measurement of TBARS (Table 1), were rapidly oxidized, probably to peroxy radicals, which must be neutralized at least in part via the GSH pathway. The persistence of elevated TAG and TBARS leads to a depletion of total GSH. It is noteworthy that even smaller amounts of corn oil (one fifth, as in the control rats; Table 1) can produce a level of lipid peroxidation which is susceptible to the antioxidant properties of the large dose of BHT (as shown by the decrease of 56% in the content of TBARS and the 47% reduction of the total hepatic GSH) as shown by the comparison between control versus BHT treated groups. The dose of 0.12 mg/kg of BHT alone had no effect on the level of hepatic TAG and TBARS, but it caused a significant depletion of GSH-GSSG, an effect that is enhanced in the presence of large loads of corn oil.

In conclusion: (i) large doses of fat acutely given cause hepatic oxidative stress and depletion of total GSH; (ii) BHT used in low doses, similar to those employed as a food additive, can cause significant depletion of hepatic GSH; and (iii) the antioxidant ability of BHT is only observed with large doses in this model of fattened rats. It remains to be established how BHT is modifying the metabolism of GSH.

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by a grant from DGAPA-UNAM IN-213695. Javier Terrazos-Luch is a member of the Programa AFINES, Medicina-UNAM.

REFERENCES

1. Acosta AM, Rivera AA, et al.: Proc West Pharm Soc 37: (1994).
2. Allen JR: Arch Environ Health 31: 43 (1976).
3. Snipes W, Person S, et al.: Science 188: 64 (1975).
4. Deichman, Clemmer JJ, et al.: Arch Ind Health 11: 93 (1955).
5. Zentella M, Saldaña BY, et al.: Alcohol Clin Exp Res 17: 1228 (1993).
6. Akerboom T and Sies H. Methods in Enzymology 77: 373 (1976).
7. Gottfried SP and Rosenberg B: Clin Chem 19: 1077 (1973).
8. Bradford M: Anal Biochem 72: 248 (1976).
9. Commandeur JNM, Stijntjes CJ, et al.: Pharmac Rev 47: 273 (1995).
10. Lauterburg BH, Smith CV et al.: J Clin Inv 73: 124 (1984).

744

**EFFECTS OF PIROXICAM ON TWO *IN VITRO* FREE RADICAL
PRODUCTION SYSTEMS (PHENYLHYDRAZINE AUTOOXIDATION AND
FENTON REACTION)**

M. Castrejón S. +, M. Zentella de Piña and E. Piña*
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

*J.L. Boldú O., E. Muñoz P. and R.J. Gleason V.***
Departamento de Estado Sólido, Instituto de Física.

Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70159
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

Abstract

Piroxicam, a non-steroidal antiinflammatory drug, can prevent free radical mediated changes during experimental acute alcoholic intoxication in rats. The precise mechanism of such effects is not known. Other drugs have shown an ability to interfere with metals in the reaction media or to scavenge free radicals in *in vitro* studies. The present report becomes a first-stage approximation in order to gain insight about the role of piroxicam in free radical production systems *in vitro*. For this aim, spin-trapping studies were carried out during the auto-oxidation process of phenylhydrazine and Fenton reaction separately, in the presence of piroxicam. The spin adducts were measured by EPR. Piroxicam increased free radical production during the autooxidation of phenylhydrazine and decreased it in the Fenton reaction system at high concentrations. The possible interaction of piroxicam with metals in the reaction media is discarded as well as a phenyl and hydroxyethyl radicals scavenger effect. Other possible mechanisms explaining such effects are discussed.

Introduction

Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are one of the more widespread used compounds in contemporary medicine. Their therapeutic applications spectrum runs from nonspecific inflammatory states to thrombosis prevention in high-risk individuals. Members of this pharmacologic family are of a very diverse nature, both in their chemical

*Inscrito en el Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina; Becario CONACYT.

**Inscrito en el Programa de Doctorado en Física de Materiales, CICESE.
+ To whom correspondence should be addressed.

structure and pharmacokinetics. Nevertheless, they share most of their biological effects. (Ellenhorn and Barceloux, 1988).

Such therapeutic effects are explained mostly in terms of their ability to prevent the production of some biochemical cellular mediators (such as prostaglandins and thromboxanes), and other biological effects of these agents have become evident as well. Direct interaction of some NSAIDs with cellular metabolites has been demonstrated (Abramson, Korchak, *et al.*, 1985). In spite of the great chemical diversity of the members of this pharmacological group, the mechanisms of action of these drugs is diverse and subject to research.

It has been shown (Mihalic, Hofman *et al.*, 1986) that piroxicam (an NSAID, 4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-2 H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide) at therapeutic concentrations (i.e. 100 μ M), prevented acute alcohol-induced enhancement hepatic cellular lipid peroxidation in the rat. Hepatic cell lipid peroxidation has been associated with free radical production during hepatic alcohol metabolism and also reputedly implicated in some forms of alcohol-mediated liver damage (Zentella de Piña, Hernández-Tobías, *et al.*, 1992).

Although some other NSAIDs assayed to date have shown similar actions, the precise molecular mechanism (or mechanisms) of action for this effect remains obscure (Zentella de Piña, Saldaña-Balmori, *et al.*, 1993). An important breakthrough in therapeutic strategies for such diseases as alcoholic hepatitis or cirrhosis may result from the detailed knowledge and manipulation of these drugs actions.

Through radiolysis *in vitro* studies, it has been shown that some of these NSAIDs (piroxicam was not tested) were capable of scavenging hydroxyl radicals (Hiller and Wilson, 1983). Nevertheless, it is not known if all the drugs in this group show this effect or if it is reproducible in an *in vivo* setting.

In electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) studies with *in vitro* free radical-producing systems, it was found that captopril (a non-NSAID used in the treatment of hypertension) initially considered a free radical scavenger, inhibited free radical production by interacting with the transition metals used as electron donors in

such systems (Jay, Cuéllar *et al.*, 1991). This may be an alternative mechanism of action, hypothetically at least, for different drugs with similar effects.

In order to find if piroxicam prevented free radical formation by interaction with metals in the reaction media or if it acts as a radical-scavenger itself, we decided to test this NSAID in two different systems producing free radicals *in vitro* (phenylhydrazine autooxidation and Fenton reaction) and to measure its effects with EPR spin-trapping techniques.

Materials and Methods.

Phenylhydrazine was obtained from Sigma Chemical Co., MO, in the highest purity grade available; alpha-phenyl-N-t-butyl nitronc (PBN), the spin trap used was also from Sigma Chemical Co. Other reagents used were standard laboratory purity grade.

Phenylhydrazine was incubated in aerobic media, according to conditions detailed elsewhere (Jay, Cuéllar, *et al.*, 1992). Sodium borate (25 mM, pH 10.2) was used as buffer in the reaction mixtures, which also contained PBN (3 mM). The reaction was started when cupric chloride (CuCl_2) 0.01 mM was added. The final sample volume was 500 μl . Piroxicam at 12, 25, 50 and 100 μM concentrations was added to different samples without final volume change. EPR measurements were undertaken in a Varian E-Line Century Series E112, X-band 3 spectrometer, with a rectangular Te 102 cavity. Spectra were recorded with 1 Gauss p.p. modulation at 100 KHz.

For the Fenton reaction studies, hydrogen peroxide (H_2O_2) of the highest purity grade was obtained from Sigma Chemical Co., as well as ferrous sulphate (FeSO_4). PBN, of the same source as noted above, was used as spin-trap again. All other reagents were of standard laboratory purity grade.

Fenton reaction studies were carried out in phosphate buffer media, as previously reported (Reinke, Rau *et al.*, 1990), containing 150 mM of the potassium salt at pH 7.4 and 100 mM ethanol. In this case, reactions were undertaken in anaerobic conditions, using a nitrogen-saturated atmosphere created inside a glove box. The media also contained PBN (10 mM) and FeSO_4 (1mM). The reaction was started with the addition of H_2O_2 to a final volume of 500 μL . The concentrations of piroxicam tested in this experimental setting were 25, 50, 100 and 200 μM . Non-aqueous extractions were

performed by adding 750 μL of toluene to enhance the half-lives of the spin-adducts. The measured sample volume placed inside the spectrometer cavity was 350 μL . EPR signals were recorded under the same spectrometer conditions as before, after 4 minutes of incubation.

Results

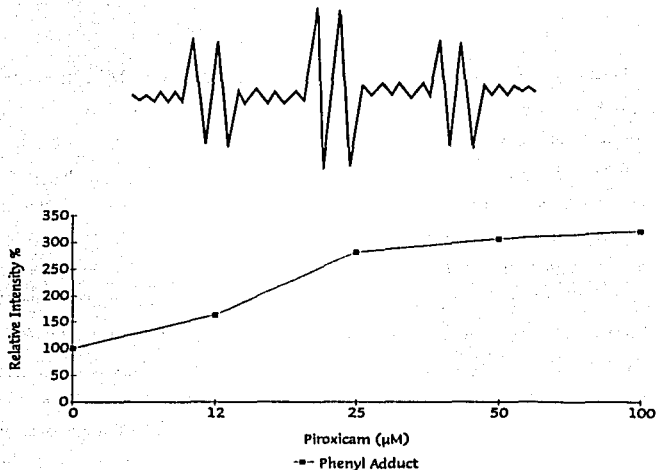


Figure 1.- Effect of piroxicam on phenyl radical production during the autooxidation of phenylhydrazine *in vitro*. Top figure shows typical phenyl-PBN adduct EPR spectral signal pattern recorded at baseline conditions (i.e. PBN 3 mM; phenylhydrazine 1 mM; CuCl_2 0.01 mM; sodium borate buffer 25 mM, pH 10.2). Bottom figure shows the effect of the addition of 12, 25, 50 and 100 μM concentrations of piroxicam to the reaction mixture. Note the rise of the relative intensity of the EPR signal in a dose-dependent fashion to the NSAID concentration. Recording conditions were: Central Field 3330 Gauss, Sweep 100 Gauss, Modulation Frequency 100 KHz, Amplitude 1 Gauss p.p., Time Constant 0.25 sed., Sweeping Time 4 min.

In the first system, piroxicam did not alter free radical production when the autooxidation of phenylhydrazine was started with the addition of CuCl_2 . In a second set

of experiments, CuCl_2 was excluded from the incubation medium. Under these conditions phenylhydrazine autooxidation was started by piroxicam. When the concentration of the drug in the medium was increased, there was a concomitant increase in the EPR signal, a response that may be conceived as an increase in spin-adduct formation and thus of free radical.

The effect of piroxicam on the Fenton reaction system (Figure 2) was studied. No appreciable change in the formation of spin-adducts was detected using the lower three concentrations of the drug. When higher concentrations (100 and 200 μM) of piroxicam were added a decrease in free radical production was observed.

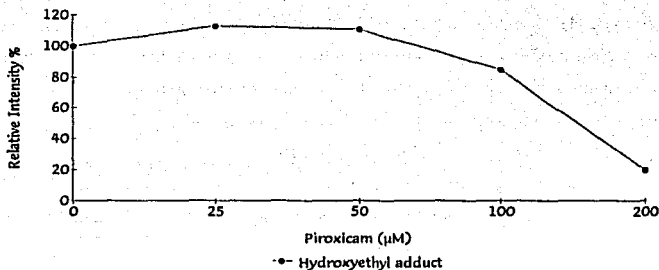


Figure 2.- Effect of piroxicam on hydroxyethyl production in a Fenton reaction *in vitro* system. The figure shows the effect of the addition of 25, 50, 100 and 200 μM concentrations of piroxicam to the reaction mixture (i.e. PBN 10 mM; FeSO_4 1 mM; H_2O_2 1 mM; potassium phosphate 150 mM, pH 7.4 and ethanol 100 mM). Note the fall in EPR signal relative intensity with the 100 and 200 μM concentrations of the drug. Recording conditions are same as before in figure 1.

Discussion.

During phenylhydrazine autooxidation, piroxicam apparently increases free radical formation in the absence of metals in the reaction medium. Since in the presence of metals the drug does not alter free radical production, a possible metal-trapping mechanism as well as a radical scavenger effect (for phenyl-radical species, at least) may be ruled out. It is worth mentioning that since PBN is not a highly selective spin-trap, it is

not possible to assure that the radical species produced by the effect of piroxicam on phenylhydrazine were the same as those generated during autooxidation process in the absence of the NSAID or those in the metal-induced reaction.

During Fenton reaction studies, there were no piroxicam-induced changes on the hydroxyethyl-radical production, except at very high concentrations. Such changes may not have meaningful biological effects.

Although these data are apparently in contradiction with the results obtained in *in vivo* conditions, the possibility that piroxicam may induce the production of less reactive and thus harmful radical species than those usually produced within liver cells cannot be discarded. Both radical systems tested in this work generate carbon-centered (i.e. phenyl and hydroxyethyl) radicals (Buettner, 1987). Further studies must be carried out using both free radical production systems that generate other than carbon-centered (oxygen-centered, as hydroxyl or superoxide) radicals and more selective spin-traps.

Acknowledgments.

This investigation was supported, in part, by grant IN-210094 from DGAPA, UNAM, México. The authors would like to thank Orison R. Huerta Encinas and Jorge A. Velázquez Ortiz for their technical support.

References.

- Abramson, S.; Korchak, H.; Ludewig, R.; Edelson, H.; Haines, K.; Levin, R.I.; Herman, R.; Rider, L.; Kimmel, S.; Weissmann, G. (1985); Modes of action of aspirin-like drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7227-7231.
- Buettner, G.R. (1987); Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radical Biol. Med.* 3:259-303.
- Ellenhorn, M.J. and Barceloux, D.G. (1988). Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. 1st. Ed. Elsevier Publishing Co., New York, p.p. 492-498.
- Hiller, K.O.; Wilson, R.L. (1983); Hydroxyl free radicals and antiinflammatory drugs: biological inactivation studies and reaction rate constants. *Biochem. Pharmacol.* 32:2109-2111.
- Jay, D.; Cuéllar, A.; Jay, E.G.; Garcia, D.; Gleason, R.; Muñoz, E. (1992); Study of a Fenton type reaction: effect of captopril and chelating reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 298:740-746.

- Jay, D.; Cuéllar, A.; Zamorano, R.; Muñoz, E.; Gleason, R. (1991); Captopril does not scavenge superoxide: captopril prevents O_2^- production by chelating copper. Arch. Biochem. Biophys. 290:001-005.
- Mihalic, M., Hofman, H., Kufinec, J., Krile, B., Caplar, V., Kajfez, F. and Blazevic, N. (1986). Piroxicam. Anal. Prof. Drug Subs., 15, 511-530.
- Reinke, L.A., Rau, J.M. and Mc. Cay, P.B. (1990). Possible roles of free radicals in alcoholic tissue damage. Free Radical Res. Comm. 9, 205-211.
- Zentella de Piña, M.; Hernández-Tobías, A.; Saldaña -Balmori, Y.; Díaz-Belmont, A.; Piña, E. (1992); Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Lett. 298:123-125.
- Zentella de Piña, M.; Saldaña-Balmori, Y; Hernández-Tobías, A.; Piña, E. (1993); Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. Alcohol. Clin. Exp. Res. 17:1228-1232

COPYRIGHT © 1997 BY
PJD PUBLICATIONS LIMITED, P.O. BOX 966, WESTBURY, NY 11590



Reprinted from

European Journal of Pharmacology

European Journal of Pharmacology 380 (1999) 49–59

Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes

Héctor Riveros-Rosas ^{a,*}, Martha Zentella de Piña ^a, Raquel Guinzberg ^a,
Yolanda Saldaña-Balmori ^a, Adriana Julián-Sánchez ^a, Alfredo Saavedra-Molina ^b,
Enrique Piña ^a

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. Postal 70139, Mexico, DF, 04510, Mexico

^b Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, 58030, Mexico

Received 22 February 1999; received in revised form 15 July 1999; accepted 20 July 1999



European Journal of Pharmacology

THE EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY publishes full-length papers, short communications and rapid communications on the mechanisms of action of chemical substances affecting biological systems. The journal also considers short reviews (not exceeding 12 pages in print) intended to debate recent advances in rapidly developing fields that are within its scope.

Full length papers and short communications are grouped under the following headings: Behavioral pharmacology, Neuropharmacology and analgesia, Cardiovascular pharmacology, Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology, Endocrine pharmacology, Immunopharmacology and inflammation, and Molecular and cellular pharmacology.

Manuscripts submitted to the journal are accepted on the understanding that: (1) they are subject to editor review, (2) they have not been and will not be published in whole or in part in any other journal and (3) recommendations of the Declarations of Helsinki and Tokyo, for humans, and the European Community guidelines as accepted principles for the use of experimental animals have been adhered to. The European Journal of Pharmacology will, therefore, only consider manuscripts that describe experiments which have been carried out under approval of an institutional or local ethics committee. Authors must state in the manuscript that protocol complies with the particular recommendation and that approval of their protocols was obtained.

Abridged 'General instructions' for authors are published at the end of each issue. Essential detailed instructions will be found in the 'Notice to authors', published once yearly (for 1999, in Vol. 364, No. 1, pages v-x).

Founded in 1967. Founding editors: David de Wied and Jacques van Rossum.

Editors: W.H. GISPEN, Utrecht (chairman) J. BRUINVELS, Utrecht P.P. NIJKAMP, Utrecht D.H.G. VERSTEEG, Utrecht

Honorary editor: D. DE WIED

Editorial board:

C. ADVENIER, Paris
K. AKTORIJS, Freiburg im Breisgau
J. ARNT, Vailby
P.J. BARNES, London
L. BARTHÓ, Pécs
G. BIGGIO, Cagliari
D.S. BREDT, San Francisco
O.E. BRODDE, Halle
H. BULT, Wilrijk
T.F. BURKS, Houston
F. CATTABENI, Milan
M.G. DARLISON, Hamburg
M. ENDOH, Yamagata
J.A. GARCÍA-SÁINZ, Mexico City
G.F. GEBHART, Iowa City
M. HAMON, Paris
D. HOYER, Basel

E.C. HULME, London
D.A. KHARKEVICH, Moscow
Z. KLEINROK, Lublin
G. LAMBRECHT, Frankfurt/M
M. LAZDUNSKI, Valbonne
R. LEFEBVRE, Gent
X.Y. LI, Shanghai
S.A. LIPTON, Boston
M.J. LOHSE, Würzburg
W. LÖSCHER, Hannover
T. MASAKI, Kyoto
J. McCULLOCH, Glasgow
D.N. MIDDLEMISS, Harlow
K.P. MINNEMAN, Atlanta
H. MÖHLER, Zürich
F. MORONI, Florence
S. NAIHORSKI, Leicester

D.G. NICHOLLS, Dundee
J.M. PFEILSCHIFTER, Basel
J.P. PIN, Montpellier
R. QUIRION, Verdun
J.A. RIBEIRO, Lisbon
P.J. ROBINSON, Newcastle
A. SARIA, Innsbruck
P.R. SAXENA, Rotterdam
A. SCHOUSBOE, Copenhagen
R. SCHULZ, München
P. SKOLNICK, Indianapolis
M. SOKOLOVSKY, Tel Aviv
J.C. STOCLET, Strasbourg
D.J. TRIGGLE, Buffalo
B.J.R. WHITTLE, London
J. WIKBERG, Uppsala
R.J. WINQUIST, Ridgefield

Consultants:

B. AHRÉN, Malmö; E.A. BARNARD, Cambridge; E. BEUBLER, Graz; J. BOCKAERT, Montpellier; R. BUSSE, Frankfurt/M.; S.J. COOPER, Liverpool; R. COUTURE, Montreal; J.M. CRAWLEY, Bethesda; S.E. DAHLÉN, Stockholm; W. DE JONG, Strasbourg; G. DI CHIARA, Cagliari; H.N. DOODS, Biberach; G.J. DUSTING, Parkville; A.W. FORD-HUTCHINSON, West Point; J.R. FOZARD, Basel; B.B. FREDHOLM, Stockholm; J.F. GIUDICELLI, Le Kremlin-Bicêtre; A.R. GREEN, London; R.J. GRYGLEWSKI, Kraków; A. HERMAN, Antwerpen; P. HOLZER, Graz; J.P. HUIDOBRO-TORO, Santiago; K.H. JAKOBS, Essen; H. KARAKI, Tokyo; S.J. KONTUREK, Kraków; R. LAVERTY, Dundee; B.E. LEONARD, Galway; B.R. LUCCHESI, Ann Arbor; C.A. MAGGI, Florence; M.J. MILLAN, Croissy-sur-Seine; R.J. MILLER, Chicago; A.H. MULDER, Amsterdam; T. NABESHIMA, Nagoya; D.J. NUTT, Bristol; M. OTSUKA, Tokyo; J.M. PALACIOS, Barcelona; J.R. PARRATT, Glasgow; J.N. PENNEFATHER, Clayton; M. RAITERI, Genova; U. RAVENS, Essen; B.P. ROQUES, Paris; H. SCHÖMAKER, Bagnoux; K. SCHRÖR, Düsseldorf; K.F. SEWING, Hannover; S.H. SNYDER, Baltimore; N. SPERELAKIS, Cincinnati; K. STARKE, Freiburg im Breisgau; H.A.J. STRUYKER BOUDIER, Maastricht; J. ZAAGSMA, Groningen

153

Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes

Héctor Riveros-Rosas ^{a,*}, Martha Zentella de Piña ^a, Raquel Guinzberg ^a,
Yolanda Saldaña-Balmori ^a, Adriana Julián-Sánchez ^a, Alfredo Saavedra-Molina ^b,
Enrique Piña ^a

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. Postal 70159, México, DF, 04510, México

^b Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, 58003, México

Received 22 February 1999; received in revised form 15 July 1999; accepted 20 July 1999

Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most employed therapeutic agents. They have a wide spectrum of biological effects, some of which are independent of cyclooxygenase inhibition, such as the alterations on the components of signal transduction systems. In particular, previous data from our laboratory suggested an antagonism between epinephrine and piroxicam, one of the most prescribed NSAIDs. Thus, this study deals with the epinephrine–piroxicam antagonism recorded for metabolic responses in isolated rat hepatocytes. The obtained results show that epinephrine stimulates lactate and ethanol consumption, stimulates glucose release from lactate only, and has no effect on cellular triacylglycerides content. Otherwise, in a dose-dependent basis, piroxicam stimulates lactate and ethanol consumption accompanied by an increase in triacylglycerides content, without changes in glucose release by hepatocytes. Piroxicam blocks the epinephrine-induced stimulation of glucose release from lactate, and epinephrine blocks the piroxicam-mediated increase in triacylglycerides content from lactate or ethanol. In contrast, the effects of epinephrine and piroxicam, promoting the consumption of lactate and ethanol, are not antagonized or added after the simultaneous administration of both compounds. This last result is probably related to the ability of both compounds to stimulate oxygen consumption. On isolated rat liver mitochondria, μ molar doses of piroxicam partially uncouple oxidative phosphorylation, and paradoxically stimulates an ATP-dependent mitochondrial function as citrullinogenesis. These results show for first time, on isolated rat hepatocytes, an antagonism between the metabolic responses of epinephrine and piroxicam, at the concentration found in plasma after its therapeutic administration. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Epinephrine; Piroxicam; Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID); Glucose production; Triacylglyceride; Lactate consumption; Ethanol consumption; Mitochondrion; Citrulline synthesis

1. Introduction

The nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) comprise one of the most employed therapeutic agents. In 1984, nearly one in seven Americans was treated with a NSAID (Clive and Stoff, 1984), and in 1986, 100 million prescriptions were written for these drugs (Langman, 1988). Their effectiveness to reduce prostaglandin-mediated fever, pain, and swelling, has been attributed to their ability to inhibit the cyclooxygenase, prostaglandin H synthase (Vane, 1971; Ferreira and Vane, 1974; Abramson et al.,

1985). However, these drugs have a wide spectrum of biological effects, many of which are determined by other mechanism independent of cyclooxygenase inhibition (Weissmann et al., 1987; Abramson and Weissmann, 1989; Brooks and Day, 1991; Cronstein and Weissmann, 1995; Cashman, 1996). Among these, several reports pointed out modifications on the components of signal transductions systems, a property that may account for diverse effects on membrane-dependent processes. Thus, NSAIDs can modify membrane viscosity, uncoupling receptor signaling events that depend upon the state of membrane fluidity (Abramson et al., 1990); interfere with GTP/GDP exchange at the α -subunit of regulatory G protein (Abramson et al., 1991, 1994); block the pertussis toxin-dependent ADP-ribosylation of the G protein in purified neutrophil

* Corresponding author. Tel.: +52-5-622-08-29; fax: +52-5-616-24-19; E-mail: hriveros@servidor.unam.mx

membranes, and inhibit, in part, the pertussis toxin-sensitive formation of diacylglycerol that follows cell activation (Abramson et al., 1991, 1994; Cronstein and Weissmann, 1995).

In addition, NSAIDs modify the activity of cellular kinases (Barnest et al., 1992; Frantz and O'Neill, 1995; Roy et al., 1995); inhibit Ca^{2+} -uptake in neutrophils (Abramson et al., 1985; Weissmann et al., 1987; Kankaanranta et al., 1996); enhance intracellular levels of cyclic AMP (Abramson et al., 1985; Weissmann et al., 1987); inhibit the activity of phosphodiesterase (Barnest et al., 1992); and inhibit phospholipase C activity (Bomalaski et al., 1986).

Therefore, it is not surprising that NSAIDs antagonize some hormone-induced responses. In consequence, NSAIDs inhibit epinephrine-induced stimulation of glycerol production in isolated rat adipocytes (Pimentel-Velazquez et al., 1996), lower the glucagon stimulation of glucose production in rat liver (Wheeler and Eppard, 1975), partially attenuate the hypotensive effect of α - and β -adrenoceptor-blocking agents (Duraio et al., 1977; Watkins et al., 1980; Ebel et al., 1986; Spence, 1986; Wong et al., 1986; Radack and Deck, 1987; Johnson et al., 1994; De Leeuw, 1996), reverse α -adrenergic inhibition of acute insulin response to glucose (Metz and Robertson, 1980), and reverse the effects of chronic β -adrenoceptor blockade to attenuate adrenergic neurovascular transmission (Daniell et al., 1988). Likewise, hormones also can antagonize NSAIDs-induced responses. Thus, dipyrone- and flunixin-induced analgesia can be reversed by atipamezole (an α_2 -adrenoceptor antagonist) (Chambers et al., 1995).

The broad variety of antagonic effects showed by NSAIDs on hormone-induced responses lead to suggest that this antagonism must comprise several not yet analyzed responses. Because it is well established that epinephrine produces an increase in hepatic gluconeogenesis and lactate consumption (Sacca et al., 1983; Pilks and Graner, 1992; Pilks et al., 1988), we analyzed the influence of piroxicam, a NSAID, on this "classical" metabolic effect induced by epinephrine. Furthermore, as previous data in our laboratory showed a piroxicam dose-dependent increase in triacylglycerides content on isolated rat hepatocytes (Saldaña-Balmori et al., 1996), we also tested the effect of epinephrine on this metabolic response induced by piroxicam. Finally, and in order to obtain a more elaborated picture of piroxicam-epinephrine interactions, we analyze piroxicam effects on some mitochondrial functions and compare them with the well-known effects of epinephrine on mitochondria (Reinhart et al., 1982; Halestrap et al., 1985; Taylor et al., 1986; Quinlan and Halestrap, 1986; Gonzalez-Manchon et al., 1988; Halestrap, 1989; Korzeniewski and Froncisz, 1992; Garcia et al., 1997).

It is noteworthy that in spite of the previous reports showing piroxicam effects on hepatic glucose metabolism (Dorronsoro de Catoni and Battellino, 1992; Salgueiro-

Pagadigorria et al., 1996a), the influence of this therapeutic agent on the hepatic metabolic responses to epinephrine has not been yet analyzed.

Thus, on basis to the extensive use of piroxicam, one of the most prescribed NSAIDs in the United States (American Academy of Family Physicians, 1997), the obtained results, are of interest because this work shows, for first time, an antagonism between piroxicam and some metabolic responses induced by epinephrine on isolated hepatocytes.

2. Materials and methods

Male Wistar rats (200–250 g) were fed ad libitum with a commercial diet (Nutricubos from Mexico) and they were fasted 48 h before treatment, but free access to water was allowed. Animals were anesthetized with ether, and isolated hepatocytes were prepared by the method of Berry and Friend (1969), using slight modifications as described by Guinzberg et al. (1987). Cell viability was assayed by the trypan blue exclusion method; experiments were performed only when more than 90% viability was recorded.

Once isolated, liver cells, equivalent to 10–15 mg protein, were incubated for 60 min at 37°C with continuous shaking in Krebs-Ringer bicarbonate buffer: 120 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 12 mM NaHCO_3 , 1.2 mM CaCl_2 , adjusted to pH 7.4, in an atmosphere of $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95%:5%). The incubation media was supplemented with 50 mM sodium lactate pH 7.4, or 50 mM ethanol as substrates, in the absence or in the presence of epinephrine (10^{-6} M) and piroxicam (10^{-9} – 10^{-4} M).

After incubation, glucose release (Fales, 1963), lactate consumption (Gutmann and Wahlefeld, 1974), triacylglycerides content (Gottfried and Rosenberg, 1973), ethanol consumption (Bernt and Gutmann, 1974), and protein concentration (Bradford, 1976) were quantified as detailed previously by Saldaña-Balmori et al. (1996). Each assay was routinely performed in duplicate.

All measurements were made from the same hepatocytes batches, however, some data on lactate and ethanol consumption, as well as triacylglycerides content data were presented originally in a previous report from our laboratory (Saldaña-Balmori et al., 1996). These data were completed with new experiments, and reanalyzed in order to integrate them with the glucose release data.

Mitochondria from rat liver were prepared by the method of Schneider and Hogeboom (1950), with the modifications proposed by Siess (1983), as detailed previously by Zentella de Piña et al. (1989), with an isolation medium containing 0.3 M mannitol, 0.5 mM EGTA, 5 mM TES [*N*-tris-(hydroxymethyl)-2-aminoethane sulfonic acid], and 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4. Mitochondrial respiration was recorded with a Clark O_2 electrode at 22°C. Mitochondrial citrulline formation was assayed in the medium described by Corvera and García-Sáinz (1982);

after 10-min incubation was stopped by the addition of perchloric acid (3% final concentration). Citrulline was determined by the method of Boyde and Rahmatullah (1980).

Epinephrine, L-lactate, bovine serum albumin (fraction V), collagenase (type IV) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Other reagents were analytical grade either from Merck (México) or Sigma.

Statistical analyses were performed with the software SigmaStat for Windows ver. 1.0 (Jandel Scientific, 1994), employing one-way analysis of variance (ANOVA), followed by an all pairwise multiple comparison procedure using the Dunnett's method. If normality test or equal variance test failed, the nonparametric Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks was employed.

3. Results

The effect of piroxicam on epinephrine-stimulated gluconeogenesis from lactate is shown in Fig. 1. In this figure can be observed that piroxicam, from 10^{-9} M, blocked the epinephrine-induced activation of glucose synthesis on rat liver hepatocytes ($P < 0.003$), meanwhile piroxicam per se did not modify glucose production in the absence of epinephrine at any of the tested concentrations (1 nM to 0.1 mM). This last result contrasts with those of Salgueiro-Pagadigorria et al. (1996a), who reported a piroxicam dose-dependent inhibition on gluconeogenesis (33%–80%) in isolated perfused rat liver, though this

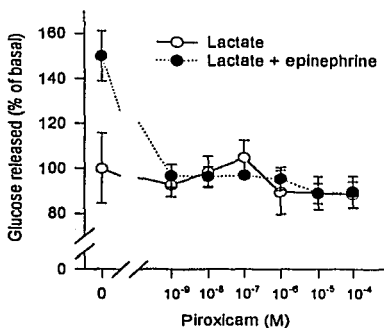


Fig. 1. Effect of different concentrations of piroxicam on glucose synthesis from lactate in rat hepatocytes incubated with 10^{-6} M epinephrine. The isolated cells were incubated as described in Section 2, using 50 mM sodium lactate (pH 7.4) as substrate; (●) in the presence of epinephrine and (○) in the absence of epinephrine. The basal synthesis of glucose, after 1 h of incubation, was 125 ± 20 nmol glucose formed/h per mg of protein. Data expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 6-10$).

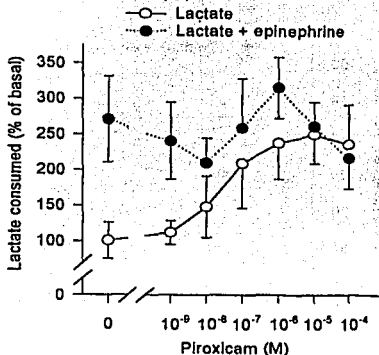


Fig. 2. Effect of different concentrations of piroxicam and 10^{-6} M epinephrine on lactate consumption in isolated rat hepatocytes. The cells were incubated 1 h as described in Section 2 with 50 mM sodium lactate as substrate; (●) in the presence of epinephrine and (○) in the absence of epinephrine. Each point represents the mean \pm S.E.M. ($n = 5-9$). The basal lactate consumption was 139 ± 35 nmol/h per mg of protein.

discrepancy can be explained by the greater concentrations of the NSAID assayed in the latter study (0.2–1 mM). Indeed, data in Fig. 1 show a not statistically significant 12% decrease in glucose production with 0.1 mM piroxicam alone, figure is in accordance with the 33% decrease observed by Salgueiro-Pagadigorria et al. (1996a) with 0.2 mM piroxicam.

In contrast, the stimulation on lactate consumption induced by epinephrine in isolated rat hepatocytes was not modified by the presence of piroxicam (Fig. 2); however, in this case, piroxicam alone rises the lactate consumption in a dose-dependent basis. This last effect is statistically significant ($P < 0.05$) from 10^{-6} M piroxicam concentration with a maximum response (+150%) at 10^{-5} M. Furthermore, the stimulatory effect of epinephrine and piroxicam on lactate consumption were not additive, suggesting similar sites of action.

The exposure to piroxicam alone increases, on a dose-dependent basis, the content of triacylglycerides in isolated rat hepatocytes incubated for 60 min with 50 mM lactate (Fig. 3). The highest stimulation (51%) was observed in the presence of 10^{-4} M piroxicam, but the effect was statistically significant from 10^{-3} M piroxicam ($P < 0.05$). This finding agrees with previous results from our laboratory, with an *in vivo* system, where rats treated for 4 to 8 h with piroxicam (10 mg/kg body weight) exhibited a 15% to 25% increase in liver triacylglycerides content, but without statistical significance (Zentella de Piña et al., 1992).

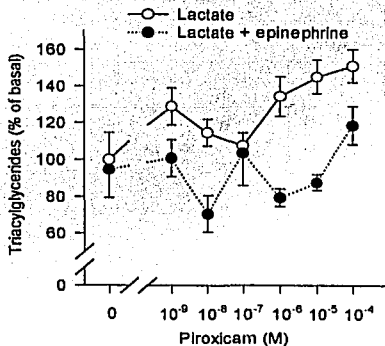


Fig. 3. Effect of different concentrations of piroxicam and 10^{-6} M epinephrine on triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. The cells were incubated 1 h as described in Section 2 using 50 mM sodium lactate as substrate; (●) in the presence of epinephrine and (○) in the absence of epinephrine. Each point represents the mean \pm S.E.M. ($n = 5-7$). The basal triacylglycerides content after 1 h of incubation was 29.4 ± 4.3 μ g triacylglycerides/mg of protein.

Otherwise, the triacylglycerides content of the isolated rat hepatocytes was not modified by 1-h incubation with 10^{-6} M epinephrine, using 50 mM lactate as substrate

(Fig. 3). This result agrees with previous reports indicating that epinephrine does not affect cellular triacylglycerides content in liver (Brindle and Ontko, 1986). However, it can be observed that the piroxicam effect on triacylglycerides content was attenuated by epinephrine, showing again a mutual antagonism in the effect of both compounds.

In isolated rat hepatocytes, piroxicam stimulates lactate consumption (Fig. 2), keeping constant glucose production (Fig. 1), but increasing triacylglycerides content (Fig. 3). Taken together, these three results reveal that in this system a proportion of the lactate consumed after stimulation with the NSAID is used in the triacylglycerides synthesis. In order to obtain an integrated view of the piroxicam effects on isolated rat hepatocytes, we decided to elaborate a three-dimensional plot with lactate consumption, glucose release and triacylglycerides content data (see Fig. 4). A linear relationship between these three metabolic responses the next equation was proposed:

$$\begin{aligned} [\text{triacylglycerides content}] = & m_1 \times [\text{lactate consumption}] \\ & + m_2 \times [\text{glucose release}] \\ & + c. \end{aligned} \quad (1)$$

The adjusted constant and their standard deviations fitted by least squares are:

$$m_1 = +0.093 \pm 0.048 \quad (\text{percent triacylglycerides content/percent lactate consumption})$$

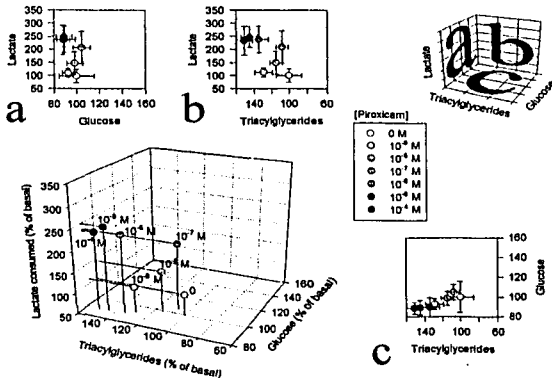


Fig. 4. Three-dimensional plot of (10^{-9} – 10^{-4} M) piroxicam effect on glucose production, lactate consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. The inserted bidimensional plots (a–c) show lateral views of the three-dimensional plot. Each point represents the mean, with the S.E.M. bar showed in the bidimensional plots. A guide to read the bidimensional projections is included at the upper right. Piroxicam concentrations are shown with a gray scale; data without piroxicam are shown in white, and with piroxicam in different gray tones; the coordinates origin in the three-dimensional plot is located at the front in relation to the viewer. Figs. 4 and 5 maintain the same scales for easier comparisons.

157

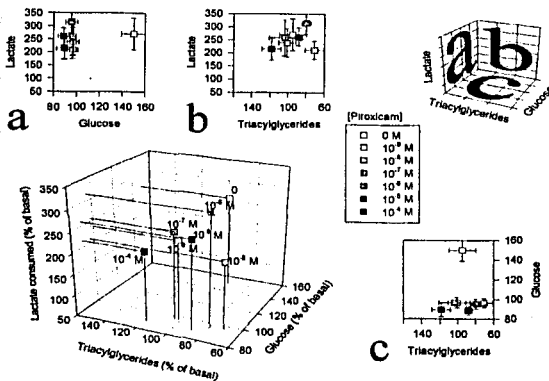


Fig. 5. Three-dimensional plot of 10^{-6} M epinephrine plus $(10^{-6}$ – 10^{-4} M) piroxicam effect on glucose release, lactate consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. The inserted bidimensional plots (a–c) show lateral views of the three-dimensional plot. Data are presented as in Fig. 4, and maintain the same scales for easier comparisons.

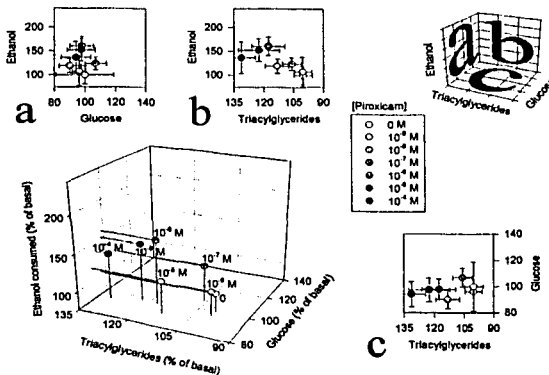


Fig. 6. Three-dimensional plot of $(10^{-6}$ – 10^{-4} M) piroxicam effect on glucose release, ethanol consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. Cells were incubated as described in Section 2 replacing lactate by 50 mM ethanol as substrate. The inserted bidimensional plots (a–c) show lateral views of the three-dimensional plot. Each point represents the mean, with the S.E.M. bar showed in the bidimensional plots. Data are presented as in Fig. 4. The basal activities of untreated hepatocytes after 1-h incubation were as follows: ethanol consumption: 228 ± 43 nmol/h per mg of protein; ($n = 4$ – 6); triacylglycerides content: 29.4 ± 1.4 μ g triacylglycerides/mg of protein ($n = 6$ – 9); glucose release: 108 ± 20 nmol glucose/h per mg of protein ($n = 5$ – 9). Figs. 6 and 7 maintain the same scales for easier comparisons.

$m_2 = -2.32 \pm 0.47$ (percent triacylglycerides content/percent glucose release)

$c = 328.5 \pm 49.6$ (percent triacylglycerides content) and the obtained regression coefficient (r^2) is equal to 0.923 ($P < 0.01$).

The results show that an increase in triacylglycerides content is followed by a parallel activation in lactate consumption and a decrease in glucose release, reinforcing the suggestion that under the experimental conditions described, at least a proportion of consumed lactate is channelled to the synthesis of triacylglycerides.

On the other hand, the uptake of lactate is stimulated by epinephrine and it is used for glucose synthesis (see white square in Fig. 5); when piroxicam is added to this system with epinephrine, the uptake of lactate remains elevated but it is not channelled toward glucose synthesis (see gray squares in Fig. 5), neither toward triacylglycerides synthesis, since the stimulation in triacylglycerides content promoted by piroxicam is blocked by epinephrine; therefore, the stimulation of an alternative metabolic pathway must be considered. This last possibility is supported by the lost of correlation between triacylglycerides content, lactate consumption and glucose release observed with the simultaneous presence of epinephrine and piroxicam. Thus, the regression coefficient for fitting these last data to Eq. (1) is $r^2 = 0.07$, which strengthens the point that under the experimental conditions described, another metabolic fate of lactate should be enhanced, for instance, liver respiration. Furthermore, epinephrine promotes mitochondrial oxygen consumption coupled to ATP synthesis (Taylor et al.,

1986; Breton et al., 1987; Korzeniewski and Froncisz, 1992; Garcia et al., 1997).

Substitution of lactate for a distinct substrate, namely ethanol, might give further insight in the antagonism between epinephrine and the NSAID, as well as in the hepatic metabolic route(s) favored by piroxicam administration. Ethanol was selected because in a previous report from our laboratory it was showed that piroxicam alone stimulates ethanol consumption and modify triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes (Saldaña-Balmori et al., 1996). In addition, ethanol elevates fatty acids synthesis (Bremer and Osmundsen, 1984; Brindley, 1988; Yang et al., 1996; Yu and Cronholm, 1997), but inhibits gluconeogenesis (Krebs et al., 1969; Sugano et al., 1980). Figs. 6 and 7 show a three-dimensional plots with ethanol consumption, glucose release and triacylglycerides content data in the presence or absence of piroxicam and epinephrine. In this integrated plot can be observed that piroxicam alone (Fig. 6) activates the ethanol consumption, the maximum effect (+60%) is observed with 10^{-6} M piroxicam ($P < 0.05$). Additionally, piroxicam, in a dose-dependent basis, augments triacylglycerides content in hepatocytes with a maximum effect at 10^{-4} M piroxicam (+31%, $P < 0.002$). The stimulation on ethanol consumption is parallel to the increase of triacylglycerides content in hepatocytes, although the glucose release is not modified by piroxicam. Adjusting this data to Eq. (1), the obtained results are:

$m_1 = +0.477 \pm 0.103$ (percent triacylglycerides content/percent ethanol consumption)

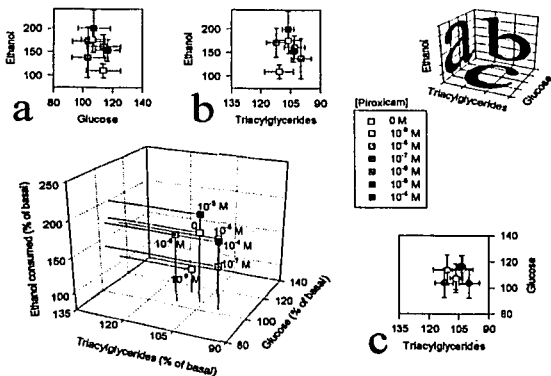


Fig. 7. Three-dimensional plot of 10^{-6} M epinephrine plus (10^{-9} – 10^{-4} M) piroxicam effect on glucose release, ethanol consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. Cells were incubated as described in Section 2 replacing lactate by 50 mM ethanol as substrate. The inserted bidimensional plots (a–c) show lateral views of the three-dimensional plot. Data are presented as in Fig. 4. Figs. 6 and 7 maintain the same scales for easier comparisons.

$m_2 = -0.73 \pm 0.49$ (percent triacylglycerides content/
percent glucose release)
 $c = 124.1 \pm 50.7$ (percent triacylglycerides content)
and $r^2 = 0.838$ ($P < 0.02$)

Epinephrine alone stimulates ethanol consumption 75% ($P < 0.05$), without any rise in the content of triacylglycerides or in glucose release. Simultaneous presence of epinephrine and piroxicam keep ethanol consumption elevated but the increase in triacylglycerides content, observed with piroxicam alone, is abolished. Once again the antagonism between both compounds is manifest. The regression coefficient for fitting these last data to Eq. (1) in the presence of epinephrine and piroxicam is $r^2 = 0.01$, this figure is similar to the value obtained with lactate as substrate under similar experimental conditions. In the same way as it was proposed for lactate, an enhanced metabolic pathway leading to ethanol oxidation seems to prevail in hepatocytes incubated with the hormone and the NSAID.

The mechanism by which piroxicam stimulates oxidation of lactate or ethanol is probably the same because their consumption increase in a linear way for both substrates, with each added doses of piroxicam (correlation coefficient, $r = 0.918$). Therefore, the effect of the NSAID on mitochondrial oxidation was tested. Fig. 8 shows the effect of piroxicam on oxygen consumption in isolated rat liver mitochondria, in the presence (state 3) or absence (state 4) of added ADP. Piroxicam, assayed at doses comparable to those detected in plasma of patients treated with piroxicam (20 mg daily, (Brogden et al., 1984; Rugstad, 1986)), rises significantly, in a dose-dependent form, the oxygen consumption in resting mitochondria (state 4); whereas in ADP-stimulated mitochondria (state 3), the oxygen consumption remains unchanged. These results confirm an uncoupler activity of piroxicam on oxidative phosphorylation which was previously reported, but using higher concentrations of the anti-inflammatory compound (Mingatto et al., 1990; Salgueiro-Pagadigorria et al., 1996b). Therefore, the mechanism by which piroxicam stimulates oxidation of lactate or ethanol is probably due to a general effect of the NSAID uncoupling oxidative phosphorylation and promoting the oxidation of substrates in mitochondria. This interpretation makes sense with the described linear increase in lactate and ethanol consumption in the presence of different doses of piroxicam.

The antagonism of epinephrine on the stimulative action of piroxicam to elevate the hepatic content of triacylglycerides is probably related to the common ability of both compounds to activate oxygen consumption in mitochondria. In this way, epinephrine in the absence of piroxicam stimulates mitochondria to provide the ATP necessary to sustain gluconeogenesis; but the addition of piroxicam cannot overstimulate mitochondrial activity and therefore the effect of piroxicam increasing the synthesis of triacylglycerides is not observed. Since several other NSAIDs possess the ability to stimulate oxygen consumption in

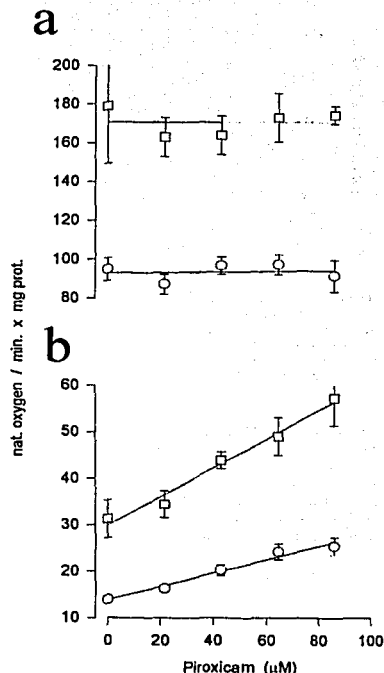


Fig. 8. Effect of piroxicam on oxygen consumption by isolated rat liver mitochondria. Mitochondria were isolated as described in Section 2. Mitochondria (2 mg protein) were added to an incubation mixture containing 260 mM mannitol, 3.3 mM phosphate-tris, 2.6 mM MgCl₂, 3.3 mM KCl, 0.44 mM EGTA, and 4.3 mM TES, pH 7.4; in addition, 6.6 mM succinate or 3.3 mM glutamate plus 3.3 mM malate, were added as substrates. Respiration was stimulated with 410 nMol ADP (state 3). (a) ADP-stimulated oxygen consumption (state 3) with succinate (■), or glutamate plus malate (○) as substrates. (b) Resting oxygen consumption (state 4) with succinate (■), or glutamate plus malate (○) as substrates. Each point represents the mean \pm S.E.M. ($n = 4$).

mitochondria (Van den Berg and Nauta, 1975; Tokumitsu et al., 1977; McDougall et al., 1983; Baños and Reyes, 1989; Mingatto et al., 1996; Petrescu and Tarba, 1997), this potential mechanism of antagonism could be a more general property of NSAIDs, not restricted to piroxicam alone.

Because piroxicam resembles an uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, its effect at the μmolar

160

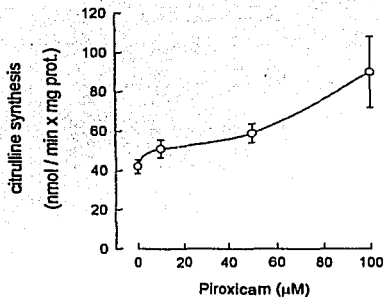


Fig. 9. Effect of piroxicam on citrulline synthesis in isolated rat liver mitochondria. Mitochondria (4.5 mg protein) were isolated as described in Section 2 and incubated with: 5 mM KH_2PO_4 , 15 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 16 mM $KHCO_3$, 1 mM EDTA, 10 mM succinate, 10 mM D-ornithine, 10 mM NH_4Cl , 4 μ M rotenone, and 75 mM Tris in 2 ml final volume. Each point represents the mean \pm S.E.M. ($n = 4$).

range, impairing the ATP-dependent function in mitochondria was explored. In this way, the effect of piroxicam on citrullinogenesis was tested. This activity was selected because comprises an indispensable step in the urea cycle and is one of the most important ATP-dependent function in liver mitochondria. Indeed, carbamyl phosphate synthetase I, responsible of citrullinogenesis, is the most abundant enzyme in liver mitochondria (Rajman and Jones, 1976). Fig. 9 shows the effect of piroxicam on citrullinogenesis in isolated rat liver mitochondria. Piroxicam, in the μ molar range, increases citrulline synthesis on isolated rat liver mitochondria. This last effect shows that the mild uncoupler effect of piroxicam described above do not impede this important mitochondrial ATP-dependent function in the liver. Furthermore, the increase in triacylglycerides content induced by piroxicam is observed also at this μ molar range, suggesting that this energy-dependent stimulation is related to the effects of piroxicam on mitochondria.

4. Discussion

In more integrated experimental models, other NSAIDs showed also an antagonism with the activation of metabolic pathways by catecholamines. Thus, indomethacin and salicylate decrease epinephrine- and glucagon-induced glycogenolysis *in vivo* (Wheeler and Epanand, 1975; Ganguli et al., 1979; Miller et al., 1983, 1985), and naproxen inhibits glycogenolysis stimulated by norepinephrine in perfused rat liver (Nascimento et al., 1995). However, an explanation of this antagonism becomes particularly difficult in

the *in vivo* experiments since NSAIDs modify the plasma levels of hormones, such as insulin, glucagon and epinephrine (Bybee et al., 1978; Metz and Robertson, 1980). Hence, the use of isolated hepatocytes seems to be the suitable model to explore, in deep, the antagonism of epinephrine and piroxicam. Such antagonism probably is unrelated to the ability of NSAIDs to inhibit prostaglandin synthesis because prostaglandins produce a similar effect: inhibit hepatic glucagon- and epinephrine-stimulated glycogenolysis in isolated rat hepatocytes (Wheeler and Epanand, 1975; Brass and Garrity, 1985; Brass et al., 1987; Brass and Garrity, 1990; Okumura and Saito, 1990; Okumura et al., 1988a,b).

It is important to considerate that patients treated with piroxicam (20 mg daily) usually show steady-state plasma concentrations in the range from 13 to 40 μ M (Brogden et al., 1984; Rugstad, 1986). Therefore, the piroxicam effects described in this paper are medically relevant since they are statistically significant at the therapeutical concentration range for piroxicam or even below this range.

Interestingly, other effects of different NSAIDs at nanomolar concentrations, quite below their therapeutical range, have been reported previously; the median inhibitory concentration (IC_{50}) values for cyclooxygenase-2 activity in intact cells are 3 nM for diclofenac (Pilbeam et al., 1997) and 24 nM for piroxicam (Fröllich, 1997); the IC_{50} values for cyclooxygenase-1 are 1 nM for flunixin and flurbiprofen (Riendeau et al., 1997); the IC_{50} values for the potentiation of morphine inhibition of γ -aminobutyric acid-dependent synaptic transmission in rat neurons are 6 nM for indomethacin, and 57 nM for piroxicam (Vaughan, 1998). Inclusive, Raisz et al. (1989) pointed out that piroxicam at very low concentrations (10^{-10} M) paradoxically elevates prostaglandin production in cultured rat calvaria. In addition, the reported inhibitory action of piroxicam on glucose release induced by epinephrine is statistically significant from 10^{-9} M (Fig. 1).

In conclusion, the antagonism of piroxicam on epinephrine-induced glucose production is observed at nmolar range, whereas piroxicam effects on mitochondrial functions are significative only at μ molar range. Thereof, the nmolar action of the NSAID might interfere with the transduction system switched on by the hormone, and this nanomolar action seems to be independent of the μ molar effects of piroxicam on mitochondrial functions.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Rafael Villalobos-Molina (CINVESTAV-IPN, México) and Dr. Alejandro Zentella-Dehesa (IFC-UNAM, México) for their valuable comments for the improvement of the manuscript. This work was supported by grant IN212695 from DGAPA-UNAM, México.

References

- Abramson, S.B., Weisemann, G., 1989. The mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 32, 1–9.
- Abramson, S., Korchak, H., Ludewig, R., Edelson, H., Haines, K., Levin, R.I., Herman, R., Rider, L., Kimmel, S., Weisemann, G., 1985. Modes of action of aspirin-like drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 7227–7231.
- Abramson, S.B., Cherksey, B., Gude, D., Leszczynska-Piziak, J., Phillips, M.R., Blau, L., Weissmann, G., 1990. Nonsteroidal antiinflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. Studies in human neutrophils and liposomes. *Inflammation* 14, 11–30.
- Abramson, S.B., Leszczynska-Piziak, J., Haines, K., Reibman, J., 1991. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects on a GTP binding protein within the neutrophil plasma membrane. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1567–1573.
- Abramson, S.B., Leszczynska-Piziak, J., Clancy, R.M., Phillips, M., Weissmann, G., 1994. Inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs (NSAIDs): requirement for assembly of heterotrimeric G proteins in bilayer phospholipid. *Biochem. Pharmacol.* 47, 563–572.
- American Academy of Family Physicians, 1997. Number of drugs mentioned in office visits to selected specialties by age of patient and the twenty most frequently named drugs: United States, 1992. <http://www.aafp.org/Family/facts/035.html>, 14-4-1997.
- Daños, G., Reyes, P.A., 1989. A comparative study of the effect of ten non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) upon some mitochondrial and platelet functions. *Int. J. Biochem.* 21, 1387–1394.
- Bernt, E., Gutmann, I., 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD⁺. In: Bergmeyer, H.V. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3, 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, New York, pp. 1499–1502 (translated from the 3rd German edition).
- Berry, M.N., Friend, D.S., 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 43, 506–520.
- Bomatalaki, J.S., Hirata, F., Clark, N.A., 1986. Aspirin inhibits phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 115–121.
- Boyd, T.R.C., Rahmatullah, M., 1980. Optimization of condition for the colorimetric determination of citrulline using diacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* 107, 424–431.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brass, E.P., Garrity, M.J., 1985. Effect of E-series prostaglandins on cyclic AMP-dependent and -independent hormone-stimulated glycogenolysis in hepatocytes. *Diabetes* 34, 291–294.
- Brass, E.P., Garrity, M.J., 1990. Structural specificity for prostaglandin effects on hepatocyte glycogenolysis. *Biochem. J.* 267, 59–62.
- Brass, E.P., Alford, C.E., Garrity, M.J., 1987. Inhibition of glucagon-stimulated cAMP accumulation and fatty acid oxidation by E-series prostaglandins in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 930, 122–126.
- Dremer, J., Osmundsen, H., 1984. Fatty acid oxidation and its regulation. In: Numa, S. (Ed.), *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 7: Fatty Acid Metabolism and Its Regulation. Elsevier, Amsterdam, pp. 113–154 (Neuberger, A., van Deenen, L.L.M. — Series Eds.).
- Breton, L., Clot, J.P., Bourrianiens, J., Baudry, M., 1987. L'adrenaline active les phosphorylations oxydatives des mitochondries hépatiques de rat par la mise en jeu des récepteurs alpha 1. *C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* 181, 242–248.
- Brindle, N.P., Ontko, J.A., 1986. Suppression of triglyceride secretion by epinephrine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 191–197.
- Brindley, D.N., 1988. What factors control hepatic triacylglycerol accumulation in alcohol abuse? *Biochem. Soc. Trans.* 16, 251–253.
- Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M., Avery, G.S., 1984. *Piroxicam. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy.* *Drugs* 28, 292–323.
- Brooks, P.M., Day, R.O., 1991. Nonsteroidal antiinflammatory drugs — differences and similarities. *N. Engl. J. Med.* 324, 1716–1725.
- Bybee, D.E., Brodie, T.R., Georges, K.P., Fletcher, J.R., Diaz, M.J., O'Brien, J.T., 1978. Indomethacin induced augmentation of insulin and glucagon release (Abstract). *Diabetes* 27, 157.
- Cushman, J.N., 1996. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs* 52, 13–23, Suppl. 5.
- Chambers, J.P., Waterman, A.E., Livingston, A., 1995. The effects of opioid and α_2 adrenergic blockade on non-steroidal anti-inflammatory drug analgesia in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18, 161–166.
- Clive, D.M., Stoff, J.S., 1984. Renal syndromes associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* 310, 563–572.
- Corvera, S., García-Sáinz, J.A., 1982. Vasopressin and angiotensin II stimulate ureogenesis through increased mitochondrial citulline production. *Life Sci.* 31, 2493–2498.
- Cronstein, B.N., Weissmann, G., 1995. Targets for antiinflammatory drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 449–462.
- Daniell, H.H., Webb, J.G., Walle, T., Oatis, J.E., Gaffney, T.E., 1988. Inhibitors of prostaglandin synthesis reverse the effects of chronic beta-receptor blockade to attenuate allergenic neurovascular transmission in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12, 300–307.
- De Leeuw, P., 1996. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hypertension: the risks in perspective. *Drugs* 51, 179–187.
- Dorronsoro de Cuttoni, S., Battellino, L.J., 1992. Hepatic glycogen depletion in fed female rats induced by piroxicam. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 42, 13–26.
- Duraio, V., Prata, M.M., Gonsalves, L.M.P., 1977. Modification of anti-hypertensive effect of beta-adrenergic-blocker agents by inhibition of endogenous prostaglandin synthesis. *Lancet* 2, 1005–1007.
- Earnest, D.L., Hixson, L.J., Alberts, D.S., 1992. Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: potential for cancer chemoprevention. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 161, 156–166.
- Ebel, D.L., Rhymer, A.R., Stahl, E., Tipping, R., 1986. Effect of Cloniril (sulindac, MSD), piroxicam and placebo on the hypotensive effect of propranolol in patients with mild to moderate essential hypertension. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 62, 41–49.
- Fales, F.W., 1963. Glucose (enzymatic). *Stand. Methods Clin. Chem.* 4, 101–112.
- Ferreira, S.H., Vane, J.R., 1974. New aspects of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 57–73.
- Frantz, B., O'Neill, E.A., 1995. The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. *Science* 270, 2017–2019.
- Fritlich, J.C., 1997. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 30–34.
- Ganguli, S., Sperling, M.A., Frame, C., Christensen, R., 1979. Inhibition of glucagon-induced hepatic glucose production by indomethacin. *Am. J. Physiol.* 236, E358–E365.
- García, M.V., Hernandez-Berciano, R., Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., Medina, J.M., 1997. cAMP and Ca²⁺ involvement in the mitochondrial response of cultured fetal rat hepatocytes to adrenaline. *Exp. Cell Res.* 237, 403–409.
- González-Manchon, C., Saz, J.M., Ayuso, M.S., Parrilla, R., 1988. Characterization of the alpha-adrenergic stimulation of hepatic respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 258–266.
- Gottfried, S.P., Rosenberg, B., 1973. Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 19, 1077–1078.
- Guinzberg, R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R., Piña, E., 1987. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.* 245, 371–374.
- Gutmann, I., Wahlfeld, A.W., 1974. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺. In: Bergmeyer, H.V. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3, 2nd edn. Verlag Chemie Wein-

- helm/Academic Press, New York, pp. 1464–1468 (translated from the 3rd German edition).
- Halestrap, A.P., 1989. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 973, 355–382.
- Halestrap, A.P., Quinlan, P.T., Armston, E., Whipps, D.E., 1985. Mechanisms involved in hormone signal transduction across the mitochondrial membrane. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 659–663.
- Jandel Scientific, 1994. SigmaStat for Windows Ver. 1.0. Statistical Software: User's Manual. Jandel, San Rafael, CA, USA.
- Johnson, A.G., Nguyen, T.V., Day, R.O., 1994. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 121, 289–300.
- Kankaanranta, H., Luomala, M., Kosonen, O., Moilanen, E., 1996. Inhibition by fenamates of calcium influx and proliferation of human lymphocytes. *Br. J. Pharmacol.* 119, 487–494.
- Korzewicki, B., Froncisz, W., 1992. Theoretical studies on the control of the oxidative phosphorylation system. *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 67–75.
- Krebs, H.A., Freedland, R.A., Hems, R., Stubbs, M., 1969. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochem. J.* 112, 117–124.
- Langman, M.J., 1988. Ulcer complications and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 84, 15–19.
- McDougal, P., Markham, A., Cameron, I., Sweetman, A.J., 1983. The mechanism of inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by the non-steroidal anti-inflammatory agent diflunisal. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2595–2598.
- Metz, S.A., Robertson, R.P., 1980. Prostaglandin synthesis inhibitors reverse α -adrenergic inhibition of acute insulin response to glucose. *Am. J. Physiol.* 239, E490–E500.
- Miller, J.D., Ganguli, S., Sperling, M.A., 1983. Prostaglandin synthesis inhibitors impair hepatic glucose production in response to glucagon and epinephrine stimulation. *Diabetes* 32, 439–444.
- Miller, J.D., Ganguli, S., Antal, R., Sperling, M.A., 1985. Indomethacin and salicylate decrease epinephrine-induced glycogenolysis. *Metabolism* 34, 148–153.
- Mingatto, F.E., Santos, A.C., Ueyemura, S.A., Jordani, M.C., Curti, C., 1996. In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 303–308.
- Nascimento, E.A., Yamamoto, N.S., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., 1995. Naproxen inhibits hepatic glycogenolysis induced by Ca^{2+} -dependent agents. *Gen. Pharmacol.* 26, 211–218.
- Okumura, T., Saito, K., 1990. Effect of prostaglandins on glycogenesis and glycolysis in primary cultures of rat hepatocytes — a role of prostaglandin D2 in the liver. *Prostaglandins* 39, 525–540.
- Okumura, T., Sago, T., Saito, K., 1988a. Pentoxifyllin toxin blocks an inhibition of hormone-stimulated glycogenolysis by prostaglandin E2 and its analogue in cultured hepatocytes. *Prostaglandins* 36, 463–475.
- Okumura, T., Sago, T., Saito, K., 1988b. Effect of prostaglandins and their analogues on hormone-stimulated glycogenolysis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 958, 179–187.
- Petrescu, I., Tarba, C., 1997. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 385–394.
- Pilbeam, C.C., Fall, P.M., Alander, C.B., Raisz, L.G., 1997. Differential effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultured bone cells. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1198–1203.
- Pilkis, S.J., Granner, D.K., 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 885–909.
- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., 1988. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 755–783.
- Pimentel-Velazquez, L., Ramirez-Gonzalez, M.D., Zentella de Piña, M., Piña, E., 1996. Piroxicam inhibits epinephrine-induced stimulation of glycerol production in isolated rat adipocytes. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 39, 31–32.
- Quinlan, P.T., Halestrap, A.P., 1986. The mechanism of the hormonal activation of respiration in isolated hepatocytes and its importance in the regulation of gluconeogenesis. *Biochem. J.* 236, 789–800.
- Kadack, K., Deck, C., 1987. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with blood pressure control in hypertensive patients? *J. Gen. Intern. Med.* 2, 108–112.
- Rajman, L., Jones, M.E., 1976. Purification, composition and some properties of rat liver carbonyl phosphate synthetase (ammonia). *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 270–278.
- Raisz, L.G., Simmonds, H.A., Fall, P.M., 1989. Biphasic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandin production by cultured rat calvariae. *Prostaglandins* 37, 559–565.
- Reinhart, P.H., Taylor, W.M., Bygrave, F.L., 1982. Studies on alpha-adrenergic-induced respiration and glycogenolysis in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 257, 1906–1912.
- Riendeau, D., Charleson, S., Cromlish, W., Mancini, J.A., Wong, E., Guay, J., 1997. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microarray and platelet assays. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 1088–1095.
- Roy, H.K., Bissonnette, M., Frawley, B.P.J., Wali, R.K., Niedzicka, S.M., Earnest, D., Brasitus, T.A., 1995. Selective preservation of protein kinase C-zeta in the chemoprevention of azoxymethane-induced colonic tumors by piroxicam. *FEBS Lett.* 366, 143–145.
- Rugstad, H.E., 1986. The Norway study: plasma concentrations, efficacy, and adverse events. *Am. J. Med.* 81, 11–14.
- Sacca, L., Vigorito, C., Ciccalà, M., Corso, G., Sherwin, R.S., 1983. Role of gluconeogenesis in epinephrine-stimulated hepatic glucose production in humans. *Am. J. Physiol.* 245, E294–E302.
- Saldana-Balmori, Y., Zentella de Piña, M., Guinzberg, R., Rocha-Hernandez, A., Piña, E., 1996. Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 317, 225–229.
- Salgueiro-Pagalgorria, C.L., Constantin, J., Bracht, A., Nascimento, E.A., Ishii-Iwamoto, E.L., 1996a. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam on energy metabolism in the perfused rat liver. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 113, 93–98.
- Salgueiro-Pagalgorria, C.L., Kelmer-Bracht, A.M., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., 1996b. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam on rat liver mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 113, 85–91.
- Schneider, W.C., Hogeboom, G.H., 1950. Intracellular distribution of coenzyme A in primary studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenate. *J. Biol. Chem.* 183, 123–128.
- Sieas, E.A., 1983. Influence of isolation media on the preservation of mitochondrial functions. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 279–290.
- Spence, J.A.D., 1986. The arthritic patient with hypertension: selection of an NSAID. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 62, 36–40.
- Sugano, T., Shiota, M., Tanaka, T., Miyatake, Y., Shimada, M., Oshino, N., 1980. Intracellular redox state and stimulation of gluconeogenesis by glucagon and norepinephrine in the perfused rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* 87, 153–166.
- Taylor, W.M., Van de Pol, E., Bygrave, F.L., 1986. On the stimulation of respiration by alpha-adrenergic agonists in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* 155, 319–322.
- Tokumitsu, Y., Lee, S., Ui, M., 1977. In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 26, 2101–2106.
- Van den Berg, G., Nauta, W.T., 1975. Effects of anti-inflammatory 2-aryl-1,3-indandiones on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 24, 815–821.
- Vane, J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 231, 232–235.
- Vaughan, C.W., 1998. Enhancement of opioid inhibition of GABAergic

- synaptic transmission by cyclo-oxygenase inhibitors in rat periaqueductal grey neurones. *Br. J. Pharmacol.* 123, 1479–1481.
- Watkins, J., Abbott, E.C., Hensby, C.N., 1980. Attenuation of the hypotensive effect of propranolol and thiazide diuretics by indomethacin. *Br. Med. J.* 281, 702–705.
- Weissmann, G., Korchak, H., Ludewig, R., Edelson, H., Haines, K., Levin, R.I., Herman, R., Rider, L., Kimmel, S., Abramson, S., 1987. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: how do they work? *Eur. J. Rheumatol. Inflammation* 8, 6–17.
- Wheeler, G.E., Epand, R.M., 1975. Prostaglandin E₂: anomalous effects on glucose production in rat liver. *Mol. Pharmacol.* 11, 335–339.
- Wong, D.G., Spence, J.D., Lauki, L., Freeman, D., McDonald, J.W., 1986. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on control of hypertension by beta-blockers and diuretics. *Lancet* 1, 997–1001.
- Yang, L.Y., Kuksis, A., Myher, J.J., Steiner, G., 1996. Contribution of de novo fatty acid synthesis to very low density lipoprotein triacylglycerols: evidence from mass isotopomer distribution analysis of fatty acids synthesized from [2-¹⁴C]ethanol. *J. Lipid Res.* 37, 262–274.
- Yu, B.Y., Cronholm, T., 1997. Coupling of ethanol metabolism to lipid biosynthesis: labelling of the glycerol moieties of *sn*-glycerol-3-phosphate, a phosphatidic acid and a phosphatidylcholine in liver of rats given [1,1-²H₂]ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* 1344, 165–170.
- Zentella de Piña, M., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., Riveros-Rosas, H., Piña, E., 1989. Effects of moderate chronic ethanol consumption on rat liver mitochondrial functions. *Alcohol* 6, 3–7.
- Zentella de Piña, M., Hernandez-Tobias, A., Saldaña-Balmori, Y., Diaz-Belmont, A., Piña, E., 1992. Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett.* 298, 123–125.



This journal is part of **ContentsDirect**, the *free* alerting service which sends tables of contents by e-mail for Elsevier Science books and journals. You can register for **ContentsDirect** online at: www.elsevier.nl/locate/contentsdirect

This journal is in the ADONIS Service, whereby copies of individual articles can be printed out from CD-ROM on request. An explanatory leaflet can be obtained by writing to ADONIS B.V., P.O. Box 17005, 1001 JA Amsterdam, The Netherlands.

Advertising Information: Advertising orders and enquiries can be sent to: **USA, Canada and South America:** Mr Tino DeCarlo, The Advertising Department, Elsevier Science Inc., 655 Avenue of the Americas, New York, NY 10010-5107, USA; phone: (+1) (212) 633 3815; fax: (+1) (212) 633 3820; e-mail: Tdecarlo@elsevier.com. **Japan:** The Advertising Department, Elsevier Science K.K., 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; phone: (+81) (3) 5561 5033; fax: (+81) (3) 5561 5047; e-mail: info@elsevier.co.jp. **Europe and ROW:** Rachel Gresle-Farthing, The Advertising Department, Elsevier Science Ltd., The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK; phone: (+44) (1865) 843565; fax: (+44) (1865) 843976; e-mail: r.gresle-farthing@elsevier.co.uk.

USA mailing notice: *European Journal of Pharmacology* (ISSN 0014-2999) is published weekly by Elsevier Science B.V. (P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands). Annual subscription price in the USA US\$ 6878.00 (valid in North, Central and South America), including air speed delivery. Periodical postage rate paid at Jamaica, NY 11431.

USA POSTMASTER: Send address changes to *European Journal of Pharmacology*, Publications Expediting Inc., 200 Meacham Ave, Elmont, NY 11003.

AIRFREIGHT AND MAILING in the USA by Publications Expediting Inc., 200 Meacham Avenue, Elmont, NY 11003.

Printed in The Netherlands

⊗ The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).

Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine- and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes

M. Zentella de Piña, H. Vázquez-Meza, G. Piña-Zentella, L. Pimentel and E. Piña

Abstract

Acute ethanol intoxication increased triacylglycerides (TAG) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in liver and promoted the liberation of epinephrine. Four non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – aspirin, naproxen, nimesulide and piroxicam – prevented this increase in TAG and TBARS. Because fatty acids provided by adipose tissue contribute substantially to elevated hepatic TAG in ethanol-intoxicated rats, it was thought that the NSAIDs might reduce epinephrine-stimulated lipolysis in these rats. Isolated rat adipocytes were activated with epinephrine in the presence or absence of the NSAIDs. The NSAIDs inhibited epinephrine-stimulated lipolysis. These drugs did not modify the binding of dihydroalprenolol (β -adrenergic agonist) to their receptors in isolated guinea-pig liver membranes. The NSAIDs, at concentrations 3000-fold lower than that of cAMP, inhibited stimulated lipolysis by this messenger. In conclusion, aspirin, naproxen, nimesulide and piroxicam reduce the release of fatty acids from adipose tissue to the liver by inhibiting the epinephrine-stimulated lipolysis, and this, in part, explains the protective action of these NSAIDs against hepatic signs of acute ethanol intoxication.

Department of Biochemistry,
School of Medicine, National
University of México, Apdo.
Postal 70159 México, D.F.,
México

M. Zentella de Piña, H. Vázquez-
Meza, G. Piña-Zentella,
L. Pimentel, E. Piña

Correspondence: M. Zentella de
Piña, Department of
Biochemistry, School of
Medicine, National University of
México, Apdo. Postal 70159
México, D.F., México. E-mail:
martha@laguna.fmedic.unam.mx

**Acknowledgements and
Funding:** The authors thank
M. V. Z. Enrique Moreno for
excellent technical assistance.
We are grateful to Drs Rafael
Villalobos-Molina and Alejandro
Zentella-Dehesa (IFC-UNAM,
México) for their valuable
comments for the improvement
of the manuscript. This work
was supported by grant IN
222799 from DGAPA-UNAM,
México.

Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) exert their anti-inflammatory, analgesic and antipyretic actions, at least in part, by inhibition of the enzyme cyclooxygenase (Vane 1971). More recently, other pharmacological activities of these compounds have been described. Yin et al (1998) reported that aspirin and salicylate inhibit *in-vitro* and *in-vivo* the activity of I κ B kinase- β , thus impairing the release and mobilization of NF- κ B, a key cellular regulator of the inflammatory response. In an *in-vivo* model of acute inflammation, Cronstein et al (1999) demonstrated that aspirin and salicylate worked by promoting the release of the anti-inflammatory autacoid adenosine. Many of the effects of NSAIDs that are not mediated by cyclooxygenase are thought to be owing to interference with some step of the extensively distributed signal transduction systems associated with cell membranes (Riveros-Rosas et al 1999). Thus, it might be expected that NSAIDs would antagonize some hormone-induced and neurotransmitter-induced responses. An antagonism between catecholamines and NSAIDs has been documented for *in-vivo* experiments (Johnson et al 1994) and for the metabolic responses of epinephrine and piroxicam in isolated rat hepatocytes (Riveros-Rosas et al 1999).

In this work, the ability of four NSAIDs— aspirin, naproxen, nimesulide and piroxicam— to inhibit epinephrine-stimulated lipolysis in isolated rat adipocytes was assessed in an attempt to explain the observation that these compounds prevented the hepatic increase of triacylglycerides (TAG) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rats administered high doses of ethanol (Zentella de Piña et al 1992, 1993). The four NSAIDs chosen are extensively used in humans. In particular, aspirin was chosen because it is the standard model with which to compare and evaluate other NSAIDs. Some advantage or difference with reference to aspirin was sought for the remaining selected NSAIDs; naproxen is better tolerated, nimesulide acts preferentially on cyclooxygenase 2, and piroxicam has a longer half-life (Insel 1990).

An excessive mobilization of lipids from the adipose tissue was claimed to be the main cause of the resulting fatty liver after acute ethanol ingestion (Hornung et al 1960), and ethanol in large doses increases the release of catecholamines and other lipolytic hormones (Vogel et al 1986). If the NSAIDs interfere with the stimulatory action of epinephrine in isolated adipocytes, this effect might help to explain the results of our previous studies (Zentella de Piña et al 1992, 1993). A single report in the literature deals with this topic: Stone et al (1969) demonstrated that 5×10^{-3} M sodium salicylate reduced the rate of lipolysis in isolated rat adipocytes incubated with 5×10^{-7} M norepinephrine or 0.1 mM dibutyl cyclic AMP plus 10^{-3} M theophylline, or 1.0 mM dibutyl cyclic AMP plus 4×10^{-3} M theophylline.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats, 200–240 g were fed *ad libitum* with a commercial diet (Nutricubos, Purina, México). They were fasted overnight, but had free access to water. Rats were decapitated and the epididymal fat pads from two rats were immediately removed. The Ethics Committee of the School of Medicine at the National University of México approved the experiments in accordance with the International Animal Care and Use Committee.

Chemicals and reagents

ATP, (\pm) alprenolol, NAD, glycerol, thiobarbituric acid, epinephrine, aspirin, naproxen, nimesulide, piroxicam, dibutyl cAMP, glycerol-3-phosphate oxidase, glycerokinase, Triton X-100, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 4-chlorophenol,

4-aminoantipyrine, peroxidase, and albumin were all obtained from Sigma (St Louis, MO, USA); L-[propyl-2,3- 3 H]dihydroalprenolol (120 Ci mmol $^{-1}$) was supplied by New England Nuclear Co (USA); EDTA, ethanol, glucose and magnesium sulfate were obtained from Baker (Edo de México, México).

Lipolysis experiments

Isolated adipocytes were obtained by the method of Rodbell (1964) as modified by Honnor et al (1985) with the main purpose of obtaining cells with low basal levels of cAMP. In brief, fat pads from two rats were cut up with fine scissors. Digestion was performed with 1 g of minced pad in 10 mL collagenase (1 mg mL $^{-1}$) for 30 min, with vigorous shaking, in 1% defatted bovine serum albumin (BSA; fraction v) in Ringer Krebs media, pH 7.4. The Ringer Krebs was enriched with 25 mM HEPES adjusted to pH 7.4, 2.5 mM CaCl $_2$, 2 mM glucose and 200 nM adenosine. Cells were filtered through nylon cloth. After three cycles of centrifugation (1 min each) at 220 g, elimination of the solution lying below the fat cake, and resuspension in 1% BSA in Ringer Krebs enriched solution, the fat cake was weighed; 1.0 g of this wet weight of cells were suspended in 1.25 mL Ringer Krebs enriched solution in which the concentration of BSA was raised to 4% instead of 1%. Lipolysis was assayed in 100- μ L aliquots of this suspension added to 700 μ L of incubation medium, pre-warmed to 37°C, which consisted of 4% BSA in Ringer Krebs enriched solution plus epinephrine or dibutyl cAMP with or without each of the selected NSAIDs. Incubation was performed at 37°C for 30 min. The adipocytes were dispersed during incubation by shaking at 160 cycles min $^{-1}$. Lipolysis was stopped by transferring the tubes from 37°C to an ice bath after 5 min. The tubes were then centrifuged at 10000 g at 4°C for 10 min. An aliquot of 100 μ L from the solution lying below the fat cake was carefully transferred to a new tube to measure liberated glycerol. Glycerol was estimated by a colorimetric method recommended by Warnick (1986). In this method, glycerol is converted to glycerol 1-phosphate in the presence of glycerol kinase and ATP; glycerol 1-phosphate was oxidized with the aid of glycerol 3-phosphate oxidase to produce equimolecular amounts of H $_2$ O $_2$ and dihydroxyacetone phosphate. H $_2$ O $_2$ was reacted with phenol, aminoantipyrine and peroxidase enzyme to give a quinonimine dye proportional to the content of the H $_2$ O $_2$ present.

All NSAIDs were assayed at a concentration of 3×10^{-6} M. This concentration was recovered in plasma of individuals receiving a single therapeutic dose of

piroxicam (Insel 1990). On an equimolecular basis, piroxicam is the most potent of the four NSAIDs used in this study (Insel 1990).

Membrane preparation

Liver plasma membranes were prepared from male guinea-pigs (450–500 g) after homogenization in a hypotonic solution (1 mM NaHCO_3) with a Dounce glass device (four strokes), according to the procedure, up to step 11, devised by Neville (1968). Membranes were resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 10 mM MgCl_2 and stored in liquid nitrogen at -70°C until use (within 2 weeks); protein was measured by the method of Bradford (1976).

Saturation-binding and competence experiments

Saturation-binding assays for β -adrenoreceptors were performed in triplicate with 100- μg samples of membrane protein. Membranes were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 10 mM MgCl_2 , with eight increasing concentrations of [^3H]dihydroalprenolol (0.1–30 nM). Non-specific binding was obtained in the presence of $10\ \mu\text{M}$ cold alprenolol in a final volume of 0.25 mL at 37°C for 10 min (Reyes-Salcido & Villalobos-Molina 1999). The same protocol was followed in tubes supplemented with 50 mM ethanol. Samples were filtered through a Brandell cell harvester (Gaithersburgh, MD, USA) over Whatman GF/C filters with three washes of 5 mL ice-cold binding buffer. After drying the filters, 5 mL Triton-xilene scintillation liquid was added and radioactivity in the filters was determined in a liquid scintillation spectrometer (Beckman LS6000SC) at 63% efficiency. Specific binding was 50–55% at the K_d for [^3H]dihydroalprenolol.

For competence experiments, binding for [^3H]dihydroalprenolol (at the concentration of the calculated K_d) was challenged to compete with each of the NSAIDs and incubated in triplicate at 14 different concentrations ranging from 3×10^{-8} to 3×10^{-2} M. Each complete experiment was repeated three times, either in the absence or presence of 50 mM ethanol.

Calculations and statistical analysis

Each value in the figures is the mean of six independent experiments in which adipocytes were stimulated with epinephrine or dibutyryl cAMP, and three independent experiments in which adipocytes were stimulated with epinephrine or dibutyryl cAMP supplemented with one of the NSAIDs. The glycerol values are expressed as

mean \pm s.d. Differences in dose-response curves between the stimulated cells with epinephrine or dibutyryl cAMP and the stimulated cells plus one of the NSAIDs were analysed by one-way analysis of variance followed by Dunn's multiple comparison test recommended for unpaired samples (Sigma Stat for Windows, version 1.0; Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). In all analyses, $P < 0.05$ was taken as the level of significance. The concentration and affinity of β -adrenoreceptors were determined in three and eight separate experiments by saturation binding and Scatchard analysis using the non-linear curve-fitting EBDA-LIGAND program (Biosoft, Elsevier, Cambridge, UK). Student's *t*-test for unpaired observations was used to compare the B_{max} and affinity between groups.

Results

The dose-response curve for epinephrine-stimulated lipolysis is shown in Figure 1. High doses of the hormone were used to show the wide physiological reserve

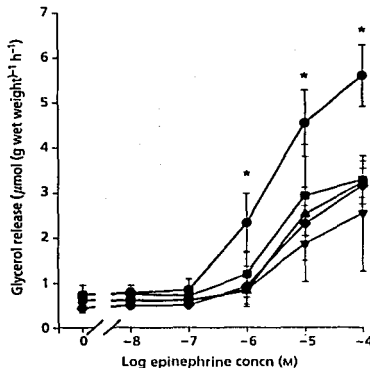


Figure 1 Effect of different concentrations of NSAIDs on epinephrine-stimulated glycerol release in isolated rat adipocytes. Adipocytes were incubated with different concentrations of epinephrine alone (●) or in the presence of 3×10^{-8} M aspirin (■), naproxen (◆), nimesulide (▲) or piroxicam (▼). All samples were incubated for 30 min at 37°C . Each value represents the mean \pm s.d. for six individual assays in adipocytes incubated with epinephrine and three individual assays in adipocytes incubated with epinephrine plus one of the NSAIDs. * $P < 0.05$, epinephrine-treated cells vs epinephrine plus one of the NSAIDs.

Table 1 Receptor number (B_{max}) and K_d for [3H]dihydroalprenolol in isolated hepatocyte membranes.

Incubation medium	B_{max} (fmol (mg protein) $^{-1}$)	K_d (nM)
In the absence of ethanol	2167 \pm 539 (n = 8)	8.9 \pm 1.6 (n = 8)
With 50 mM ethanol	1840 \pm 435 (n = 3)	23.6 \pm 2.8 (n = 3)

Values are mean \pm s.e.

response of the prepared adipocytes and also to test whether the pharmacological doses of the NSAIDs could act at physiological as well as supra-physiological doses of epinephrine. The four NSAIDs used in this study exhibited a clear inhibitory action on epinephrine-stimulated lipolysis. The inhibitory action of the NSAIDs recorded in the absence of epinephrine was not statistically significant (Figure 1). In epinephrine-stimulated lipolysis, the inhibitory action of the NSAIDs was statistically significant and was maintained even when the concentration of each NSAID was 33-times lower than the concentration of the stimulatory hormone (Figure 1). The results showed a trend of potency in this assay in the following order: piroxicam (the most potent) > naproxen > nimesulide > aspirin. However, differences among NSAIDs were not statistically significant.

The main epinephrine receptor localized in rat adipocytes is of the β subtype. Therefore, the ability of ethanol and the selected NSAIDs to modulate the binding to this receptor of dihydroalprenolol, a model β -adrenergic agonist, was studied. Displacement curves for [3H]dihydroalprenolol (18.9 nM, K_d in Table 1) to β -adrenergic receptors were established for aspirin, naproxen and piroxicam. Under the experimental conditions studied here, the presence of alcohol had no statistically significant effect on the binding of dihydroalprenolol to the receptor, as evidenced by the similar B_{max} and K_d values (Table 1). None of the NSAIDs tested had a statistically significant effect on the binding of dihydroalprenolol to the receptor.

The next step was to assay the capacity of NSAIDs to modify the stimulatory action of cAMP, the second messenger involved in the process of β -receptor stimulation of lipolysis. Dibutylryl cAMP increased glycerol release in a dose-dependent manner, as previously documented (Figure 2). The NSAIDs tested here reduced this stimulatory action, although the concentration of the anti-inflammatory agents was maintained at 33–3333 times lower than the concentration of cAMP (Figure 2).

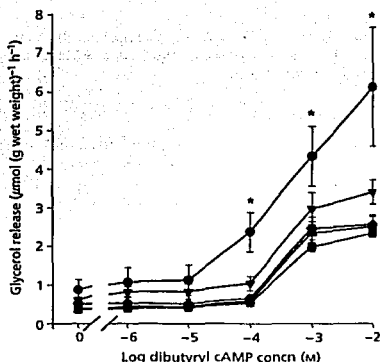


Figure 2 Effect of different concentrations of NSAIDs on dibutylryl cAMP-stimulated glycerol release in isolated rat adipocytes. Adipocytes were incubated with different concentrations of dibutylryl cAMP alone (●) or in the presence of 3×10^{-6} M aspirin (■), naproxen (◆), nimesulide (▲) or piroxicam (▼). All samples were incubated for 30 min at 37°C. Each value represents the mean \pm s.d. for six individual assays in adipocytes incubated with dibutylryl cAMP and three individual assays in adipocytes incubated with dibutylryl cAMP plus one of the NSAIDs. * $P < 0.05$, cAMP-stimulated cells vs cAMP plus one of the NSAIDs.

The results showed a trend of potency in this assay in the following order: aspirin (the most potent) > nimesulide > naproxen > piroxicam (Figure 2). However, differences among NSAIDs were not statistically significant. Interestingly, this trend was the exact opposite of that observed with the lipolysis assay in Figure 1.

Discussion

This work demonstrates that the stimulatory action of epinephrine on epididymal adipose tissue mediated by cAMP was diminished by the presence of four different NSAIDs at concentrations considered below their therapeutic range. This inhibitory action should be added to the growing list of biological effects exhibited by NSAIDs; to date, no connection between cyclooxygenase activation and catecholamine signalling pathway has been reported.

The results help to explain some effects of NSAIDs that limit the metabolic disturbances produced in the liver after acute intoxication with ethanol. Admini-

stration of ethanol at doses of 5 g kg⁻¹ bodyweight leads to an increase in the hepatic content of TAG and TBARS (Zentella de Piña et al 1992, 1993), and to a 6- to 20-fold greater secretion of epinephrine (Vogel et al 1986), a hormone with marked lipolytic action. An increased mobilization of fatty acids from the storage tissues is an important contribution to the fatty liver observed after ethanol intoxication (Horning et al 1960). On the other hand, pharmacological doses of NSAIDs (Insel 1990) partially reversed the hepatic increase in TAG and TBARS promoted by ethanol intoxication (Zentella de Piña et al 1992, 1993), and, to date, no explanation has been offered for this action. The inhibitory effect of NSAIDs on the epinephrine-mediated lipolysis described here can provide an experimental framework with which to explain the beneficial actions of some NSAIDs against the deleterious effects of ethanol on the liver. Thus, in animals intoxicated with high doses of ethanol, NSAIDs diminished the stimulatory effect of an elevated concentration of epinephrine, decreasing the release of fatty acids from the epididymal fat pad cells to the liver and maintaining the hepatic pool of TAG at near normal values. Interference with the hepatic availability of fatty acids for peroxidation reactions might be related to the marked reduction of TBARS in the liver of ethanol-intoxicated rats treated with NSAIDs (Zentella de Piña et al 1992, 1993).

The metabolic antagonism between epinephrine and NSAIDs is not limited to lipolysis in adipocytes; in isolated rat hepatocytes, piroxicam blocked epinephrine-mediated glucose release from lactate (Riveros-Rosas et al 1999). The lack of effect of the different NSAIDs on dihydroalprenolol binding to the epinephrine receptors on guinea-pig cell membranes, together with the reduced dibutylryl cAMP-dependent lipolysis of rat adipocytes, suggests that NSAIDs interfere with the epinephrine pathway at or downstream of the cAMP-dependent protein kinase.

Ethanol and NSAIDs are among the most consumed drugs by humans. This work highlights the need to be aware of, and to extend the information available on, the interplay between simultaneous presence of acute ethanol intoxication and the pharmacological use of NSAIDs. Results of this study are limited to the acute use of both compounds and the potential antagonism of these drugs at the level of the adrenergic hormones acting on lipolysis. In this particular case, the antagonism appears profitable to the liver, impairing some toxic effects of ethanol alone by limiting the availability of fatty acids provided by adipocytes. Nevertheless, chronic use or abuse of both compounds might offer a different picture in which the interplay between these

molecules may be broader, and may include other cellular types apart from adipocytes and hepatocytes (Riveros-Rosas et al 1999) and additional regulatory systems such as control of genetic expression. Knowledge of the relationship between ethanol and NSAIDs is necessary in the clinical setting to better understand the possible gains and risks of chronic use of NSAIDs in chronic alcoholics.

Conclusions

The results of this work show that pharmacological doses of NSAIDs can affect the release of fatty acids from deposits by inhibiting the action of epinephrine on adipocytes. Furthermore, some metabolic disturbances observed in the liver of rats acutely intoxicated with ethanol can be prevented by limiting the availability of fatty acids to the liver by an inhibition of lipolysis.

References

- Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Cronstein, B. N., Montesiños, M. C., Weissmann, G. (1999) Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6377-6381
- Honnor, R. C., Dhillon, G. S., Londo, C. (1985) cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. I. Cell preparation, manipulation and predictability in behavior. *J. Biol. Chem.* **260**: 15122-15129.
- Horning, M. G., Williams, E. A., Maling, H. M., Brodie, B. B. (1960) Depot fat as source of increased liver triglycerides after ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**: 635-640
- Insel, P. A. (1990) Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout. In: Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. (eds) *The pharmacological basis of therapeutics*, 8th edn. Pergamon Press, New York, p. 638
- Johnson, A. G., Nguyen, T. V., Day, R. O. (1994) Do nonsteroidal antiinflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **121**: 289-300
- Neville, D. M., Jr (1968) Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **154**: 540-552
- Reyes-Salcido, V., Villalobos-Molina, R. (1999) Patterns of adrenoceptor change during liver regeneration of Wistar Kyoto rat: a binding study. *Arch. Med. Res.* **30**: 89-92
- Riveros-Rosas, H., Zentella de Piña, M., Guinzberg, R., Saldaña-Balmori, Y., Julian-Sanchez, A., Sauvedra-Molina, A., Piña E. (1999) Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **360**: 49-59
- Rudbell, M. (1964) Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239**: 375-380

- Stone, D. B., Brown, J. D., Steele A. A. (1969) Effect of sodium salicylate on induced lipolysis in isolated fat cells of the rat. *Metabolism* 18: 620-624
- Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of the aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* 231: 232-235
- Vogel, W. H., DeTurck K., Miller, J. M. (1986) Differential effects of ethanol on plasma catecholamine levels in rats. *Biochem. Pharmacol.* 35: 3983-3987
- Warnick, G. R. (1986) Enzymatic methods for quantification of lipoprotein lipids. *Methods Enzymol.* 129: 101-123
- Yin, M. J., Yamamoto, Y., Gaynor, R. (1998) The antiinflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 395: 77-80
- Zentella de Piña, M., Hernández-Tobías, A., Saldaña-Balmori, Y., Díaz-Belmont, A., Piña, E. (1992) Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett.* 298: 123-125
- Zentella de Piña, M. Saldaña-Balmori, Y., Hernández-Tobías, A., Piña, E. (1993) Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17: 1228-1232