

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**POSTGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE GLUTATIÓN
TOTAL EN EL HÍGADO DE RATA EN
RESPUESTA A LA INTOXICACIÓN AGUDA
CON ETANOL : PAPEL DE LOS AGONISTAS
ADRENÉRGICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

(Biología Experimental)

P R E S E N T A:

DEYAMIRA MATUZ MARES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE PIÑA GARZA

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2005

m343699



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

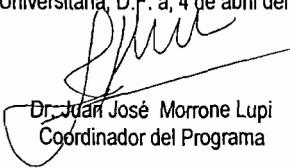
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Matuz Mares Deyamira** con número de cuenta **91402338** con la tesis titulada: "Análisis del contenido de glutatión total en el hígado de rata en respuesta a la intoxicación aguda con etanol: Papel de los agonistas adrenérgicos", bajo la dirección del(a) Dr. Enrique Piña Garza.

Presidente:	Dr. Federico Martínez Montes
Vocal:	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Secretario:	Dr. Enrique Piña Garza
Suplente:	Dr. Héctor Riveros Rosas
Suplente:	Dr. Rolando Hernández Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 4 de abril del 2005



Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

APOYOS RECIBIDOS

Beca complementaria **DGEP** de septiembre del 2002 a junio del 2004.

Beca de **CONACYT** (número de becario 172455) de septiembre del 2002 a junio del 2004.

Este trabajo de investigación fue financiado parcialmente por los proyectos:
348223M CONACYT
IN211502-2 DGAPA

Mi agradecimiento a los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Federico Martínez Montes
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Dr. Enrique Piña Garza
Dr. Héctor Riveros Rosas
Dr. Rolando Hernández Muños

AGRADECIMIENTOS

A Dios: por regalarme la vida y permitirme realizar mis sueños.

A mi Madre: por su amor y apoyo incondicional, pero sobre todo por su ejemplo de vida.

A mi Padre: por su amor y por todo lo que me ha enseñado.

A mi Hermana: por su inmenso amor, su complicidad, su alegría, su rebeldía, por lo que hemos compartido (Sabes que estoy muy orgullosa de ti).

A Abraham: por su apoyo incondicional, paciencia, alegría y amor, por siempre incitarme para seguir adelante. Te amo.

A mis amigos : Norma, Selene, Carmen, Lizbeth, Lupita, Alfonso, Elia, Arturo, Lucy, Beto, David, Rigoberto, Karina, Laura, Gabi, Ana, Lalo, Enrique, Héctor, Alberto, Alain, gracias por su apoyo y por compartir su tiempo y vida, los quiero mucho.

Al Dr. Enrique Piña Garza: por ser mi maestro durante todo este proceso de formación académica, por su apoyo incondicional, toda mi admiración y profundo respeto.

A la Dr. Martha Zentella de Piña: por su apoyo y por permitirme realizar gran parte de este trabajo en su laboratorio.

Al M. en C. Héctor Vázquez Meza: por todas sus enseñanzas, amistad y apoyo, con toda mi admiración y respeto.

Al M. V.Z. Enrique Moreno Hernández: por todas sus enseñanzas y su invaluable apoyo, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Héctor Riveros Rosas: por su amistad y apoyo incondicional.

A la Dr. Raquel Guinzber: por sus enseñanzas, su amistad y por todos los comentarios que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A todos mis compañeros de los laboratorios 34 y 5 del departamento de bioquímica de la facultad de Medicina, Analía, Alain, Adrian, Surid, Eduardo, Ruy, Daniel gracias por las horas de trabajo compartidas y por su alegría.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica: Mohamed Alí, Juan José, Carlos, Oscar, Erick, gracias por su apoyo y eterna alegría.

Mi mas sincero agradecimiento el comité tutorial integrado por:

Dr. Federico Martínez Montes

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Enrique Piña Garza

Dr. Héctor Riveros Rosas

Dr. Rolando Hernández Muños

Gracias por sus atinados comentarios que contribuyeron a mejorar este trabajo.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	2
Tabla de abreviaturas	3
Introducción	5
➤ Etanol	6
➤ Metabolismo del etanol	11
➤ Metabolismo del acetaldehído	15
➤ Especies de oxígeno reactivas	17
➤ Papel de las especies de oxígeno reactivas en la señalización celular	19
➤ Qué es el estrés oxidativo y cómo lo produce el etanol	20
➤ Antioxidantes	23
➤ Glutación	24
➤ Síntesis del glutación	27
➤ Otras funciones del glutación	29
➤ Hígado	31
Antecedentes	34
Hipótesis	39
Objetivo General	40
Objetivos Particulares	40
Materiales y Métodos	41
Resultados	44
Discusión	64
Conclusiones	70
Bibliografía	71

RESUMEN

El glutatión es un tripeptido y el principal antioxidante intracelular, actúa como atrapador de radicales libres y como reductor del H_2O_2 , puede presentarse tanto en forma de tiol reducido (GSH), como de disulfuro oxidado (GSSG). La suma de las formas tiol reducido más la de disulfuro oxidado, más la porción de glutatión unido a proteínas se le conoce como glutatión total (GSH_T). El glutatión se encuentra en todos los órganos, pero donde se presenta en mayor cantidad es en el hígado, el cual actúa como centro de síntesis almacenamiento y distribución de dicho tiol para su utilización por otros tejidos y órganos periféricos. Estudios previos señalan que el etanol, en dosis agudas, ocasiona el abatimiento de los niveles de glutatión y además tiene un efecto directo sobre el eje pituitario adrenal lo que ocasiona un incremento en la liberación de hormonas adrenérgicas. También se ha documentado que en hígados de rata perfundidos el eflujo de glutatión es estimulado por la vasopresina, la epinefrina y el glucágon. En el presente estudio se analiza el efecto del etanol sobre el GSH_T en hepatocitos aislados, así como el efecto de algunos agonistas adrenérgicos sobre su movilización en tales células. En hepatocitos aislados provenientes de células de animales alimentados ó ayunados incubados con una dosis aguda de etanol (50 mM), se ocasiona una disminución en los niveles de GSH_T intracelular y extracelular. La epinefrina, fenilefrina e isoproterenol producen un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.01$) en el eflujo de la poza celular de GSH_T al medio de incubación, exclusivamente en hepatocitos aislados de ratas con 48 h de ayuno e incubados 1 h con los aminoácidos Gln, Gly, Ser, Met. Este incremento en el eflujo no fue observado cuando los hepatocitos fueron aislados de ratas alimentadas, o cuando la glucosa substituyó a los aminoácidos (aa's) indicados en el medio de incubación. El contenido de GSH_T se incremento después de 1 h de incubación con los aa's indicados. Los agonistas adrenérgicos no modificaron el incremento de GSH_T obtenido sólo con los aa's, pero si su eflujo, encontrándose una mayor cantidad de GSH_T en el medio de incubación. En hepatocitos aislados y bajo las condiciones del modelo experimental empleado se observa, en todos los experimentos y de manera consistente una mayor cantidad de GSH_T en el medio extracelular. Los resultados obtenidos nos permiten concluir lo siguiente:

- La incubación de hepatocitos en presencia de una dosis aguda de etanol ocasiona la disminución en los niveles de GSH_T intracelular y extracelular, tanto en células de animales alimentados como ayunados, lo que sugiere una disminución en la síntesis de GSH_T.
- En hepatocitos aislados e incubados con aminoácidos más epinefrina, fenilefrina e isoproterenol se incrementa el eflujo del GSH_T.
- En hepatocitos aislados e incubados con aminoácidos más etanol, más epinefrina, fenilefrina ó isoproterenol se incrementa el eflujo y la síntesis de GSH_T.
- El efecto del etanol al disminuir la poza de GSH_T en el hepatocito es independiente de la acción de las catecolaminas.

SUMMARY

Glutathion is main intracellular thiol, acts as scavenger of free radicals and as reducer of the H_2O_2 ; it can appear as much in form of a reduced thiol (GSH), or like an oxidized disulfide (GSSG). The sum of forms: reduced thiol plus oxidized disulfide, plus the portion of glutathion bound to proteins is denominated total glutathion (GSH_T). The glutathion is found in all organs of the body, but where it appears in greater amount is in the liver, which act like the center of synthesis, storage, and distribution of glutathion. Previous studies indicate that ethanol in acute doses causes a diminution of the glutathion levels and has a direct influence on the adrenal pituitary axis what causes an increase in the hormone liberation. Also it has been documented that efflux of glutathion is stimulated by vasopresine, epinephrine, and glucagon in perfused rat liver. In this study the direct influence of ethanol on the hepatic glutathion is analyzed, as well as the effect of some adrenergic agonists on the mobilization of the total glutathion (GSH_T) in isolated cells. The incubation of isolated hepatocytes with an acute dose of ethanol (50 mM) produced a diminution in the levels of intracellular and extracellular GSH_T in both fed and fasted animal cells. Epinephrine, phenylephrine and isoproterenol produced a statistically significant increase ($P < 0.01$) in the efflux of cellular GSH_T toward the incubation media, but only in hepatocytes isolated from 48 h fasted rats and incubated during 1 h with Gln, Gly, Ser, Met. This increased efflux was not observed if hepatocytes were isolated of fed rats, or if glucose substituted the indicated aminoacids (aa) in the incubation mixture. After 1 h of incubation with indicated aa the GSH_T content increased. Adrenergic agonists did not modify the increase in GSH_T obtained with aa alone, but the efflux and GSH_T increased in incubation mixture. In isolated hepatocytes and incubated with aminoacids more ethanol, epinephrine, phenylephrine and isoproterenol increased efflux and GSH_T synthesis. In isolated hepatocytes and under the conditions of the experimental model used in this work, a greater amount of GSH_T was observed in extracellular mixture. The obtained results allow us to conclude the following:

- The incubation of hepatocytes with an acute dose of ethanol causes the diminution on intracellular and extracellular GSH_T content, both in cells of fed or fasted animals; this could suggests a diminution in the GSH_T synthesis.
- In isolated hepatocytes and incubated with aminoacids more epinephrine, phenylephrine and isoproterenol the efflux and GSH_T synthesis was increased.
- Isolated hepatocytes incubated with aminoacids more ethanol, epinephrine, phenylephrine and isoproterenol showed an increased GSH_T efflux and GSH_T synthesis.
- The diminution of GSH_T pool in hepatocytes by ethanol is independent of the action of catecholamines.

TABLA DE ABREVIATURAS

ADH _s	Alcohol deshidrogenasas
ADP	Adenosíndifosfato
ALDH _s	Aldehído deshidrogenasas
AO	Aldehído oxidasa
ATP	Adenosíntrifosfato
EOR	Especies de oxígeno reactivas
GCS	γ-glutamilcistein sintetasa
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
GSH _s	Glutación sintetasa
GSH _T	Glutación total
GSH peroxidasa	Glutación peroxidasa
GSH reductasa	Glutación reductasa
LDH	Deshidrogenasa láctica
MAOS	Sistema microsomal oxidante del acetaldehído
MEOS	Sistema microsomal oxidante del etanol
NAD ⁺	Nicotinamín adenín dinucleótido
NADH	Nicotinamín adenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamín adenín dinucleótido de fosfato
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido de fosfato reducido

SOD	Superóxido dismutasa
TAG	Triacilglicéridos
TBARS	Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
Trx peroxidasa	Tiorredoxina peroxidasa
Trx reductasa	Tiorredoxina reductasa

INTRODUCCIÓN

El hombre ha ingerido alcohol desde la antigüedad mediante el consumo de frutos y granos en estado fermentativo (Velasco, 1992). Para algunas civilizaciones el consumo de alcohol sólo era permitido en actividades religiosas y limitado a determinadas clases sociales (Milke, 1995). En la actualidad, el abuso en el consumo de bebidas alcohólicas es causante de una enorme problemática que afecta a todas las esferas sociales y económicas (Williams *et al.*, 1988), y ha llegado a constituir uno de los problemas más importantes de salud pública dado que cada vez afecta a más individuos, siendo éstos cada vez más jóvenes (Schuckit and Irwin, 1988). En nuestro país, los resultados de la Encuesta Nacional de Adicciones realizada por el Consejo Nacional de las Adicciones (CONADIC), reportaron un incremento en el índice de consumo de los adolescentes de 27% en 1998 al 35% en 2002 entre varones, y del 18% al 25% entre mujeres. Globalmente, de la población adulta, el 90% de las personas consumen etanol, del 40-50% de éstos tienen problemas temporales relacionados a su consumo, mientras que el 10% de los hombres y 5% de las mujeres persisten en el consumo desarrollando alcoholismo. El término “alcoholismo” se refiere al consumo excesivo de alcohol de forma prolongada con dependencia emocional y a veces orgánica del mismo (Sánchez-Turet, 1999; Cuadrado, 2000; Calvo, 2003). Es una enfermedad crónica producida por el consumo incontrolado de bebidas alcohólicas, lo cual perturba la salud física, ocasiona irritación del tracto gastrointestinal, deficiencias nutricionales, problemas en el hígado, daño cerebral, trastornos de la piel, musculares y óseos, daño celular, entre otros (Zentella, 1994; Anand, 1999; Wu y Cederbaum, 2003; Lieber, 2003); afecta la actividad mental (*delirium*, demencia, trastornos amnésicos, depresión, ansiedad, trastornos del sueño) y modifica la conducta social del individuo y de la familia del sujeto enfermo (Kaplan y Sadock, 1996; OMS, 1996; Olmedo y Sánchez, 2003).

ETANOL

El alcohol, alcohol etílico o etanol, es el más común y conocido de todos los alcoholes; su molécula está formada por dos átomos de carbono, uno de los cuales está unido al grupo hidroxilo característico de los alcoholes, completándose con cinco hidrógenos (Figura 1); teniendo un peso molecular es de 46.06 g. El alcohol puro provee 7.1 kcal/g. Tiene un punto de fusión de -114°C , un punto de ebullición de 78.5°C y una densidad relativa de 0.789 a 20°C (Merck index 1989).

Es una molécula pequeña, miscible con el agua, posee una distribución desigual de sus cargas, lo que le confiere cierta polaridad. Se puede mover con gran facilidad a través de las membranas celulares y subcelulares (Riveros *et al.*, 1997).

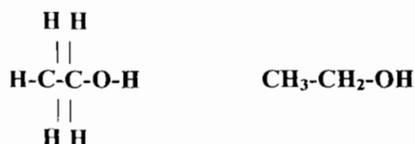


Figura 1. Estructura molecular y fórmula química del etanol o alcohol etílico.

El etanol es un líquido de aspecto similar al agua, pero bastante más volátil que ésta, tiene un olor característico y es altamente inflamable. Es el producto final de la fermentación en las levaduras de los azúcares naturales presentes en productos vegetales como uvas, manzanas, cebada y maíz (Lehninger, 2001; Laguna y Piña, 2002). Para el consumo humano las bebidas alcohólicas están principalmente constituidas por agua, etanol, cantidades variables de azúcares y colorantes, así como productos naturales de los vegetales que se sometieron a la fermentación y aquellos que se generaron durante el proceso fermentativo o de destilación. Su contenido de otros nutrientes como proteínas, vitaminas y minerales es insignificante (Lieber, 2003). Tanto el contenido de azúcares como de etanol varía dependiendo del tipo de bebida, por ejemplo el whisky, coñac y vodka no contienen azúcares; mientras que el vino blanco y el rojo contienen de 2 a 10 g de azúcar por litro (g/L), la cerveza 30 g/L, los vinos dulces hasta 120 g/L.

Con respecto al contenido de alcohol, la cerveza presenta de 40 a 50 g/L, en el vino es de 120 g/L y en los licores destilados de 400 a 500 g/L (Lieber, 2003).

El hombre no forma etanol como un intermediario de su metabolismo, pero si cuenta con isoenzimas capaces de oxidarlo (Zentella *et al.*, 1993). Hay que hacer notar que existen variaciones genéticas que influyen en el polimorfismo de las enzimas responsables del metabolismo del etanol, además de otros factores como:

- La edad (individuos jóvenes son más sensibles a los efectos neurotóxicos del alcohol, mientras que sujetos mayores son menos sensibles).
- Sexo (el tipo de constitución femenina, con un mayor contenido en grasa y una menor proporción de agua, constituye un agravante en su adicción, ya que la ingesta de alcohol en la misma cantidad y calidad que un hombre, le afecta de una forma más intensa, teniendo mayor predisposición a adquirir enfermedades relacionadas con el consumo de alcohol).
- Estado de ayuno o alimentación (la presencia de alimentos en el estómago retarda su vaciamiento, es decir, a mayor cantidad de alimentos antes de ingerir alcohol, menor será la cantidad de etanol absorbido en el intestino) que contribuyen a la absorción, la distribución y el metabolismo del alcohol (Riveros *et al.*, 1997; Crews *et al.*, 2000; Calvo, 2003).

Para la mayoría de la gente que consume alcohol en cantidades moderadas, no se presenta ningún problema ni social, ni de salud; sin embargo, pueden presentarse problemas sociales y de salud, tanto agudos como crónicos debido a la ingesta exagerada de etanol, ya sea en función de la cantidad de etanol ingerida, como del período de consumo (Calvo, 2003). Cada individuo responde de forma diferente al consumo de etanol, desde modificaciones de conducta al ingerir cantidades moderadas, o bien ingieren cantidades considerables de etanol que casi no modifican su conducta (Cuadro 1).

Cuadro 1.-Efectos físicos y psicológicos que con mayor frecuencia se presentan de acuerdo a los diferentes niveles de alcoholemia.

NÚMERO DE TRAGOS	CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN SANGRE EN MMOLAS/ L	EFFECTOS FÍSICO Y PSICOLÓGICOS
1	0-5	Sin efecto. Ligera elevación de estado de ánimo.
2	5-10	Sensación de relajación y calor. Disminución del tiempo de reacción. Disminución de la coordinación fina.
3	10-15	Alteración ligera del equilibrio.
4	15-20	A partir de este nivel comienza el estatus de ebriedad legal. Euforia.
5	20-25	La coordinación y el equilibrio se dificultan. Alteración de las facultades mentales y del juicio.
6	25-30	Alteración mayor del control físico y mental. Habla y visión difíciles.
7	30-35	Pérdida del control motor (requiere ayuda). Confusión mental.
10	35-50	Intoxicación severa. Control consciente mínimo.
14	50-70	Inconsciencia. Estupor e inicio de estado comatoso.
17	70-80	Coma profundo.
20	80-100	Muerte por depresión respiratoria.

Dependiendo del tipo de bebida alcohólica que se consuma, un trago corresponde a un volumen de 180 ml cuando se trata de vino, a 360 ml cuando es de cerveza y a 45 ml de whisky, brandy o vodka (Zentella *et al.*, 1987; Elizondo, 2004).

El consumo exagerado de alcohol etílico o etanol conduce al desarrollo de diversas patologías que afectan varios órganos y tejidos principalmente: el hígado, el estómago, el páncreas y el sistema nervioso (Zentella de Piña, 1994).

En el caso del hígado los tipos más comunes de enfermedades debidas al consumo de etanol son:

- Esteatohepatitis alcohólica (también conocida como hígado graso o esteatosis): acumulación de grasa histológicamente visible en los hepatocitos (Lee, 1994).
- Hepatitis alcohólica: cambios inflamatorios que consiste en el daño y destrucción de las células hepáticas, degeneración hepática, fibrosis (Anand, 1999).
- Cirrosis alcohólica: fibrosis, reemplazo de tejido hepático normal por tejido dañado, disrupción del flujo sanguíneo a través de dicho órgano, alteración de la estructura y funcionamiento hepático (Hall, 1995).

Con respecto al estómago, el páncreas y el sistema nervioso las patologías más frecuentes son:

- En el estómago aparece irritación en la mucosa del tracto gastrointestinal con erosión en las paredes, lo que se manifiesta con náuseas, vómitos, gastritis, úlceras y perforaciones en la pared del mismo (Estruch, 2002).
- En el páncreas ocasiona inflamación (pancreatitis), necrosis y fibrosis (Apte y Wilson, 2003).
- En el sistema nervioso ocasiona encefalopatía, afecta la proliferación y diferenciación de las células neuronales, interfiere con la actividad de neurotransmisores (Guerri, 2000), causa demencia alcohólica, *delirium tremens* y diversas alteraciones neuropsicológicas como depresión clínica, disminución de la capacidad de aprendizaje, deterioro en la ejecución motora, trastornos amnésicos, síndrome de abstinencia, entre otros (Calvo, 2003). También puede causar problemas neurológicos más leves como insomnio y dolores de cabeza (Olmedo y Sánchez, 2003).

Generalmente las patologías mencionadas se ven acompañadas de estados severos de desnutrición, debido a que la mayoría de los individuos alcohólicos no consumen una dieta balanceada, además la ingesta excesiva de alcohol puede interferir en la capacidad para absorber y utilizar los nutrientes que se consumen (Lieber, 2003). Se ha encontrado que después del consumo de altas cantidades de alcohol, el intestino absorbe menos aminoácidos, lo que ocasiona una disminución en la producción de proteínas, incluyendo la producción de proteínas en el hígado como la albúmina y los factores de coagulación, también disminuye la síntesis de urea y el metabolismo de los aminoácidos aromáticos (Adibi *et al.*, 1992; Lieber, 2003). Con respecto a las vitaminas, los individuos alcohólicos con frecuencia presentan deficiencias de vitamina A (retinol), B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₆ (piridoxina), y C (ácido ascórbico), debido a la disminución en la absorción de las mismas (Ahmed *et al.*, 1994; Mendenhall *et al.*, 1995; Leo y Lieber, 1999; Lieber, 2003).

METABOLISMO DEL ETANOL

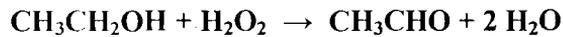
Una vez que el alcohol es ingerido se absorbe desde la mucosa epitelial de la boca (Bode, 1980; Kricka, 1979) y como vapor por los alvéolos pulmonares (Gibson, 1975; Nomiyama, 1974), aunque estas vías son prácticamente indetectables. Por esta razón, se debe considerar que casi todo el alcohol ingerido va hacia el estómago donde es metabolizado, en parte por las células de la mucosa vía alcohol deshidrogenasa y por el sistema microsomal oxidante del etanol (Hernández-Muñoz *et al.*, 1990). Sin embargo, este primer paso en el metabolismo del etanol es pequeño, por lo que la mayoría es absorbido por difusión simple a través del epitelio del estómago e intestinos de una manera muy parecida a la que ocurre con el agua y es canalizado por la vena porta directamente hacia el hígado para ser metabolizado (Lieber *et al.*, 1994; Seitz *et al.*, 1994; Oneta *et al.*, 1998). Menos del 10% del etanol ingerido es eliminado a través del riñón, pulmón y piel, mientras que más del 90% es removido por oxidación en el hígado donde es convertido de etanol a acetaldehído y acetato (Moser, 1968; Bosrom y Li, 1981; Eriksson, 1983). La oxidación del etanol produce una serie de alteraciones metabólicas en los procesos hepáticos tales como: disminución de la glicólisis, la gluconeogénesis, el ciclo de ácido cítrico y un incremento en la síntesis ácidos grasos (Cederbaum y Dicker, 1981; Lieber, 2000; Cunningham y Van Horn, 2003; Lieber, 2003).

El hígado no solo es el principal órgano responsable de la oxidación y eliminación del alcohol ingerido, sino también de la mayoría de drogas y xenobióticos que se consumen. En el hígado, existen tres sistemas enzimáticos capaces de llevar a cabo la oxidación del etanol (Lieber, 2000, 2004):

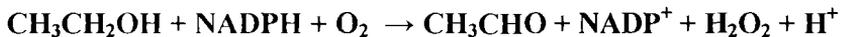
- El primer sistema está integrado por una serie de enzimas especializadas conocidas genéricamente como alcohol deshidrogenasas (ADHs), las cuales se encuentran en el citosol del hepatocito. Estas enzimas promueven la oxidación del etanol a acetaldehído, acoplando esta reacción con la reducción del nicotinamín adenín dinucleótido (NAD⁺):



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



- El tercer sistema oxidante es el llamado Sistema Microsomal Oxidante de Etanol (MEOS), el cual se localiza en el interior de los microsomas y requiere la participación de un citocromo P-450. El citocromo P-450 se acopla a la oxidación del etanol y del nicotinamín adenín dinucleótido reducido (NADPH) con la reducción de una molécula de oxígeno para formar peróxido de hidrógeno.



Estos tres sistemas trabajan simultáneamente en presencia de alcohol, con diferentes actividades y afinidades (Figura 2) (Riveros *et al.*, 1997).

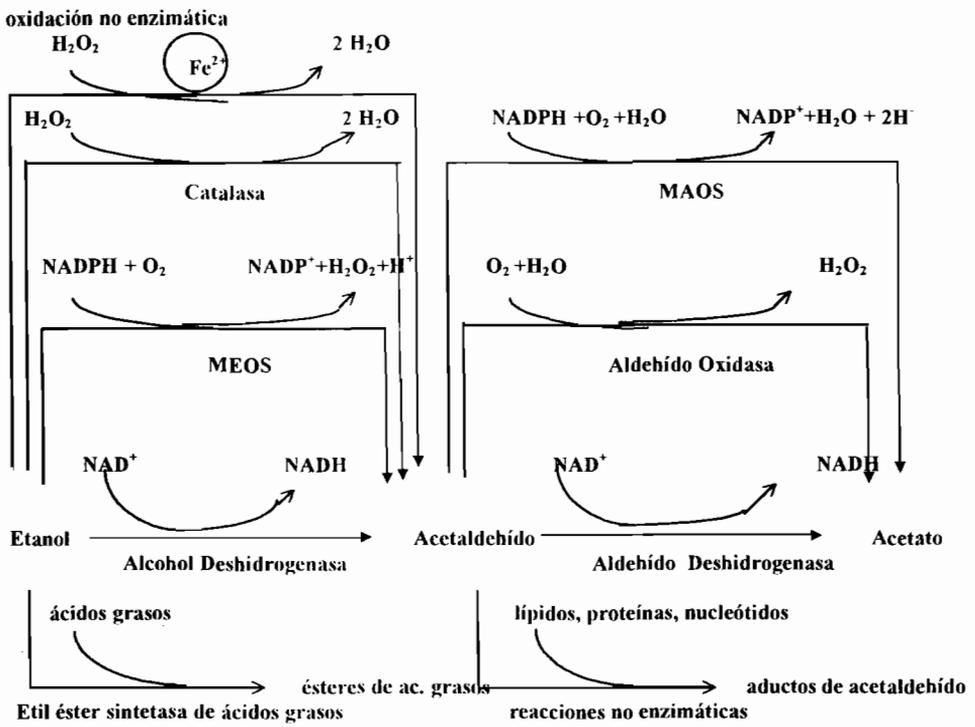


Figura 2.- Principales vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del etanol y del acetaldehído (tomado de Riveros *et al.*, 1997)

Aparte de los sistemas enzimáticos involucrados en la oxidación del etanol, existe un mecanismo no enzimático dependiente de la participación de hierro (Fe^{2+}) quelado y en presencia del H_2O_2 el cual se genera en la mitocondria y el reticulo endoplásmico, esto da lugar a la formación de iones oxhidrilo (OH^-) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) vía la reacción de Fenton, esta reacción puede también ser iniciada por iones férricos (Fe^{+3}).



Finalmente, existe una vía metabólica no oxidativa en la cual el etanol forma etil ésteres de ácidos grasos mediante la acción de una sintetasa, cuya contribución al metabolismo total del etanol puede que no sea significativa (Figura 2)(Koop, 1989).

El etanol a dosis elevadas tiene un efecto directo sobre el eje pituitario adrenal (Kharchenko, 2000) lo que ocasiona un incremento en la liberación de catecolaminas y glucocorticoides, alcanzando el doble de su concentración en sangre, además en el caso de las catecolaminas modifica su catabolismo (Riveros *et al.*, 1997; Kovács *et al.*, 2002). Las catecolaminas tienen una amplia gama de efectos en diferentes tejidos, entre ellos: aceleración del ritmo cardíaco, incremento en la presión sanguínea, estimulación del consumo de oxígeno en el hígado (Fink, 2000), estimulación de la oxidación hepática de etanol, potenciación de hepatotóxicos, estimulación de la expresión de citocinas, disminución de los valores hepáticos de glutatión (Roberts *et al.*, 1997; Sies y Graf, 1985; Moshage, 2001). Además, el etanol promueve la formación de radicales OH^- en el hígado, lo cual podría explicar parte del potencial tóxico del etanol, ya que los radicales libres (RL) generados por la intoxicación alcohólica, potencian su acción tóxica debido a la presencia de catecolaminas (Castrejón *et al.*, 2002).

METABOLISMO DEL ACETALDEHÍDO

El acetaldehído también llamado etanal, aldehído acético, y etilaldehído es el principal metabolito generado en el primer paso del catabolismo hepático del etanol; es una molécula altamente reactiva y tóxica que puede formar aductos con diversas moléculas presentes en los seres vivos (Lieber, 2003). En este sentido, gran parte de los efectos tóxicos asociados con la ingestión aguda o crónica de etanol son atribuidos a la formación de aductos de acetaldehído, el cual puede interactuar con lípidos ocasionando lipoperoxidación, con la tubulina ocasionando la completa inhibición de su ensamblaje en los microtúbulos del citóesqueleto, con diversas proteínas, aunque también puede interactuar con aminoácidos específicos, particularmente lisina, cisteína, e histidina (Tuma y Casey, 2003; Cunningham *et al.*, 2003). Existe la posibilidad de que los aductos del acetaldehído desempeñen un papel crítico en el establecimiento y desarrollo de las enfermedades hepáticas debidas al consumo exagerado de alcohol, dado que dichos aductos se presentan en el tejido hepático que muestra inflamación, fibrosis, y cambios histológicos (Niemela, 1999, 2001; Tuma y Casey, 2003). Estudios adicionales en modelos de patologías hepáticas alcohólicas han demostrado que la acumulación progresiva de acetaldehído coincide con el daño hepático (Halsted *et al.*, 1993; Niemela *et al.*, 1995); también se observa un incremento en la producción de colagenasa tanto en fibroblastos como en células estrelladas (Niemela, 2001). Por otra parte, se encontró que la acumulación de acetaldehído tanto en la mucosa gástrica, como en la del colon, podría ser un factor importante en el daño ocasionado en el estómago y en el colon por el alcohol (Salmela *et al.*, 1996, 1997; Salaspuro, 1997). Finalmente, se ha demostrado que el acetaldehído ocasiona la modificación de las proteínas mitocondriales en el cerebro debido a la formación de aductos, lo que ocasiona disfunción mitocondrial y está implicado en la neurodegeneración (Upadhyya y Radindranath, 2002).

Como se mencionó, el acetaldehído es el primer producto del metabolismo del etanol y su catábolismo, al igual que el del etanol, se lleva a cabo tanto en el estómago como en el hígado, aunque la contribución del estómago es pequeña y el principal sitio de oxidación es el hígado, donde es oxidado a través de tres vías metabólicas (Figura 2) (Pronko *et al.*, 2002):

- 1) La primera vía está mediada por un sistema enzimático conocido como aldehído deshidrogenasa o ALDHs, el cual cataliza la oxidación del acetaldehído a acetato en una reacción que requiere NAD^+ como el aceptor de electrones. Este sistema se encarga de oxidar el 90% del acetaldehído producido por el metabolismo del etanol.



- 2) En la segunda vía participa la aldehído oxidasa (AO), una enzima pobremente estudiada, la cual cataliza la oxidación del acetaldehído hacia acetato en una reacción dependiente de oxígeno y que genera H_2O_2 .



3) La tercer vía, es el Sistema Microsomal de Oxidación del Acetaldehído, también llamado MAOS. Este sistema requiere la participación de un citocromo P-450 y lleva a cabo la oxidación del acetaldehído hacia acetato en una reacción acoplada a la oxidación de un fosfato dinucleótido de adenina nicotidamina reducida (NADPH) y la reducción de una molécula de oxígeno para formar H_2O_2 , en una reacción análoga a la realizada por la MEOS sobre el etanol.



La actividad de estos sistemas se induce al doble en animales tratados crónicamente con etanol (Riveros *et al.*, 1997; Pronko *et al.*, 2002).

ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS

Como una consecuencia del metabolismo del etanol se presenta la generación excesiva de Especies de Oxígeno Reactivas (EOR), las cuales juegan un papel central en el daño celular producido por el etanol (Bautista y Spitzer, 1992; Mira *et al.*, 1995; Zima *et al.*, 2001; Wu y Cederbaum, 2003). El oxígeno molecular (O_2) es esencial para las funciones celulares ya que desempeña un papel principal como aceptor universal de electrones, y en diversas reacciones bioquímicas que ocurren en la cadena respiratoria mitocondrial, la cual en gran parte es responsable de la producción de energía en forma de ATP (Cunningham y Van Horn, 2003). Durante este proceso, diferentes EOR son sucesivamente formadas como productos intermediarios no deseados del metabolismo, entre los que se incluyen: el ión superóxido (O_2^-), los singulete de oxígeno delta y sigma (1O_2), el peróxido (O_2^{2-}), el cual normalmente existe en las células en forma de peróxido de hidrógeno (H_2O_2); y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Ferreira, 1984).

El ión superóxido (O_2^-) es el producto de la incorporación de un electrón a una molécula de oxígeno. Se produce normalmente por la acción de la enzima superóxido dismutasa. Esta molécula con la participación de un electrón y dos protones, da lugar al peróxido de hidrógeno (Zentella *et al.*, 1994). De los singuletes de oxígeno (1O_2), el sigma es el que tiene una vida media más corta, en tanto que el delta tiene una vida media más larga, lo que le confiere una mayor importancia biológica. Con respecto al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) este no es propiamente una EOR, pero es el principal promotor del radical hidroxilo ($\cdot OH$) y tiene una vida media más larga, mayor difusibilidad y mayor estabilidad, que los demás EOR (Fernández-Checa *et al.*, 1997). Finalmente el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el cual reacciona con casi todos los tipos moleculares presentes en la célula: azúcares, aminoácidos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y ácidos orgánicos, entre otros. Este es una de las especies químicas más reactivas que se conocen (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las EOR son altamente reactivas, se presentan en concentraciones muy bajas (10^{-4} a 10^{-9} M), por lo que pueden dañar a las células, mediante dos mecanismos generales de acción:

- 1) Alteración del estado redox intracelular, ya que en comparación con el ambiente extracelular, el citosol celular normalmente se mantiene en condiciones fuertemente reductoras.

- 2) Modificaciones de los grupos tiol de las proteínas, lo que puede alterar su estructura y función (activación o inactivación de enzimas y de factores de transcripción) (Thannickal y Fanburg, 2000).

Se ha estimado que sólo el 2% del O₂ consumido por la cadena respiratoria es convertido en EOR (Droge, 2002; Bailey *et al.*, 1999). Además de la cadena respiratoria mitocondrial, algunas otras fuentes celulares generadoras de EOR son: la NADPH oxidasa presente en neutrófilos y macrófagos, la cual genera grandes cantidades de ión superóxido, los peroxisomas (Keisari *et al.*, 1983; Roberts *et al.*, 1999), los linfocitos (Los *et al.*, 1995), la ciclooxigenasa-1 (Feng *et al.*, 1995), y la xantina oxidasa (Friedl *et al.*, 1989) entre otros.

Bajo ciertas condiciones, como la exposición crónica o aguda al alcohol, o por algunos agentes tóxicos como el tetracloruro de carbono, el paraquat y el paracetamol, se incrementa la producción de EOR, las cuales pueden producir daño celulares a través de la lipoperoxidación de membranas, inactivación de enzimas, polimerización de polisacáridos, hidroxilación de bases, entrecruzamientos de proteínas, escisión de las bandas de DNA que causa mutaciones e inhibición de la síntesis de proteínas, y hasta la muerte celular (De Groot, 1994; Nakazawa *et al.*, 1996; Toykuni, 1999).

En medicina, las EOR han adquirido gran importancia debido a que se les relaciona con una amplia variedad de enfermedades, esta importancia se refleja en los reportes de la literatura internacional en los que señalan que el exceso en la generación de EOR y el estrés oxidativo resultante, juegan un papel importante en algunas enfermedades humanas como son algunos tipos de cáncer, diabetes, porfiria, arteriosclerosis, inflamación crónica, VIH, cataratas, artritis, Alzheimer, Parkinson, infecciones, enfermedades cardiovasculares, daño hepático, toxicidad de metales pesados, deficiencia de vitaminas, entre otras (Knight, 1998; Droge, 2002; Lieber, 2003).

PAPEL DE LAS EOR EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR.

Las EOR producidas en diferentes fuentes celulares son participantes esenciales de la señalización y regulación de los procesos celulares, ya que existen fuertes evidencias del papel fisiológico de las EOR, tanto en mamíferos, como en bacterias y plantas (Finkel, 1998; Thannickal y Fanburg, 2000).

La noción de que moléculas como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el H_2O_2 pueden actuar en la traducción de señales en células de mamífero surge con los primeros reportes de Mittal y Murard en 1977, los cuales sugieren que el $O_2^{\cdot-}$ estimula la activación de la glutamato ciclasa y la formación del segundo mensajero GMPc. Mas adelante Roth y Droge (1987) encontraron que en células-T activadas el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 incrementan la producción del factor de crecimiento interleucina-2, una proteína inmunológicamente importante para dichas células. Keyse y Tyrrell (1989) demuestran que el H_2O_2 induce la expresión del gen de la hemo oxigenasa (HO-1), en tanto que Storz *et al.*, en 1990 reportan la inducción de varios genes en bacterias por acción del H_2O_2 .

Actualmente, se sabe que las EOR se encuentran involucrados en diversas funciones fisiológicas como regulación del tono vascular, estimulación de la división celular, activación del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB), inducción de fosforilación de residuos de tirosina y la activación de los factores de crecimiento derivados de plaquetas PDGF- α y PDGF- β , activación de PKC, activación de MAPK, inducen cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Las EOR inhiben la actividad de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} , incrementan las señales de traducción de varios receptores de membrana incluyendo, cinasas, fosfatasas, factores de crecimiento, y regulan la actividad de factores de transcripción de unión al DNA, entre otros (Finkel, 1998; Hensley *et al.*, 2000; Thannickal y Fanburg, 2000; Droge, 2002; Bigelow y Squier, 2005; Lee y Wei, 2005).

QUÉ ES EL ESTRÉS OXIDATIVO Y CÓMO LO PRODUCE EL ETANOL

El incremento en la producción de EOR y/o una disminución en el nivel de actividad de las defensas antioxidantes se le conoce como estrés oxidativo. Este estado se caracteriza por un desequilibrio entre la velocidad de producción de las EOR y la capacidad de las defensas antioxidantes del organismo para removerlas y reparar los daños producidos a los complejos moleculares (Comporti and Benedetti, 1985; Haliwell, 1987; Zentella de Piña y Balmori, 1996; Fernández-Checa *et al.*, 1997; Buettner y Schafer, 2000).

El alcohol produce estrés oxidativo mediante varios procesos, entre los que se incluye:

- Cambios en la célula en la proporción NAD^+/NADH como resultado del metabolismo del alcohol. En los dos primeros pasos del metabolismo del alcohol se da la formación de una molécula de NADH (Cunningham y Van Horn, 2003; Wu y Cederbaum, 2003; Nagy, 2004). La acumulación de NADH en el citosol celular promueve la transferencia de este equivalente reductor a la matriz mitocondrial mediante la lanzadera de malato-aspartato. Una vez dentro de la mitocondria el NADH sirve como sustrato de la cadena respiratoria y su reoxidación ocasiona un aumento en el consumo de O_2 y la subsiguiente formación de EOR (Cunningham y Bailey, 2001; Bailey y Cunningham, 2002; Adachi y Ishii, 2002).
- La producción de acetaldehído durante el metabolismo del alcohol y su subsiguiente oxidación por la aldehído oxidasa (AO), y el MAOS favorece la formación de EOR, además el acetaldehído puede reaccionar con proteínas tanto citosólicas como de membrana formando aductos que contribuyen al daño celular (Mira *et al.*, 1995; Tuma y Casey, 2003).
- Como consecuencia del consumo exagerado de etanol la mitocondria sufre cambios en su estructura y función, como son alteración en el contenido de proteínas mitocondriales, bajas cantidades de complejos enzimáticos, incremento en el consumo de oxígeno y desarrollo de hipoxia. El etanol también

altera la reparación de estructuras celulares y complejos moleculares, disminución de la glicólisis a consecuencia de la baja disponibilidad de glucosa, todo lo anterior resulta en una menor producción de ATP y en consecuencia una disminución en la síntesis de glutatión total (GSH_T) (Cunningham y Van Horn, 2003)

- Efectos sobre las estructuras y funciones celulares, causadas por la interacción del alcohol con los componentes de membrana como son los fosfolípidos (lo cual aumenta la fluidez de la membrana, disminuye la presencia de enzimas unidas a membrana y de receptores hormonales), o las enzimas (la oxidación de un residuo de cisteína localizado en el sitio catalítico de la enzima puede ocasionar su inactivación) (Wu y Cederbaum, 2003).
- Induce un mayor consumo de oxígeno tanto de forma indirecta como directa, siendo una de las formas indirectas la activación de las células de Kupffer. De forma directa exagera las diferencias normales de los niveles de oxígeno que se presentan en cada uno de los lóbulos del hígado y en consecuencia una mayor deficiencia de oxígeno en las zonas perivenosas (Cunningham y Van Horn, 2003; Nagy, 2004).
- Causa un incremento en la actividad de la enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1) ya que el etanol, desplaza a otros sustratos metabolizados por dicha enzima e incrementa su actividad hasta 10 veces más de lo normal (Dan *et al.*, 2005). Dicha enzima también metaboliza acetaldehído y otras moléculas (acetaminofen), generando EOR y ocasionando una disminución en las defensas antioxidantes (Sun *et al.*, 2001; Lieber, 2004).
- Induce un incremento en los niveles celulares de hierro, esto contribuye a la formación del radical hidroxilo (OH), lo cual se describe mediante la reacción de Fenton (Nanji y Hiller-Sturmhorfel, 1997).

- Afecta la actividad de las enzimas y moléculas antioxidantes principalmente glutatión, lo cual altera el estado redox intracelular (Fernández-Checa, *et al.*, 1997; Droge, 2002).
- Conversión de la enzima xantina deshidrogenasa a la forma xantina oxidasa la cual genera EOR (Sultatos, 1988; Brown *et al.*, 1991; Wu y Cederbaum, 2003).
- El alcohol incrementa la permeabilidad del intestino por las endotoxinas de bacterias gram negativas, estas endotoxinas activan las células de Kupffer las cuales mediante la enzima NADPH oxidasa generan el ión superóxido (O_2^-), favoreciendo de esta manera un estado de estrés oxidativo en el hígado (Kono *et al.*, 2000).

ANTIOXIDANTES

Los organismos aerobios han desarrollado sistemas de protección que funcionan como atrapadores de las EOR, cuando éstas se generan en exceso y con ello previenen el daño que puedan producir (Alarcón, 2001). Estas moléculas de defensa son denominados antioxidantes y protegen a la célula de los radicales $\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 , y en algunos casos NO . Halliwell y Gutteridge (1999) han definido a los antioxidantes como aquellas sustancias que a relativamente bajas concentraciones, son capaces de competir con otros substratos oxidables y disminuir significativamente o inhibir la oxidación de estos substratos.

Los sistemas antioxidantes se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GSH peroxidasa), la glutatión reductasa (GSH reductasa), la tiorredoxina reductasa (Trx reductasa) y la tiorredoxina peroxidasa (Trx peroxidasa) (Nordberg y Arnér, 2001; Droge, 2002). Los sistemas no enzimáticos son: las vitaminas E, C, y A, el beta caroteno, la bilirrubina, la adenosina, algunos fenoles, la cisteína, la metionina, la glicina, el glutamato, la S-adenosín-L-metionina, el urato, el ácido lipóico, el NADPH, la tiorredoxina y el glutatión reducido, principalmente (Matés, 2000; Droge, 2002; Wu y Cederbaum, 2003; McDonough, 2003; Atmaca, 2004).

GLUTATIÓN

El glutatión es un tripéptido constituido por los aminoácidos L-glutamato, L-cisteína y L-glicina, tiene un peso molecular de 307 Da, puede presentarse tanto en forma de tiol reducido (GSH) como de disulfuro oxidado (GSSG); el 99% del glutatión celular está presente en su forma de tiol reducido (Figura 3) (Meister y Anderson, 1983; Wang *et al.*, 2004); sin embargo, al hablar de glutatión celular se considera la forma de tiol reducido sumada a la de disulfuro oxidado, más la porción de glutatión unido a proteínas. A la suma de esto se le conoce como glutatión total (GSH_T) (DeLeve y Kaplowitz, 1991; Sies, 1999; Dickinson y Forman, 2002).

En las células, el glutatión (GSH) desempeña diversas funciones, algunas de las cuales son activación de linfocitos-T, por lo que juega un papel importante en la respuesta inmune, participa en procesos de regulación de expresión de genes, de señales de traducción, regulación de síntesis de DNA, proteínas y proteólisis, proliferación celular incluyendo linfocitos y células del epitelio intestinal, procesos apoptóticos, producción de citosinas, glutationilación de proteínas, regulación de la integridad y funcionamiento de la mitocondria, también juega un papel importante en la espermatogénesis y maduración espermática, inhibe infecciones producidas por virus (por ejemplo la influenza), desempeña un papel central en la patogénesis de diversas enfermedades (cáncer, inflamación, deficiencia de proteínas, Alzheimer, Parkinson, enfermedades hepáticas, fibrosis quística, VIH, ataques cardíacos, accidente vascular cerebral de tipo hemorrágico, diabetes), es importante en el metabolismo de nutrientes (Sen, 2000; Dickinson y Forman, 2002; Townsend *et al.*, 2003; Pompella *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2003; Turrens, 2003; Wu *et al.*, 2004). De la amplia gama de funciones del glutatión, la más importante es la que desempeña como antioxidante intracelular, ya que dentro del grupo de antioxidantes de los que dispone la célula, el predominante es el glutatión (Atmaca, 2004).

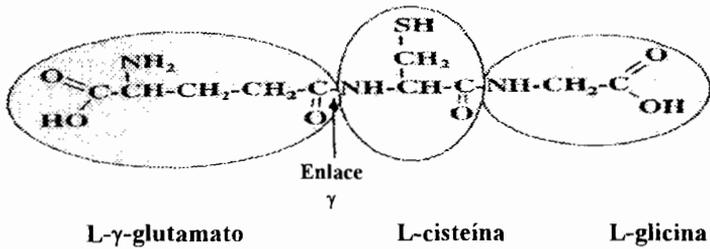
De los sistemas antioxidantes con los que cuenta el hígado, el más importante, por ser éste su principal sitio de síntesis, almacenamiento y exportación, es el glutatión (GSH). La importancia del GSH en el hígado radica en el papel central que este órgano desempeña como responsable de la oxidación y eliminación del alcohol ingerido y otros productos

tóxicos que inducen un estado de estrés oxidativo, por lo que el hígado requiere de un agente antioxidante que prevenga o reduzca este estrés, ya sea capturando, metabolizando o convirtiendo en agentes menos tóxicos a las EOR (García-Ruiz *et al.*, 1995; Lieber, 2003).

El GSH juega un papel crucial en la protección contra el estrés oxidativo, ya que actúa como atrapador de EOR *in vitro*, el GSH puede reaccionar con OH^\cdot , HOCl^\cdot , peroxinitrito, O_2^\cdot , ONOO^\cdot , y como reductor H_2O_2 constituyendo la primera línea de defensa celular contra las EOR, en tanto que la segunda línea de defensa la proporcionan las enzimas antioxidantes que utilizan glutatión como cofactor (Pompella *et al.*, 2003). Es el tiol no proteico más abundante en las células y se localiza en la mayoría de las plantas, microorganismos y en todos los tejidos de los animales superiores donde se encuentra en concentraciones de 1 a 11 mM (Meister, 1994; Lu, 1999).

En los animales superiores, frutas y vegetales contribuyen con cerca del 50% del GSH aportado por la dieta, mientras que el consumo de carne contribuye con menos del 25% (Kormarnisky *et al.*, 2003; Parcell, 2002). De aquí que las condiciones nutricionales y los valores de GSH se encuentran estrechamente relacionados, al grado de que las condiciones de ayuno ocasionan una disminución significativa de sus niveles (Lu, 1999). También, dependiendo de las condiciones nutricionales, pueden variar los niveles de aminoácidos, siendo la cisteína, el glutamato, y la glicina los más importantes para la síntesis de glutatión, dado que aún en condiciones nutricionales normales, la cisteína es el aminoácido que se presenta en menores concentraciones la disponibilidad de ésta es generalmente el factor determinante en la síntesis de GSH (Griffith, 1999).

Estructura de Glutación reducido
(GSH)



Estructura del Glutación oxidado o disulfuro
(GSSG)

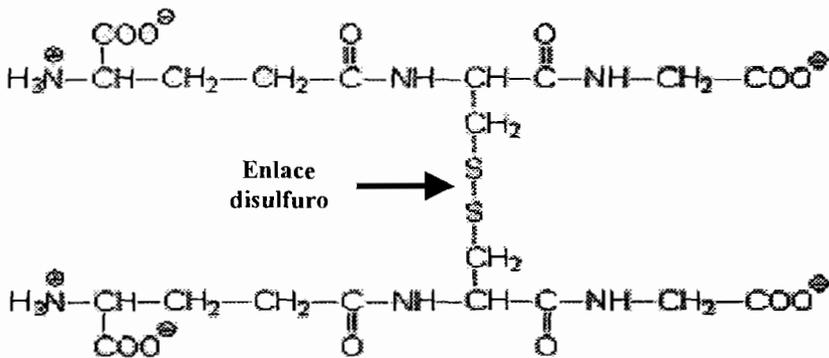


Figura 3.- Estructura del glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG)

SÍNTESIS DEL GLUTATIÓN

Este tripéptido constituido por los aminoácidos L-glutamato, L-cisteína y L-glicina, es sintetizado en el citosol celular por la acción consecutiva de las enzimas γ -glutamilcisteín sintetasa (GCS) y glutatión sintetasa (GSH sintetasa), ambos pasos enzimáticos requieren de ATP (Figura 4) y permiten la formación de γ -glutamil-cisteín-glicina o glutatión (Meister, 1994; Tirmenstein *et al.*, 2000; Musallam *et al.*, 2002). El enlace γ inusual entre el glutamato y la cisteína le confiere estabilidad celular y resistencia a la degradación por peptidasas intracelulares, por lo que solamente la enzima γ -glutamiltranspeptidasa, que se encuentra en la superficie externa de la membrana celular, puede hidrolizarlo (DeLeve y Kaplowitz, 1991; Anderson, 1998). Esta enzima juega un papel importante en el metabolismo del glutatión dado que al escindir el residuo γ -glutamilo del GSH (GSSG y de los conjugados de GSH), el glutamato libre es transferido a otro aminoácido externo formándose un aminoácido γ -glutamil y un dipéptido cisteín-glicina. El aminoácido γ -glutamil es transportado nuevamente al interior de la célula donde es escindido el aminoácido para formar la 5-oxoprolina (forma cíclica del glutamato), que es después convertida nuevamente a glutamato por la enzima 5-oxoprolinasa, el cual es empleado nuevamente en la síntesis de GSH (Figura 4) (Dickinson y Forman, 2002). El dipéptido cisteín-glicina por su parte es escindido por la cisteinil-glicina dipeptidasa. Ambos aminoácidos son nuevamente incorporados al citosol celular, donde la cisteína en su mayoría es incorporada a la síntesis de GSH, otra parte es incorporada a la síntesis de proteínas, dependiendo de las necesidades celulares y otra parte es degradada a sulfato y taurina (Lu, 1999). El grupo activo del glutatión es el tiol (-SH) del residuo de cisteína (Pastore *et al.*, 2003). Las células eucarióticas tienen tres principales reservorios de GSH, ya que el 90% de GSH celular se encuentra en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmático. La porción de GSH que se presenta en la mitocondria se mantiene constante mediante el transporte de GSH a partir del citosol, dado que cuenta con dos sistemas de transporte de GSH, uno de alta afinidad es estimulado por ATP y uno de baja afinidad estimulado por ATP y ADP (Martensson *et al.*, 1990). En el caso del retículo endoplasmático, el GSH participa en la formación de los puentes disulfuro de las proteínas (Hwang, *et al.*, 1992).

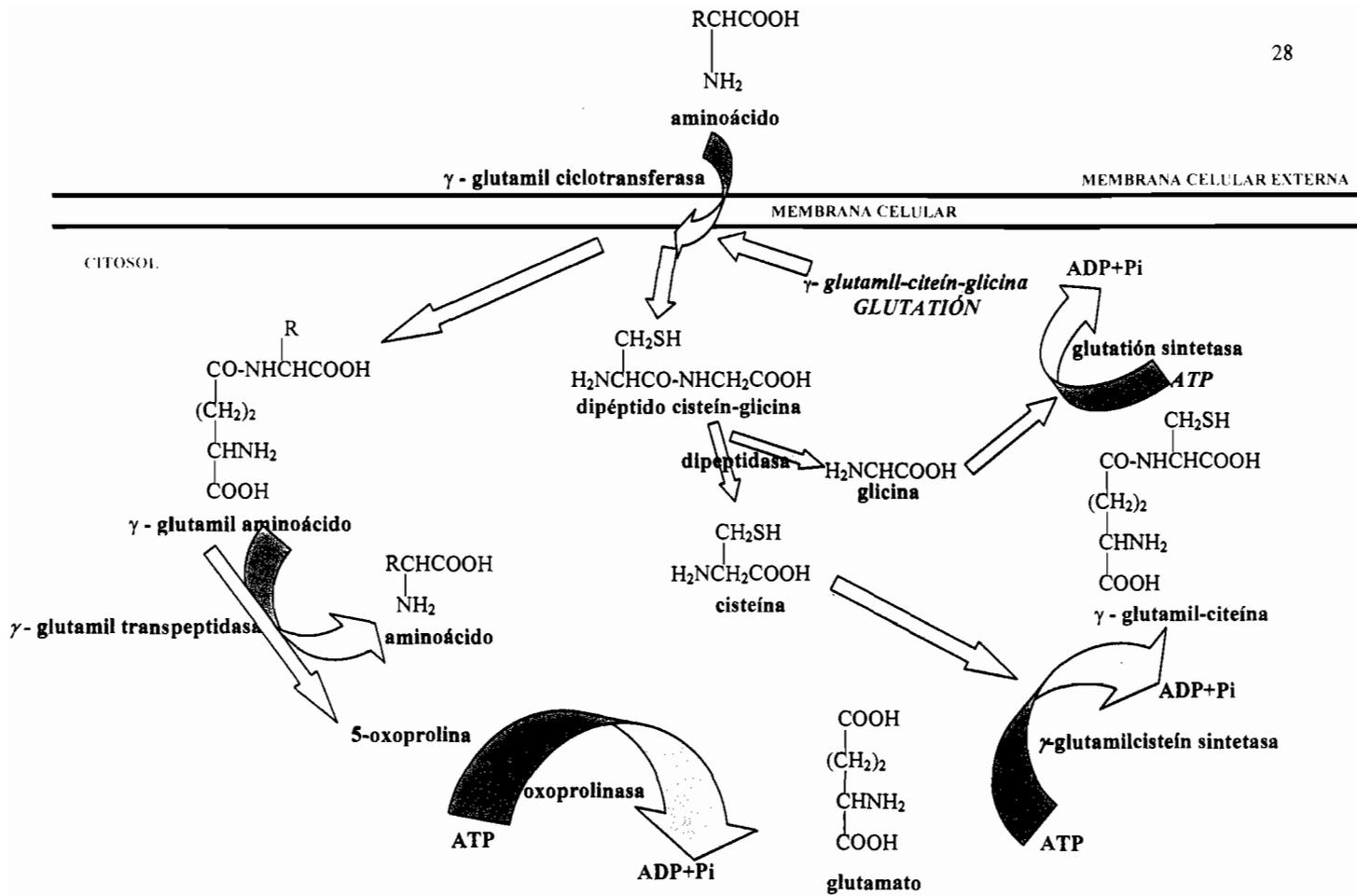


Figura 4.- Síntesis y metabolismo del glutatión (tomado de Pastore *et al.*, 2003)

OTRAS FUNCIONES DEL GLUTATIÓN

El glutatión desempeña un papel importante en la homeostasis celular, ya que además de actuar como antioxidante, se encuentra involucrado en la síntesis de proteínas (el incremento en los niveles de GSSG inhiben la síntesis de proteínas), hormonas, esteroides y prostaglandinas, en el metabolismo del ácido ascórbico, también actúa como cofactor de varias enzimas en diferentes vías metabólicas (por ejemplo glioxilasas y enzimas involucradas en la síntesis de leucotrienos); en general, previene la oxidación de los grupos -SH de las proteínas, juega un papel importante en su plegamiento y en la degradación de proteínas con puentes disulfuro, además de que existe evidencia creciente que sugiere que la glutationilación, es decir la unión reversible de glutatión a los grupos tiol de las proteínas está implicada en la protección contra la oxidación de residuos críticos de cisteína y en la regulación de la actividad enzimática y de transducción. El glutatión participa en el transporte intracelular del cobre, provee un reservorio de cisteína, interviene en reacciones de transhidrogenación que involucran la formación y mantenimiento de los grupos sulfidrilo de moléculas como la coenzima A; modula procesos celulares críticos tales como la síntesis de DNA, RNA, la formación de desoxirribonucleótidos, es una fuente de aminoácidos, protege a las membranas celulares del daño oxidativo y contribuye a mantener un estado redox determinado, lo cual es vital para el mantenimiento de las estructuras y funciones celulares (Halliwell y Gutteridge, 1999; Anderson, 1998; Buettner y Schafer, 2001; Pastore *et al.*, 2003)

El GSH está presente en todas las células de mamífero en un estado constante de recirculamiento metabólico, su vida media ha sido estimada y es de solo 4 días en eritrocitos humanos, de 2 a 4 horas en el citosol de células hepáticas de rata y de 30 horas en la poza mitocondrial (Kosower, 1978; Meister, 1995). Muchas condiciones diferentes influyen en el contenido de GSH intracelular; algunas de estas condiciones son la presencia de metales pesados, altas concentraciones de glucosa, el choque térmico, la exposición a EOR y especies de nitrógeno reactivas, incluyendo el H₂O₂ y el óxido nítrico (Woods y Ellis, 1995; Urata *et al.*, 1996; Kondo *et al.*, 1993; Herzenberg *et al.*, 1997).

En humanos, la disminución de GSH se ha relacionado con diferentes condiciones tales como la deficiencia de enzimas involucradas en la síntesis de glutatión. En este caso, los

individuos presentan deficiencia limitada o generalizada de GSH, acumulación de 5-oxoprolina lo cual puede tener consecuencias adversas debido a que produce acidosis metabólica (Meister y Larsson, 1995), anemia hemolítica, aminoaciduria y complicaciones neurológicas severas, por lo que pueden desarrollar hipersensibilidad a los antibióticos. Por otra parte, el bajo contenido de GSH en eritrocitos se manifiesta en la deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Pastore *et al.*, 2003). En individuos infectados con VIH las concentraciones de GSH son bajas en plasma, eritrocitos, células-T y otros linfocitos y monocitos (Anderson, 1997), en el caso de pacientes con cirrosis (resultado del abuso en el consumo de etanol, por ejemplo) las concentraciones de GSH en plasma y eritrocitos están por debajo de las de individuos sanos, aunque lo mismo se observa en individuos no alcohólicos con enfermedad hepática (Altomare *et al.*, 1998). Una disminución en los niveles de GSH puede ser causada por la hepatitis viral; sin embargo, la deficiencia de GSH igualmente está relacionada con enfermedades pulmonares, gastritis, úlcera duodenal, enfermedades cardíacas, enfermedades pancreáticas, diabetes y cáncer (Pastore *et al.*, 2003). También se cuenta con reportes que señalan que conforme se incrementa la edad de un individuo disminuyen las defensas antioxidantes lo que implica una pérdida clara y progresiva de GSH conforme el individuo se acerca a la vejez, independientemente del sexo y de que éstos sean individuos sanos (Lang *et al.*, 1992; Paolisso *et al.*, 1998)

Además, diversos agentes exógenos promotores de estrés pueden abatir los niveles de GSH, algunos de los más importantes dada la cantidad de EOR que generan son el humo del cigarro (Cross *et al.*, 1987), algunos productos farmacéuticos como el acetaminofén que ocasiona el abatimiento de los niveles de GSH en hígado, riñón, corazón y otros tejidos (Kidd, 1985), el ejercicio excesivo, las dietas deficientes en metionina, las infecciones bacteriales virales, el consumo excesivo de etanol y otras drogas, el estrés emocional, la exposición a rayos X o radiación ultravioleta producto de la luz del sol (Kidd, 1991; Lomaestro y Malone, 1995; Biaglow *et al.*, 1989).

Los órganos más expuestos al estrés ocasionado por todos estos agentes exógenos son el pulmón, el intestino, el riñón y particularmente el hígado (Cross *et al.*, 1987).

HÍGADO

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo humano, es de color marrón rojizo, pesa aproximadamente de 1,300 a 1500 g en los varones adultos (tiene el tamaño de una pelota de fútbol americano) y está situado bajo las costillas en la parte superior derecha del abdomen (Panski, 1985). Tiene la particular capacidad de regenerar su propio tejido, puede perder hasta las tres cuartas partes del mismo y volver a su estado original en unas pocas semanas; lo que permite que las personas que necesitan trasplantes puedan recibir una parte del hígado de un donante vivo (Parks *et al.*, 1998). En el humano se divide en cuatro lóbulos, los cuales a su vez están compuestos por otros múltiples lóbulos que contienen los hepatocitos, o células hepáticas metabólicamente activas, cuenta con un extenso suministro sanguíneo ya que recibe sangre rica en oxígeno a través de la arteria hepática, mientras que la vena portal le suministra sangre que transporta nutrientes, toxinas y otras sustancias absorbidas directamente desde los intestinos (Martínez *et al.*, 2001).

El hígado juega un papel importante en la digestión, ya que las células hepáticas producen la bilis, un líquido amarillo verdoso que facilita la digestión y absorción de nutrientes liposolubles; en el metabolismo de los carbohidratos y grasas, e incluso en el sistema inmunitario, procesa prácticamente todo lo que comemos o absorbemos a través de la piel. Alrededor del 90% de los macronutrientes del organismo procedentes de los intestinos pasan por el hígado, donde son metabolizados, lo que permite el aprovechamiento de la energía contenida en ellos; además almacena micronutrientes como por ejemplo las vitaminas A, D, B9 (folato) y B12; asimismo, almacena hierro y participa en la conversión del hierro en hemo, un componente de la hemoglobina; produce proteínas sanguíneas y actúa como filtro para eliminar patógenos y toxinas de la sangre (Martínez *et al.*, 2001; Lieber, 2003; Cuningham y Van Horn, 2003).

El hígado desempeña un papel crucial en la eliminación de sustancias nocivas para organismo, tales como alcohol, drogas y fármacos, disolventes, pesticidas y metales pesados; como resultado de estos procesos se forman diversos compuestos tóxicos, que pueden favorecer un estado de estrés celular (Lieber, 2003).

Probablemente, por tal razón el hígado es un órgano especialmente rico en las enzimas que participan tanto en la síntesis de glutatión, como en la formación de conjugados de glutatión, producto de la eliminación de xenobióticos. En este último aspecto, la enzima encargada de catalizar la reacción es la glutatión-S-transferasa y los conjugados formados son excretados en forma de ácido mercaptúrico; dentro de la bilis, dichos conjugados consumen irreversiblemente el glutatión intracelular, al mismo tiempo que se permite la eliminación de sustancias nocivas para organismo (Adams *et al.*, 1983; James *et al.*, 1983; Halliwell y Gutteridge, 1999). El glutatión se encuentra en diversos órganos como el cerebro, el riñón, el pulmón, el intestino, el bazo, el cristalino y el corazón, también está presente en leucocitos y eritrocitos pero donde se presenta en mayor cantidad es en el hígado (Figura 5), dado que los hepatocitos tienen la capacidad única de convertir la metionina en cisteína a través de la vía de trans-sulfatación. Por esta razón el hígado desempeña un papel central en la compleja homeostasis inter-orgánica del GSH, a tal grado que el 90% del GSH presente en el plasma es aportado por el hígado (Lu *et al.*, 1990; Pileblad y Magusson, 1992; García-Ruiz *et al.*, 1995; Ookhtens y Kaplowitz, 1998; Pastore *et al.*, 2003).

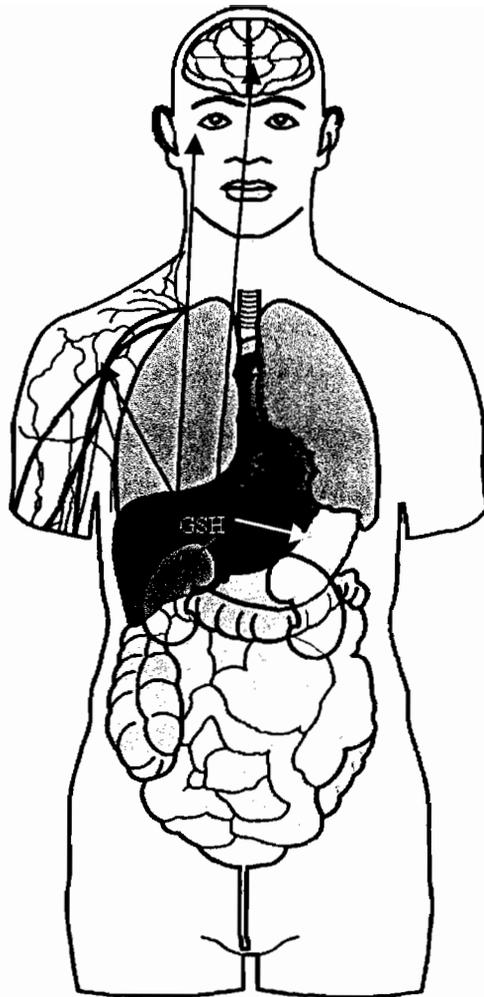


Figura 5. Flujo de glutatión hepático. Aunque la producción de glutatión no es exclusiva del hígado, es este órgano el mayor productor y exportador de glutatión, el cual es transportado en su forma reducida (GSH) a los diferentes órganos y tejidos que lo requieren, mediante el torrente sanguíneo (Wu *et al.*, 2004; Rana *et al.*, 2002). Los órganos y tejidos a los que el hígado subministra GSH son entre otros: el pulmón, el riñón, las células rojas sanguíneas, el cerebro, intestino, retina, páncreas, el bazo, el cristalino y el corazón (Rahman *et al.*, 1999; Dringen, 2000; Kannan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

Todas las células aeróbicas están sujetas a un estado oxidativo continuo que es controlable por la célula (Ferreira, 1984); dentro de la misma, la mitocondria representa la principal fuente generadora de EOR, dado que emplea el 85% del oxígeno consumido por la célula, de éste, se estima que alrededor del 1 al 2% del oxígeno consumido diariamente por la mitocondria es convertido en EOR (Shigenaga *et al.*, 1990; Cadenas y Davies, 2000). La generación de EOR ocurre dentro de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, la cual genera la energía necesaria para sintetizar ATP a partir de ADP (Fernández-Checa *et al.*, 1998). Las EOR, en particular el anión superóxido, se forma en segmentos específicos de la cadena mitocondrial, siendo presumiblemente el complejo I y en el complejo III los sitios propuestos para la producción de superóxido durante la respiración mitocondrial (Fernández-Checa *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 1999); los aniones superóxido generados son convertidos en H₂O₂ por acción de la enzima superóxido dismutasa (Fernández-Checa *et al.*, 1998; Kowaltowski y Vercesi, 1999). La ruptura de una molécula de H₂O₂ permite la generación de radicales hidroxilo, y otras especies reactivas las cuales a pesar de tener una vida media más corta, pueden dañar macromoléculas constituyentes de la célula; sin embargo en condiciones normales, esta generación de EOR se encuentra en equilibrio con las defensas antioxidantes de la célula (Halliwell y Gutteridge, 1999). Cuando la producción de EOR se sale del control celular se establece la situación conocida como estrés oxidativo, del que resulta el daño celular, ya que dichas especies reactivas pueden reaccionar y dañar macromoléculas proteínas y lípidos (Fernández-Checa *et al.*, 1997).

De los sistemas antioxidantes con los que cuenta la célula, el ciclo redox del glutatión es el sistema más importante encargado de la reducción del H₂O₂. En dicho ciclo, el GSH es utilizado como cofactor de una glutatión peroxidasa dependiente de selenio, dando como resultado la generación de GSSG más H₂O y O₂. El GSSG es nuevamente reducido por acción de la glutatión reductasa a expensas de la oxidación del NADPH utilizado como cofactor de dicha enzima, conformándose de esta manera el ciclo redox (García-Ruiz, 1995; Lu, 1999). El glutatión es el antioxidante intracelular más abundante y sirve para mantener un potencial redox tiol/disulfuro, dado lo cual es vital para el mantenimiento de diversas estructuras y funciones celulares (Sies, 1999).

Tanto el glutatión reducido (GSH) como el glutatión oxidado (GSSG) se encuentran involucrados en el mecanismo de protección de los efectos de productos del metabolismo (Videla *et al.*, 1980). El GSH actúa como atrapador de EOR constituyendo la primera línea de defensa celular contra las especies reactivas de oxígeno, en tanto que la segunda línea de defensa la proporcionan las enzimas antioxidantes que utilizan al glutatión como cofactor (Pompella *et al.*, 2003).

La intoxicación aguda con etanol y su metabolismo oxidativo genera una serie de intermediarios que producen un estado de estrés oxidativo y como consecuencia un mayor consumo de GSH en hígado (Videla *et al.*, 1980). Asimismo, al administrar acetaldehído (que es el principal metabolito del etanol) por vía orogástrica en ratas, se induce una reducción de los niveles de GSH hepático (Videla, 1986).

Algunos de los efectos adversos resultantes de la intoxicación aguda por etanol se han establecido mediante indicadores; como son, la acumulación de triacilglicéridos (TAG) y la elevación de EOR. La determinación de EOR se efectúa mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), un indicador usado para cuantificar las EOR, producidos en este caso por la presencia y oxidación del etanol (Bondy y Pearson, 1993).

En la literatura internacional se cuenta con un importante número de reportes que han demostrado que la intoxicación aguda con etanol (5-7 g/kg de peso) en animales ocasiona un incremento en la lipoperoxidación hepática y un abatimiento en los niveles de GSH tanto en mitocondrias como en células íntegras del hígado (García- Ruiz *et al.*, 1994, 1995; Zentella, 2002), mientras que en trabajos donde se utiliza una dosis única de etanol (4 g/kg de peso) y diferentes periodos de intoxicación (5 y 6 horas) se observa una disminución de los niveles de GSH hepático (Speisky *et al.*, 1985; Yang y Carlson., 1991). Scott *et al.*, (2000) al utilizar ratas macho Fisher e intoxicarlas con diferentes dosis de etanol (2, 4 y 6 g/kg de peso) y después de una hora de intoxicación reportan con las tres dosis empleadas una disminución en los niveles de GSH.

Finalmente es de interés resaltar el posible papel que las catecolaminas desempeña en el daño producido por el etanol, contra los sistemas antioxidantes de la célula, en particular contra el GSH, ya que el etanol en dosis agudas en animales íntegros tiene un efecto directo sobre el eje pituitario adrenal (Kharchenko, 2000) lo que ocasiona un incremento en la

liberación de hormonas (catecolaminas y glucocorticoides), alcanzando el doble de su concentración en sangre (Kovács *et al.*, 2002). Con respecto a este último punto, se cuenta con reportes como los de James *et al.*, (1983) quienes señalan que la aplicación de una sola inyección de epinefrina en animal íntegro disminuye significativamente los niveles hepatocelulares de GSH, por lo que esta catecolamina puede exacerbar la hepatotoxicidad de los compuestos que son detoxificados por el glutatión. Por otra parte Sies y Graf (1985), indican que el flujo del GSH a través de la membrana sinusoidal en hígado perfundido es estimulado con la adición de hormonas como la fenilefrina y la adrenalina, además de que esta liberación podría explicar la pérdida de GSH durante condiciones de choque y estrés; además Lu *et al.*, (1991) reportan que el glucagon y la fenilefrina disminuyen los niveles de GSH en hígado perfundido, mientras que Carvalho *et al.*, (1997) indican que los niveles de GSH en hepatocitos aislados disminuyen cuando son incubados en presencia de *d*-amfetamina junto con noradrenalina, adrenalina, o dopamina.

Con respecto al papel de las hormonas sobre el metabolismo del etanol, algunos trabajos de investigación han reportado que en hepatocitos aislados y en presencia de etanol más 10 μ M de epinefrina, durante los primeros 5 minutos se incrementa la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa lo que permite una rápida eliminación del etanol (Mezey *et al.*, 1990). Castrejón *et al.* (2002), demostraron que la adrenalina es capaz de incrementar el daño oxidativo causado por algunos agentes xenobióticos en el hígado, además de que esta catecolamina en presencia de etanol incrementa la producción de radicales hidroxilo en hepatocitos aislados.

De acuerdo con la información previa en la que se destacan los efectos que presentan de forma independiente el etanol y las catecolaminas sobre la poza hepática de glutatión, sería de interés estudiar el efecto simultáneo de ambos compuestos sobre dicho tior, debido a que hasta el momento no se cuenta con trabajos que exploren algunos aspectos al respecto como son:

Si la disminución de la poza de glutatión hepática es ocasionada en respuesta a la intoxicación con etanol o es un efecto mediado por el incremento en la liberación de hormonas y de las alteraciones que éstas ocasionan en el hígado.

_Establecer si efectivamente las catecolaminas estimulan el eflujo de glutatión hepático: si esto es así, sobre qué tipo de receptores se está actuando, dado que los reportes con los que se cuenta en este sentido emplean generalmente adrenalina, la cual actúa sobre receptores alfa y beta.

_Desarrollar un modelo que permita determinar el efecto por separado de los compuestos de interés (etanol y catecolaminas) así como de ambos sobre la poza de glutatión.

Con respecto al modelo experimental consideramos que los hepatocitos aislados (modelo *in vitro*) nos permiten mayores ventajas para el tipo de estudio que se realizó, aunque los estudios previos, sobre el papel de las catecolaminas en el eflujo de GSH se han realizado en hígados de rata perfundidos (Sies y Graf, 1985; Lu *et al.*, 1990, 1991).

Para presentar de manera mas clara las ventajas de utilizar hepatocitos aislados, sobre el uso del hígado perfundido se elaboró el siguiente cuadro.

MODELO EXPERIMENTAL	HEPATOCITOS AISLADOS	HÍGADO PREFUNDIDO
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Determinación de la viabilidad. -Igual disponibilidad de oxígeno y de nutrientes. -Estabilidad de pH y temperatura. -Con los hepatocitos aislados de un solo hígado se pueden realizar varios experimentos. -Se pueden emplear dos o más compuestos de manera simultánea. -Periodos de exposición a los compuestos de interés hasta de 1 hora. -Se puede determinar glutatión intra y extracelular. -Se puede determinar GSH_T, GHS y GSSG. -Permite precisar si las catecolaminas favorecen o no el finjo del GSH_T de los hepatocitos aislados, así como se ha reportado que ocurre en hígado perfundido. 	<ul style="list-style-type: none"> -No se daña el tejido ni la comunicación celular. -Se puede trabajar hasta 70 min. -Se puede determinar GSH_T, GHS y GSSG.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Se puede causar daños a la estructura celular. 	<ul style="list-style-type: none"> -Determinación de la viabilidad. -Desigual disponibilidad de oxígeno y nutrientes. -Falta de estabilidad en pH y temperatura -Por cada hígado perfundido solo se puede realizar un experimento. -No se puede determinar glutatión intra y extracelular, solo se determina la cantidad de glutatión presente. -Periodos cortos de exposición con los compuestos de interés. -La perfusión favorece la generación de EOR. -En el caso de estudios con hormonas el costo es muy elevado.

HIPÓTESIS

La intoxicación aguda con etanol incrementa los niveles circulantes de catecolaminas y disminuye los niveles de glutatión hepático. Dado que las catecolaminas promueven el flujo del glutatión contenido en el hepatocito, es posible que la disminución del glutatión no sea producida directamente por el etanol, sino mediada por la elevación y acción de las catecolaminas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ DEFINIR SI LA ACCIÓN DEL ETANOL AL DISMINUIR LA POZA DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH_T) ES UNA ACCIÓN DIRECTA O ESTA MEDIADA POR EL EFECTO DE LAS CATECOLAMINAS.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES INTRACELULARES Y EXTRACELULARES DE GSH_T EN HEPATOCITOS AISLADOS E INCUBADOS EN PRESENCIA DE UNA CONCENTRACIÓN ALTA DE ETANOL.
- ❖ DETERMINAR EL EFECTO DE LA EPINEFRINA, LA FENILEFRINA Y EL ISOPROTERENOL SOBRE LOS NIVELES INTRACELULARES Y EXTRACELULARES DE GSH_T EN HEPATOCITOS AISLADOS.
- ❖ ESTUDIAR EL EFECTO SIMULTÁNEO DE LA INCUBACIÓN DE HEPATOCITOS AISLADOS CON ETANOL Y AGENTES ADRENÉRGICOS SOBRE LOS NIVELES DE GSH_T .
- ❖ DEFINIR LA UBICACIÓN TANTO INTRACELULAR COMO EXTRACELULAR DEL GSH_T EN CADA UNA DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ANTERIORES.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 150 a 174 g de peso corporal. Los animales se mantuvieron alimentados en una primera serie de experimentos y posteriormente se les sometió un período de ayuno por 48 horas en una segunda serie de experimentos. En ambos casos los animales consumieron agua *ad libitum*. Terminado el período de ayuno, las ratas fueron anestesiadas con éter. Los hepatocitos se aislaron a partir de hígados, perfundidos *in situ* a través de la vena porta con una solución de Ringer-Krebs-bicarbonato, sin glucosa, pH 7.4, conteniendo 0.1% de colágenasa tipo IV. La suspensión celular se saturó con 95% de O₂ y 5% de CO₂. La viabilidad de los hepatocitos se determinó por exclusión del azul de Tripán, y por la liberación de la actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) determinada de acuerdo al método de Bergmeyer *et al.*, (1965).

Los hepatocitos se incubaron a 37°C, por una hora en solución de Ringer Krebs-Henseleit bicarbonato pH 7.4, conteniendo CaCl₂ 1.3 mM, y en presencia o no de una mezcla de los aminoácidos: glutamina (5 mM), glicina (4 mM), serina (1mM), y metionina (0.4 mM), en las concentraciones finales que se indican.

Los siguientes compuestos se usaron a las concentraciones que se indican: etanol 50mM, glucosa 10 mM, epinefrina 10 μM, fenilefrina 10 μM, isoproterenol 10 μM, en todos los casos las células se incubaron con agitación y posteriormente se determinó la viabilidad celular (Figura 6).

Después del período de incubación se centrifugó 1 minuto a 9,000 g a 4°C, se separaron 500 μl de sobrenadante y se les adicionaron 500 μl de una solución (fría) 4 M de HClO₄; al precipitado conteniendo células (pastilla) se les agregó 500 μl de una solución 2 M de

HClO₄ (frio). Tanto los sobrenadantes como las pastillas se centrifugaron a 9,000 g/5 minutos a 4°C.

Se tomaron 500 µl de sobrenadante de ambas muestras los cuales se mantuvieron en hielo, inmediatamente se realizó la determinación de glutatión total (GSH_T) de acuerdo al método de Akerboom y Sies (1981).

Finalmente y con el propósito de determinar el efecto de las condiciones experimentales empleadas sobre la viabilidad celular de los hepatocitos y la forma en que esto pudiera afectar los resultados, se realizaron dos procedimientos alternativos, uno para garantizar el menor daño celular y que implica una centrifugación suave a 90 g durante un minuto, y otro que implica la centrifugación de la suspensión celular a través de una capa de aceite de silicón lo que garantiza la clara separación del medio intracelular del extracelular (Estrela *et al.*, 1988).

Equipo y reactivos

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU 600 y cubetas de cuarzo de 1 ml, una centrifuga Eppendorf refrigerada modelo 5417R, matraces de plástico de fondo plano Nalgene. Todos los reactivos fueron de grado reactivo (Sigma y Roche).

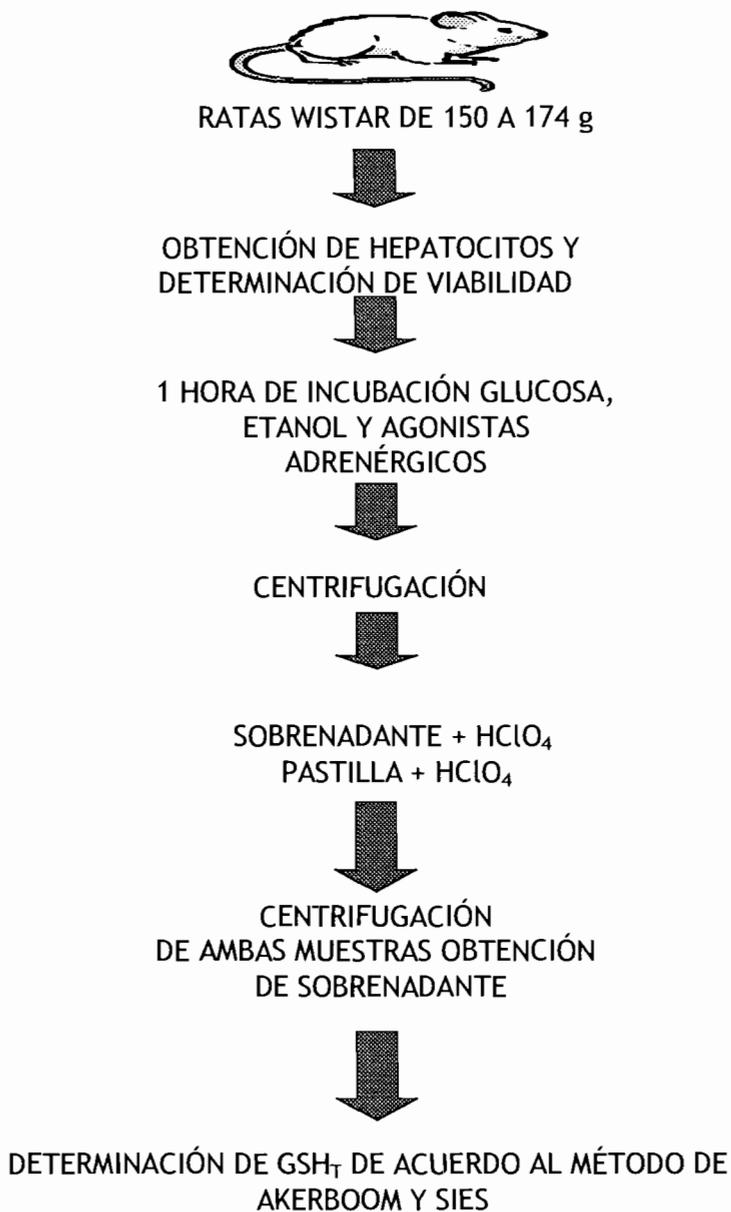


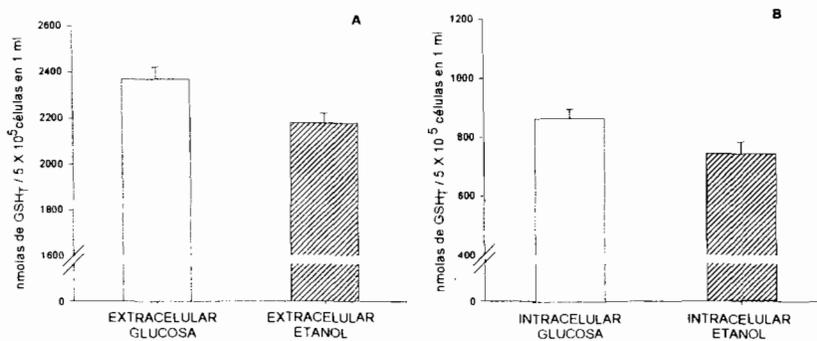
Figura 6.- Método empleado durante la fase experimental tanto con los animales alimentados como con los ayunados.

RESULTADOS

Efecto del etanol sobre los niveles de GSH_T

Los experimentos se realizaron con hepatocitos aislados de ratas alimentadas, los cuales se incubaron en presencia de etanol (50 mM), esto con el fin de conocer los efectos directos de dicho compuesto sobre los niveles de glutatión total (GSH_T). Esta parte del estudio es de particular interés dado que los datos obtenidos en la literatura internacional acerca de los efectos de la administración de etanol sobre los niveles de glutatión son controversiales, tal como se analiza en la discusión.

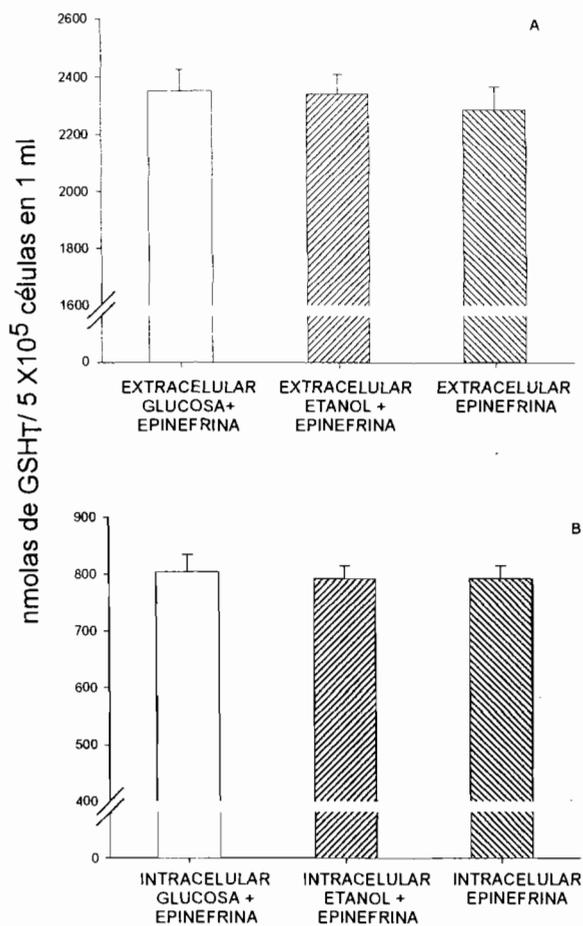
Además, como se señaló en los antecedentes, se desconoce si el etanol participa en la regulación del flujo de GSH_T de las células hepáticas, por lo que se evaluaron los efectos de la intoxicación aguda con etanol sobre los niveles de GSH_T, tanto intracelular como extracelular. Encontramos que en hepatocitos aislados de ratas alimentadas, e incubados en presencia de etanol a una concentración final 50 mM, se registra una disminución de los niveles de GSH_T tanto extra como intracelular (Gráfica 1 A y B).



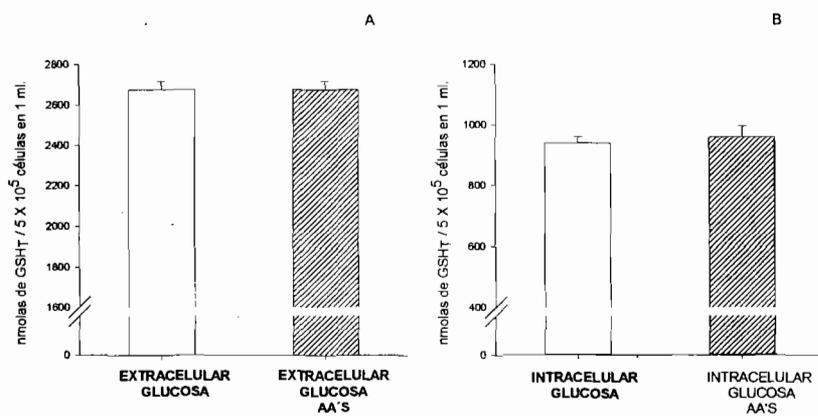
Gráfica 1 A y B.-Contenido de GSH_T en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados una hora con glucosa o etanol. Cada valor representa la media ± Error Estándar (EE) n = 5. Análisis estadístico: A = extracelular glucosa vs extracelular etanol P<0.02; B = intracelular glucosa vs intracelular etanol P< 0.04.

Una vez establecido que el etanol disminuye los niveles de GSH_T, se estudió el efecto de las catecolaminas sobre la poza de GSH_T, en presencia y en ausencia de etanol, dado que se cuenta con un reporte en la literatura que indica que en hígados perfundidos de ratas alimentadas, a los que se les adicionaron agonistas adrenérgicos como la fenilefrina y la epinefrina, se estimuló el eflujo de glutatión (Sies y Graf, 1985). Sin embargo, no se dispone de información sobre el posible efecto de la incubación simultánea con ambos compuestos (catecolaminas y etanol), lo que resulta de particular interés para el presente trabajo. Por ello, se realizaron experimentos con hepatocitos aislados de ratas alimentadas, los cuales se incubaron 1 hora en presencia de etanol más epinefrina. Los resultados obtenidos, indican que en presencia de los efectores antes mencionados, la epinefrina no estimulan el eflujo de GSH_T, y además, aparentemente contrarresta el efecto del etanol sobre la poza de GSH_T (Gráfica 2 A y B) ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones experimentales referidas.

En vista de los resultados obtenidos, se consideró la posibilidad de emplear un sustrato que favoreciera la síntesis de glutatión, con el fin de establecer el posible efecto de las catecolaminas y el etanol sobre la poza hepática de glutatión. Para discernir lo antes mencionado, los hepatocitos aislados de ratas alimentadas, se incubaron 1 hora en presencia de una mezcla de aminoácidos (glutamina, glicina, serina, metionina) que se sabe estimulan la síntesis de GSH_T (Estrela *et al.*, 1988). Terminado el período de incubación con la mezcla de aminoácidos, se determinaron los niveles de GSH_T extracelular e intracelular (Gráfica 3 A y B), encontrando que en animales alimentados, la mezcla de aminoácidos no estimuló la síntesis de GSH_T.



Gráfica 2 A y B.- Efecto de la epinefrina sobre el contenido de GSH_T en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 hora en presencia de glucosa o etanol. Cada valor representa la media \pm EE (n = 5). No se presentan diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones experimentales anotadas.

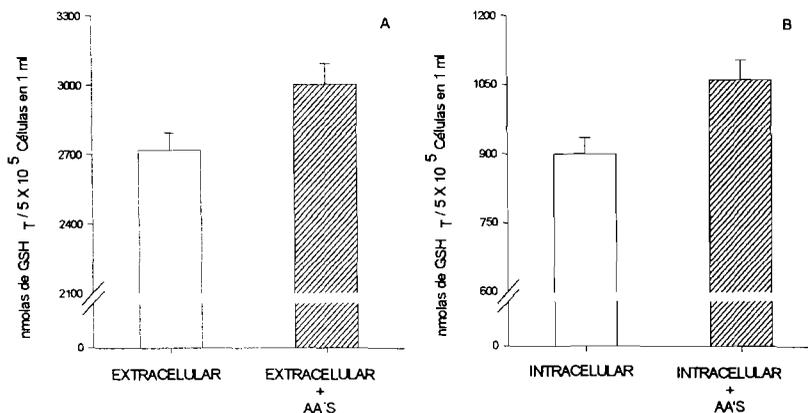


Gráfica.- 3 A y B. Contenido de GSH_T en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 hora con glucosa y aminoácidos (AA'S). Cada valor representa la media ± EE (n = 3). No se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones experimentales anotadas.

Efecto de la mezcla de aminoácidos en la síntesis de GSH_T

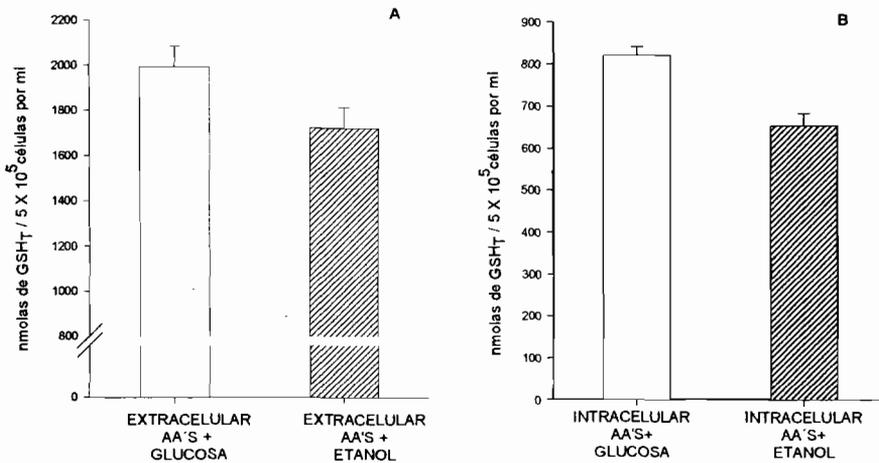
Como se muestra en la Gráfica 4 A y B, la incubación de los hepatocitos en presencia de la mezcla señalada de aminoácidos, promueve la síntesis de GSH_T solo cuando dichos hepatocitos fueron aislados de ratas con 48 horas de ayuno, estos resultados concuerdan con los observados en trabajos anteriores donde se incubaron células aisladas solo en presencia de metionina (concentración final 1mM), o bien en presencia de una mezcla de aminoácidos a diferentes concentraciones finales (Estrela *et al.*, 1988; Lu *et al.*, 1990). Sin embargo, en dichos trabajos solo se menciona que la adición de algunos aminoácidos como la metionina, la cisteína y la utilización de mezclas de diferentes aminoácidos estimula la síntesis de GSH_T pero no se refieren a que esta estimulación únicamente se observa bajo condiciones de ayuno.

En el presente trabajo el incremento en los niveles de GSH_T se aprecia tanto en las muestras de medio intracelular como extracelular (Gráfica 4 A y B).



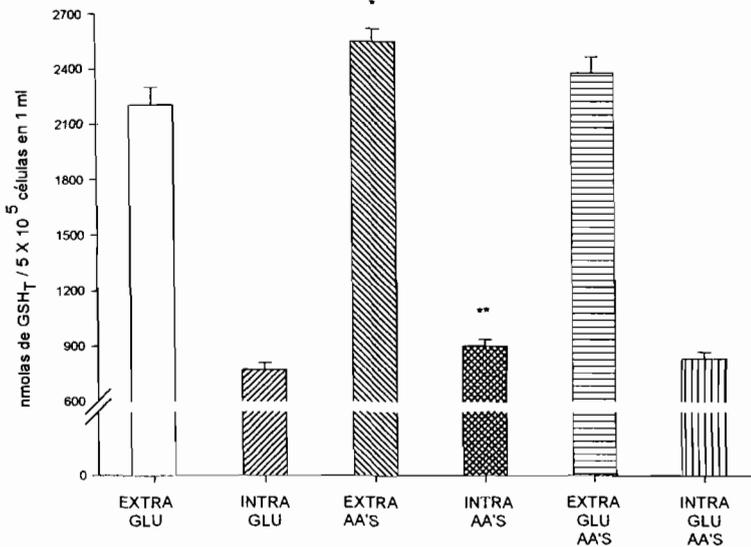
Gráfica 4.- Contenido de GSH_T en hepatocitos aislados (48 horas de ayuno) incubados 1 hora con y sin aminoácidos (AA'S). Cada valor representa la media ± EE (n =3). Análisis estadístico : A = extracelular vs extracelular + AA'S P<0.001; B = intracelular vs intracelular + AA'S P<0.04.

Ya que se estableció que la mezcla de aminoácidos estimula la síntesis de GSH_T en hepatocitos aislados de ratas con 48 horas de ayuno, se realizaron experimentos en los cuales se incubaron hepatocitos en presencia de etanol (50 mM) y la mezcla de AA'S, con el fin de conocer los efectos de dicho compuesto sobre los niveles de glutatión total (GSH_T), en condiciones en las que esté promovida su síntesis. Los resultados se presentan en la gráfica 5 A y B, donde se observa que la intoxicación aguda con etanol ocasiona la disminución de los niveles de GSH_T tanto extra como intracelularmente, a pesar de la presencia de los AA'S, lo cual sugiere una disminución de la síntesis de dicho tior, y confirma que el etanol disminuye los niveles de GSH_T.



Gráfica 5 A y B.-Contenido de GSH_T en hepatocitos aislados (48 horas de ayuno) incubados 1 hora con AA'S y glucosa o etanol. Cada valor representa la media ± EE (n = 3). Análisis estadístico : A = extracelular + AA'S + glucosa vs extracelular + AA'S + etanol P < 0.001; B = intracelular + AA'S + glucosa vs intracelular + AA'S + etanol P < 0.009.

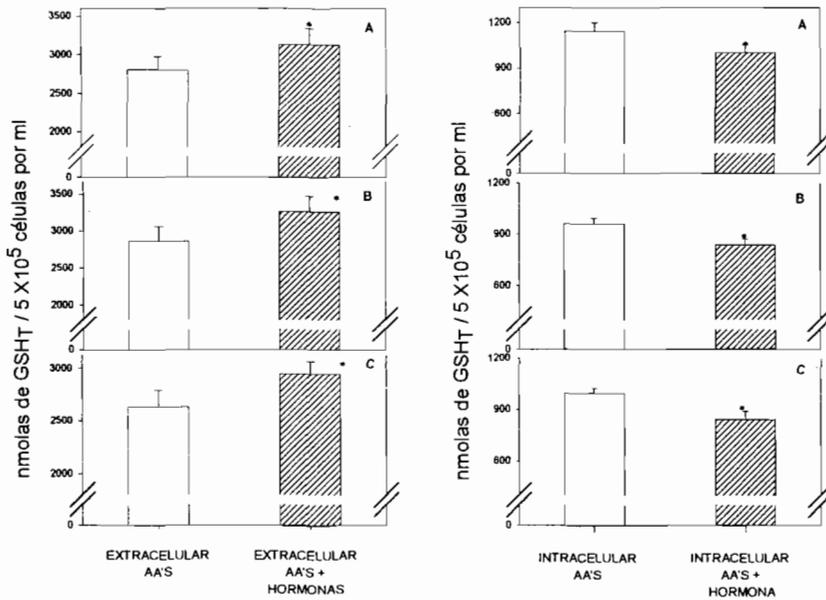
Además de determinar el efecto del etanol sobre la poza de GSH_T en condiciones en las que se estimula su síntesis, y dado que en todos los experimentos realizados en el presente trabajo se empleó la glucosa como control para comparar los efectos del etanol, fue necesario considerar la posibilidad de que la glucosa pudiera afectar la acción de la mezcla de AA'S, por lo que se realizaron experimentos con hepatocitos aislados de ratas con 48 horas de ayuno, los cuales fueron incubados solo con glucosa, solo con AA's y en presencia de glucosa + AA'S (Gráfica 6). En presencia la mezcla de AA'S se observan diferencias estadísticamente significativas (P<0.02) con respecto a los hepatocitos incubados con glucosa, en los que los niveles de GSH_T son menores. Mientras que no se encontró diferencia estadísticamente significativas entre los niveles de GSH_T presentes cuando los hepatocitos se incubaron solo con AA'S o con AA'S + glucosa.



Gráfica 6.- Contenido de GSH_T extracelular (EXTRA) e intracelular (INTRA) en hepatocitos aislados e incubados 1 hora con aminoácidos (AA'S) y en presencia o ausencia de glucosa (GLU). Cada valor representa la media ± EE (n = 4). Análisis estadístico : extracelular glucosa vs extracelular AA'S *P<0.02; intracelular glucosa vs intracelular AA'S **P< 0.04.

Efecto de los agonistas adrenérgicos sobre la poza de GSH_T

Para determinar el posible efecto de los agonistas adrenérgicos sobre la poza de GSH_T, se utilizaron hepatocitos recién aislados de ratas con 48 horas de ayuno, los cuales se incubaron una hora en presencia de la mezcla de AA'S más epinefrina, o sus agonistas fenilefrina e isoproterenol (cada uno por separado) a una concentración final 10 μM. Después del periodo de incubación, se determinó el GSH_T tanto intracelular como extracelular. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 7.



Gráfica 7.- Contenido de GSH_T extracelular e intracelular en hepatocitos aislados (48 horas de ayuno) incubados 1 hora con aminoácidos (AA'S) y hormona o su agonista: (A) epinefrina, (B) fenilefrina, (C) isoproterenol. Cada valor representa la media ± EE (n = 3). Análisis estadístico : extracelular AA'S vs extracelular AA'S + hormona A= P< 0.01, B = P< 0.001, C = P< 0.01; intracelular AA'S vs intracelular AA'S + hormona A = P< 0.02, B = P< 0.001, C = P< 0.001.

Como se observa en la gráfica 7 (panel izquierdo), tanto la epinefrina (A), como la fenilefrina (B) y el isoproterenol (C), en una concentración 10 μM , son capaces de estimular el eflujo de GSH_T después de una hora de incubación; en los tres casos mencionados se registra un incremento significativo ($P < 0.05$) en el eflujo de GSH_T al medio extracelular. Los resultados que se muestran en la misma gráfica, pero en el panel derecho refuerzan lo mencionado, ya que en hepatocitos aislados e incubados una hora en presencias de la mezcla de aminoácidos (AA'S) más epinefrina, o sus agonistas fenilefrina e isoproterenol, el contenido de GSH_T intracelular resulta significativamente menor ($P < 0.05$) en comparación con el contenido de GSH_T de los hepatocitos incubados solo con la mezcla de AA'S.

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, una parte del presente proyecto fue determinar el efecto de las condiciones experimentales sobre la viabilidad celular y la forma en que tales condiciones pudiera afectar los resultados obtenidos. Lo anterior es de especial relevancia al considerar que un aporte significativo en esta tesis es el poder definir, por primera vez, la capacidad del hepatocito aislado para responder a los agonistas adrenérgicos y al etanol y modificar el flujo del glutatión intracelular. En todos los experimentos descritos hasta el momento, el procedimiento para separar el medio extracelular del intracelular consistió en una centrifugación a 9,000 g por 1 minuto; seguida de una separación inmediata de las dos fases obtenidas. Se realizaron dos procedimientos alternativos, con el objeto de comprobar que las condiciones experimentales anotadas no influyeran en la distribución intra y extracelular del glutatión, y con ello se invalidaran los resultados mostrados. El primero de los procedimientos alternativos implica la centrifugación de la suspensión celular a través de una capa de aceite de silicón, lo que garantiza la clara separación del medio intracelular del extracelular, y el segundo que consiste en una centrifugación suave, a 90 g durante un minuto, que es el comúnmente empleado para el manejo de células en cultivo. Con estos procedimientos podremos confirmar, que el que se presente una mayor cantidad de GSH_T en el medio extracelular no es consecuencia de las condiciones experimentales empleadas, sino de la distribución desigual del GSH_T en los medios intra y extracelular, en función de las condiciones fisiológicas del hepatocito. Además, con fines comparativos, la viabilidad celular, se determinó tanto por exclusión del azul de Tripan, como por actividad de la enzima deshidrogenasa láctica recuperada en el medio extracelular.

Determinación de la viabilidad celular

Una vez aislados los hepatocitos y bajo diferentes condiciones experimentales se realizó la determinación de la viabilidad celular tanto por exclusión del azul de Tripan, como por porcentaje de actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL) en el medio extracelular (Tabla 1). La determinación de la actividad de esta enzima resultó un complemento útil para indicar el daño celular. La viabilidad celular observada al tiempo cero (95%) se encuentra en un porcentaje similar al reportado en trabajos previos donde se emplea un método semejante de aislamiento celular (por ejemplo Lu *et al.*, 1990). Por otra parte y dado que el punto de interés es el establecer cual es el contenido de GSH_T en hepatocitos aislados, es necesario determinar de qué manera las diferentes condiciones experimentales afectan la viabilidad celular y por tanto los niveles de GSH_T. Como se observa en la Tabla 1, el porcentaje de viabilidad celular disminuye notablemente después de someter a la suspensión celular a una velocidad de centrifugación de 9,000 g, en comparación con una centrifugación suave a 90 g, así mismo cuando la suspensión celular es sometida a una velocidad de centrifugación de 9,000 g se observa un mayor porcentaje de actividad de la DHL fuera de las células, lo que indica un mayor daño celular.

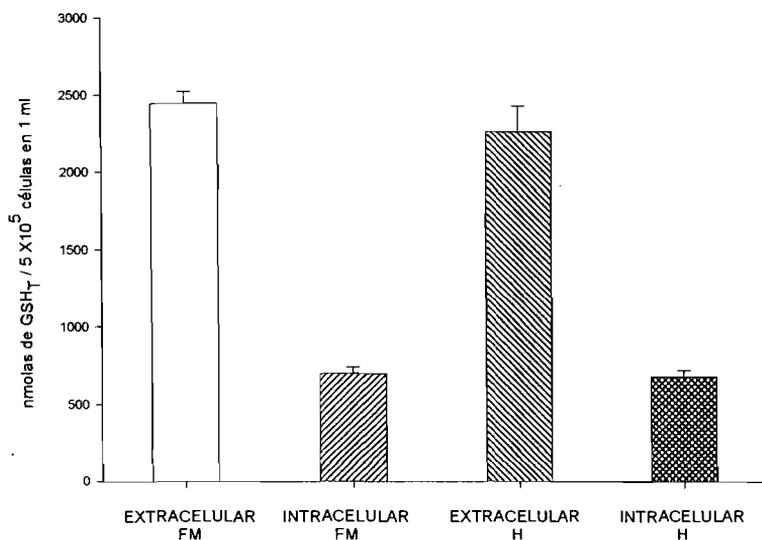
TABLA 1.-Determinación de viabilidad celular.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	% DE VIABILIDAD CON AZUL DE TRIPAN	% DE ACTIVIDAD DE LA DHL RECUPERADA DEL MEDIO EXTRACELULAR
Hepatocitos recién aislados (tiempo cero)	95	5
Hepatocitos aislados e incubados 1 h, a 37°C, en presencia de: Ringer, aminoácidos, glucosa, etanol, catecolaminas	85 al 90	10
Hepatocitos aislados e incubados 1 h, a 37°C, en presencia de: Ringer, aminoácidos, glucosa, etanol, catecolaminas. + centrifugación a 9.000 g /1 min a 4°C.	40 al 50	65
Hepatocitos aislados e incubados 1h, a 37°C, en presencia de: Ringer, aminoácidos, glucosa, etanol, catecolaminas. + centrifugación a 90 g /1 min a 4°C.	80	12

Para cuantificar la actividad extracelular de la DHL se consideró como el 100 % de actividad la registrada en células sometidas a las condiciones experimentales mencionadas en presencia de Triton X-100 y una centrifugación posterior a 9.000 g por 5 minutos.

Filtración con aceite de silicón

Se realizaron una serie de experimentos en los cuales se centrifugó la suspensión celular a través de una capa de aceite de silicón. De acuerdo con Estrela *et al.*, (1988) y con nuestros datos experimentales, el procedimiento garantiza, mediante el tránsito por la capa de aceite de silicón, una separación del medio extracelular de las células, sin que éstas se dañen. Cuando las células llegan a la capa inferior conteniendo ácido perclórico se promueve el rompimiento celular total y la liberación del glutatión intracelular. De esta forma se garantiza una separación limpia del medio intracelular del extracelular. En dichos experimentos se utilizaron tanto ratas del bioterio de la Facultad de Medicina, como ratas Harlan (proveedora de animales para laboratorio), con el fin de establecer si los valores de GSH_T varían entre dichas ratas, lo cual resultó, de nuestro interés ya que con ambos grupos de ratas se ha trabajado en diferentes momentos en nuestro laboratorio. Bajo tales condiciones experimentales, los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 8.



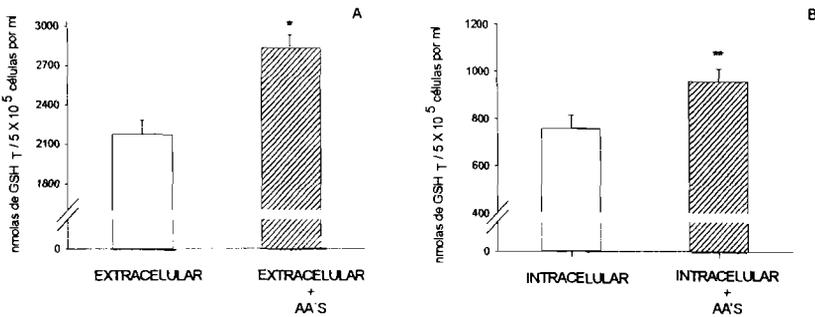
Gráfica 8.- Contenido de GSH_T en el medio extracelular e intracelular en hepatocitos aislados y centrifugados con aceite de silicón a 10.000 g /30 seg. Se muestran los valores de GSH_T de hepatocitos aislados de ratas de la Facultad de Medicina (FM), y de hepatocitos aislados de ratas Harlan (H). Cada valor representa la media \pm EE (n = 3). No se observan diferencias estadísticamente significativas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores tanto extra como intracelulares, de las ratas del bioterio de la Facultad de Medicina con respecto a las ratas Harlan, ambas pertenecientes a la cepa Wistar.

Una vez obtenidos los resultados tanto de las dos pruebas de viabilidad (Tabla 1), como los de la filtración con aceite de silicón, únicamente faltaba por establecer de qué manera las condiciones experimentales afectan la viabilidad celular y por tanto los niveles de GSH_T al emplear una centrifugación suave, como lo es la centrifugación a 90 g, para garantizar una mayor viabilidad celular y poder discernir, si el que se presente una mayor cantidad de GSH_T en el medio extracelular, no se trata de una consecuencia del daño celular provocado por el manejo de las muestras

Condiciones de ayuno por 48 horas, incubación con la mezcla de AA'S por 1 hora y centrifugación suave (90 g /1 minuto)

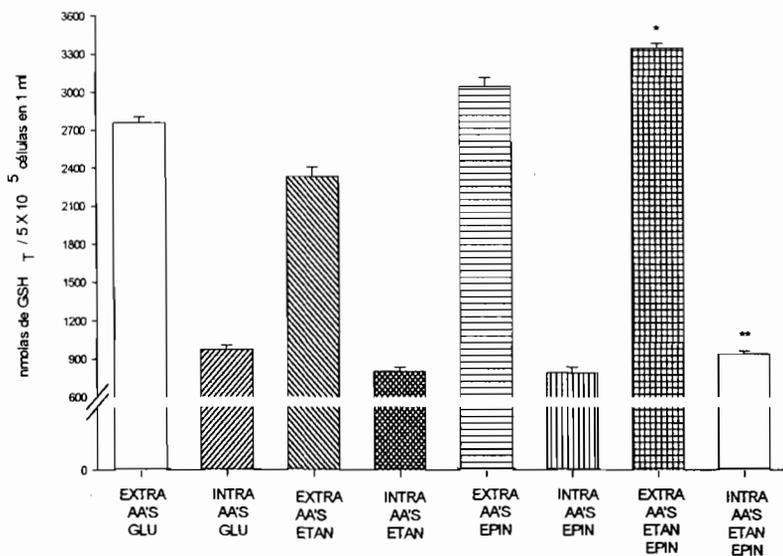
Considerando los resultados de las dos pruebas de viabilidad (Tabla 1) los cuales confirman que la centrifugación a 90 g durante 1 minuto garantiza una mayor viabilidad celular, y en consecuencia, un menor daño a las células, en comparación con la centrifugación a 9,000 por minuto, se realizaron experimentos en los que los hepatocitos fueron incubados en presencia de la mezcla de aminoácidos durante 1 hora y terminado el periodo de incubación, se procedió a la separación del medio de incubación de las células mediante una centrifugación suave a 90 g. Bajo estas condiciones experimentales se obtuvieron los resultados que se muestran en la gráfica 9 A y B.



Gráfica 9.- Contenido de GSH_T en hepatocitos aislados (48 horas de ayuno) incubados 1 hora con y sin aminoácidos (AA'S). Cada valor representa la media ± EE (n = 3). Análisis estadístico : A = extracelular vs extracelular AA'S *P< 0.01; B = intracelular vs intracelular AA'S **P< 0.004.

Como se muestra en la gráfica 9 A y B, la incubación de los hepatocitos en presencia de la mezcla de aminoácidos promueve la síntesis de GSH_T, el incremento en los niveles de GSH_T se aprecia tanto en las muestras de medio intracelular como extracelular, encontrándose que dicho incremento es estadísticamente significativo si comparamos los niveles de GSH_T de los hepatocitos incubados con la mezcla de AA'S con respecto a los hepatocitos incubados en ausencia de AA'S. Dado que una centrifugación a 90 g, garantiza que el daño celular es menor (viabilidad del 80% y actividad extracelular de la DHL del 12%), el que la mayor cantidad de GSH_T prevalezca una vez mas en el medio extracelular no parece ser una consecuencia del daño celular.

Una vez obtenidos los datos anteriores, se realizaron experimentos en presencia de etanol y hormonas bajo las mismas condiciones experimentales (ayuno de 48 horas, centrifugación suave, incubación con AA'S). Es necesario aclarar que para los experimentos con hormonas únicamente se utilizaron epinefrina y su agonista fenilefrina. Para el caso de la epinefrina los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 10 mientras que los resultados obtenidos con fenilefrina se presentan en la gráfica 11.



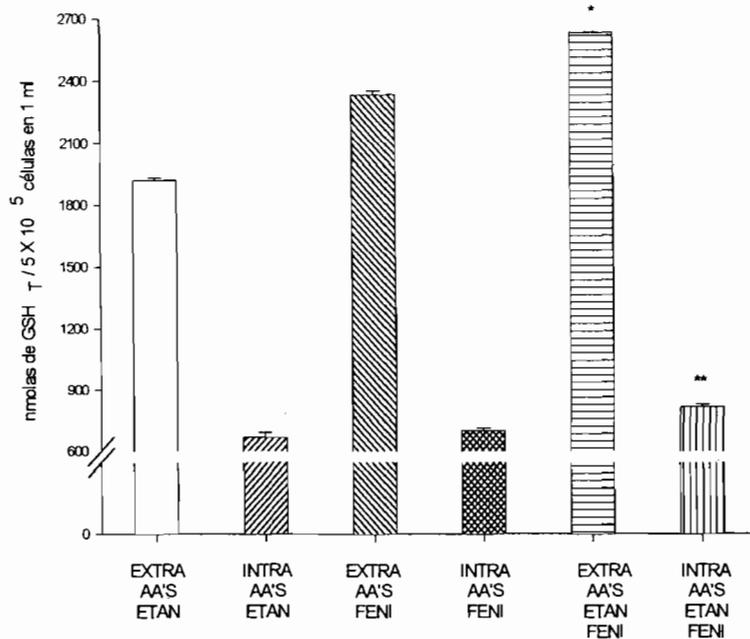
Gráfica 10 .- Contenido de GSH_T extracelular (EXTRA) e intracelular (INTRA) en hepatocitos aislados e incubados 1 hora con aminoácidos (AA'S), glucosa (GLU), etanol (ETAN) y epinefrina (EPIN). Cada valor representa la media ± EE (n=3). Análisis estadístico : EXTRA + AA'S + ETAN vs EXTRA + AA'S + ETAN + EPIN *P< 0.003; INTRA + AA'S + ETAN vs INTRA + AA'S + ETAN + EPIN **P< 0.03.

De acuerdo a los resultados que se presentan en las gráfica 10, se observa que la intoxicación aguda con etanol ocasiona una disminución de los niveles de GSH_T tanto extra como intracelular, a pesar de la presencia de los AA'S, y que estas diferencias son estadísticamente significativas ($P < 0.02$), lo cual sugiere una disminución de la síntesis de dicho tiol y confirma que el etanol, por sí solo, disminuye los niveles de GSH_T. Por otra parte, en presencia de epinefrina a una concentración de 10 μ M, se estimula el eflujo de GSH_T, dicho incremento en el eflujo es estadísticamente significativo ($P < 0.02$) en comparación con el observado cuando las células se incuban solo en presencia de AA'S. Con respecto a los valores de GSH_T intracelular, los resultados que se muestran en la misma gráfica refuerzan lo mencionado, ya que en hepatocitos aislados e incubados una hora en presencias de la mezcla de AA'S más epinefrina, disminuyen los valores de GSH_T intracelular ($P < 0.05$) en comparación con los valores GSH_T de los hepatocitos incubados solo con la mezcla de AA'S.

Sin embargo, al incubar los hepatocitos en presencia de AA'S y de forma simultánea con etanol y epinefrina, si bien se observa un incremento en el eflujo de GSH_T como cuando se incubaba solo con la hormona, no se presenta una disminución de los niveles de GSH_T intracelular, por el contrario, se registra un ligero incremento, muy cercano a los valores registrados solo con AA'S. Además, parece que la hormona revierte los efectos del etanol sobre la poza de GSH_T. Un dato que es de interés resaltar es el que la epinefrina estimula el eflujo de GSH_T al medio extracelular y aparentemente también estimula su síntesis, esto último solo en presencia de etanol.

En la gráfica 11 se presentan los resultados obtenidos al utilizar fenilefrina, el agonista más empleado de la epinefrina, estos son similares a los observados con la hormona. La intoxicación aguda con etanol ocasiona la disminución de los niveles de GSH_T tanto extra como intracelular, a pesar de la presencia de los AA'S, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.02$). En presencia de fenilefrina a una concentración final de $10 \mu M$, se estimula el eflujo de GSH_T , dicho incremento en el eflujo es estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en comparación con el observado cuando las células se incuban solo en presencia de AA'S, mientras que los valores de GSH_T intracelular disminuyen en comparación con los valores GSH_T de los hepatocitos incubados solo con la mezcla de AA'S ($P < 0.05$).

Al incubar los hepatocitos en presencia de AA'S y con etanol y fenilefrina, si bien se observa un incremento en el eflujo de GSH_T como cuando se incubaba solo con la hormona, no se presenta una disminución de los niveles de GSH_T intracelular promovida por el etanol, por el contrario, se registra un ligero incremento, muy cercano a los valores registrados solo con AA'S. Además, el agonista, al igual que la hormona, revierte los efectos del etanol sobre la poza de GSH_T . Así mismo la fenilefrina estimula el eflujo de GSH_T y en presencia de etanol aparentemente estimula su síntesis.



Gráfica 11 .- Contenido de GSH_T extracelular (EXTRA) e intracelular (INTRA) en hepatocitos aislados e incubados 1 hora con aminoácidos (AA'S), glucosa (GLU), etanol (ETAN) y fenilefrina (FENI). Cada valor representa la media \pm EE (n =3). Análisis estadístico : EXTRA + AA'S + ETAN vs EXTRA + AA'S + ETAN + FENI *P<0.002; INTRA + AA'S + ETAN vs INTRA + AA'S + ETAN + FENI ** P<0.006.

DISCUSIÓN

Si bien existen numerosos trabajos acerca de los efectos del etanol sobre la poza de glutatión hepático, los resultados reportados son controversiales y demandan de un cuidadoso y detallado análisis de los métodos empleados, con la intención de entender hasta donde sea posible, los hechos por los que los resultados reportados resultan controversiales. Entre los aspectos a considerar destaca: el tipo de modelo de estudio (tratamiento de animales *in vivo*, diseños *in vitro*), el tipo de organismo a estudiar, las condiciones del modelo de estudio (alimentación o ayuno), el modelo de intoxicación (intoxicación aguda, intoxicación crónica) el modo de administración (intra gástrica, intravenosa, intraperitoneal), las dosis empleadas (altas 100 mM-50mM, bajas 30-20 mM; en g/kg de peso; en %), el uso de controles adecuados para evaluar el modelo de estudio (glucosa, solución salina, Sham) y las técnicas empleadas para evaluar el daño. Lo mismo ocurre con la determinación de glutatión, entre las distintas técnicas descritas para su obtención, conservación y procesamiento de la muestra (la cual puede ser de tejido, de sangre, de plasma, de células en cultivo o recién aisladas, de organelos celulares) que se emplean para la determinación de dicho tiol, muy pocas incluyen criterios rígidos para su validación. Así habrán de considerarse: el uso de diferentes ácidos (perclórico, tricloroacético, sulfosalicílico, metafosfórico, pícrico, entre otros), así como el empleo de DTNB o KCl, con el fin de garantizar la menor oxidación del glutatión durante la manipulación de la muestra. Además, con respecto a los métodos empleados para su adecuada determinación y cuantificación, existen desde los ensayos espectro-fotométricos, ensayos fluorométricos, ensayos de bioluminiscencia, uso del HPLC, electroforesis en capilares, diferentes técnicas cromatográficas, entre otras. Cada uno de los detalles técnicos mencionados han sido cuidadosamente considerados y algunos han sido ensayados experimentalmente a lo largo del proceso para establecer las mejores técnicas, con el objeto de asegurar la óptima extracción del glutatión celular, la máxima recuperación, la reproducción sistemática de los resultados obtenidos y, en términos generales, la optimización en todas y cada una de las etapas del proceso. En consecuencia, para el presente trabajo decidimos observar meticulosamente los siguientes aspectos:

Precipitar las proteínas de las células lo mas rápido posible, ya que si las células no son desproteinizadas de inmediato la poza de glutatión empieza a bajar.

_ Emplear ácido perclórico para la más completa extracción del glutatión. El uso de otros ácidos y/o DTNB o KCl no permiten la completa extracción del tripeptido, ni previenen su oxidación o la acción parcial de las enzimas para las cuales es sustrato.

_ Mantener el glutatión en su forma reducida una vez extraído, para lo cual se utiliza un medio ácido y en frío (4°C).

_ pH óptimo para la enzima, entre otras.

Sin embargo, vale la pena hacer notar un aspecto del procedimiento experimental que no queda totalmente definido en el presente trabajo, el cual se refiere a las cifras basales de glutatión hepático en función de las estaciones del año, aparentemente asociado al medio ambiente de los animales de laboratorio que se exponen a variables tales como la temperatura, la precipitación pluvial y el ruido, entre otros. En términos generales, el someter a las ratas a una situación de estrés moderado como la disminución de la temperatura ambiental, el ruido, o el ayuno, ocasiona una disminución en las cifras basales de GSH_T hepático, lo que para fines prácticos nos orilló a planear y realizar los experimentos en forma estrictamente pareada, de manera que en cada lote de ratas incluyéramos los animales controles y que efectuáramos experimentos con un número pequeño de animales, ya que los valores control en una estación del año, no serían cuantitativamente iguales a los valores de los controles en otra estación del año, si bien siempre comprobamos que las diferencias en las cifras de GSH_T, al someter a las células a diferentes tratamientos fueran reproducibles. De las variables ambientales mencionadas, la única que modificamos a voluntad fue el estado de alimentación o ayuno de las ratas.

En el presente trabajo los resultados permitieron corroborar que el etanol en una dosis alta (50mM) ocasiona la disminución de la poza de glutatión total (GSH_T) en el hepatocito y que dicha disminución se observa tanto en condiciones de alimentación, ayuno, o por el estímulo de la síntesis de glutatión total, después de un periodo de incubación de 1 hora en presencia de dicho compuesto, estos resultados coinciden con lo reportado con Chio *et al.*, (2000) quienes señalan que la intoxicación aguda con etanol ocasiona un estado de estrés oxidativo y un consecuente abatimiento de los niveles de glutatión, así mismo concuerda con lo señalado por Cobreros *et al.*,(1997) y La Casa *et al.*, (2000) quienes reportan que la intoxicación con una dosis alta de etanol en hepatocitos aislados ocasiona una disminución de los niveles de glutatión.

Nuestros resultados no coinciden con lo reportado en la literatura cuando la dosis retardora de etanol es menor, cuando no se extrajo todo el glutatión al emplear otros ácidos o DTNB o KCl, cuando no se consideran las precauciones necesarias para desproteínizar la muestra con rapidez, cuando la muestra no es trabajada en condiciones de temperatura controlada (4°C) (Akerboom y Sies, 1981; Roberts y Francetic, 1993; Kanbagli *et al.*, 2002).

En conclusión, de acuerdo con nuestros datos experimentales, la incubación de células hepáticas con una concentración de etanol (50 mM) provoca la disminución de la poza de GSH_T. No obstante, que en el presente trabajo de investigación no determinamos los mecanismos por los cuales el etanol ocasionó dicha disminución de la poza de glutatión, se cuenta con reportes en la literatura que señalan algunas de las posibles causas, como son: que el acetaldehído, producto del metabolismo del etanol, es capaz de unirse a moléculas de GHS y cisteína, aminoácido esencial para la síntesis de glutatión, y en ambos casos ocasiona su oxidación (Shaw *et al.*, 1981). Pero la disponibilidad de cisteína no solo se ve disminuida por esta razón, sino también porque el etanol en dosis agudas inhibe la vía de la trans-sulfatación, mediante la cual el hepatocito convierte metionina y serina en cisteína (Jung *et al.*, 2003); además, el etanol estimula el catabolismo irreversible de la cisteína a taurina, la cual a su vez contribuye a disminuir los niveles de GSH_T (Jung *et al.*, 2003). Por otra parte la intoxicación con etanol ocasiona un decremento gradual y significativo de los niveles de ATP en el hepatocito (Cunningham y Van Horn, 2003), lo que trae como consecuencia la disminución de la síntesis de GSH_T (García-Ruiz *et al.*, 1994).

Otra de las posibles razones que se ha propuesto, como causante de la disminución de los niveles de GSH_T en presencia de etanol, es que la actividad de las enzimas determinantes en la síntesis y reciclamiento de dicho tiol, como son la γ -glutamilcisteína sintetasa, y la glutatión reductasa, sufren un decremento en su actividad debido a la presencia del etanol (Oh *et al.*, 1997). Sin embargo, el principal mecanismo propuesto por el cual el etanol disminuye los niveles de GSH_T es mediante el incremento en la producción de especies de oxígeno reactivas, la cual se postula que es por tres posibles sistemas, el citocromo P450 (CYP2E1), los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial y la NADPH oxidasa (Bailey y Cunningham, 1999; Nieto *et al.*, 1999, 2000; Sun *et al.*, 2001).

La utilización de aminoácidos como medio para estimular la síntesis de GSH_T, nos permitió manejar un modelo en el cual se garantiza la síntesis de GSH_T y por tanto su disponibilidad para los diferentes procesos metabólicos de la célula, entre ellos su utilización como defensa antioxidante y demostrar bajo estas condiciones, si efectivamente el etanol y las catecolaminas ocasionan algún cambio en la poza de GSH_T, tanto de manera independiente, como al emplearse de manera simultánea. Para el caso de los agonistas adrenérgicos no fue posible apreciar en hepatocitos aislados de ratas alimentadas, dado que en estas condiciones la célula no muestra diferencias significativas, por tal razón se recurrió al modelo de ayuno, suplementado con la utilización de aminoácidos, para de esta forma garantizar la síntesis de GSH_T y discernir el posible efecto de los agonistas adrenérgicos

Los resultados obtenidos indican que en hepatocitos aislados la síntesis de GSH_T es estimulada por la adición al medio de incubación de la mezcla de aminoácidos (glutamina 5 mM, glicina 4 mM, serina 1mM, metionina 0.4 mM) en las concentraciones finales indicadas. Dicho efecto se reportó previamente, empleando solo metionina (concentración final 1mM), o bien en presencia de una mezcla de aminoácidos a diferentes concentraciones finales (Estrela *et al.*, 1988; Lu *et al.*, 1990). Lo anterior se debe a que al proporcionar a los hepatocitos estos aminoácidos, se promueve la síntesis de cisteína mediante la vía de la trans-sulfatación, la cual es considerada un factor limitante para la síntesis de glutatión (Mosharov *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004). También fue posible determinar que tanto la hormona como los agonistas adrenérgicos empleados (fenilerina e isoproterenol) estimulan el eflujo del GSH_T al medio extracelular en ausencia de etanol y aparentemente no

modifican la síntesis de dicho tiol. Pero además se observó que al incubar en presencia de aminoácidos más etanol más hormona, no solamente se revierte el efecto del etanol sobre la poza de GSH_T, sino que la hormona estimula la síntesis de glutatión.

Los datos mostrados y obtenidos a partir de un modelo *in vitro*, permiten señalar que el que se presente una mayor cantidad de GSH_T en el medio extracelular no es una consecuencia del daño celular. Esto se comprobó mediante la utilización de tres métodos: (1) condiciones fuertes de centrifugación a 9,000 g, (2) filtración con aceite de silicón, (3) condiciones suaves de centrifugación a 90 g. Bajo las tres condiciones experimentales mencionadas, invariablemente se registra una mayor cantidad de GSH_T en el medio extracelular. En este sentido es importante mencionar que al utilizar condiciones fuertes de centrifugación, con las que la viabilidad celular es menor y se conserva la misma relación de GSH_T intracelular y extracelular, pueda deberse a que el procesamiento de la muestra es rápido y no permite que se de la difusión del GSH_T contenido en las células rotas al medio de incubación. Así es posible concluir que las células hepáticas tienen la función *per se* de sintetizar y liberar glutatión al medio extracelular de manera natural y no sólo en respuesta a un daño celular; cabe señalar que hasta el momento no se cuenta con reportes que hagan referencia al posible efecto del manejo experimental sobre la viabilidad celular y su repercusión en la movilización del GSH_T.

Por otra parte, el flujo hepático de GSH representa un paso crítico en la homeostasis orgánica, ya que se sabe que el transporte de este tripéptido se lleva a cabo través de la membrana plasmática del hepatocito, sin embargo, poco es conocido sobre la regulación de este proceso de transporte. Se sabe que en hígados de rata profundidos, el eflujo de GSH se aumenta por la adición de hormonas como la vasopresina o algunos agonistas α -adrenérgicos como la adrenalina, además del glucágon, y la angiotensina (Sies y Graf, 1985; Graf y Sies, 1986; Sies *et al.*, 1987). Sin embargo para estudiar el posible efecto de los hormonas sobre la movilización del GSH_T fue necesario el diseñar un modelo *in vitro*, ya que esto permitió, de manera más detallada, el caracterizar los efectos de dichas hormonas y otros factores de interés que hasta ahora no son claros.

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente estudio con los agonistas, es posible indicar que tanto la epinefrina como sus agonistas fenilefrina e isoproterenol estimulan el eflujo de GSH_T, lo cual está relacionado con la disminución del contenido de GSH_T intracelular; sin embargo, parece no interferir con la síntesis del tripéptido. Es conveniente aclarar que aunque se cuenta con reportes sobre el efecto de las catecolaminas en hepatocitos aislados, estos se enfocan al papel de las hormonas sobre el metabolismo del etanol (Mezey *et al.*, 1990), al estímulo en la producción de radicales hidroxilo en presencia de etanol (Castrejón *et al.*, 2002), pero no se cuenta con trabajos previos en los que se estudie el efecto las hormonas sobre la poza de glutatión, lo cual permita confirmar que en la célula aislada se observa el mismo estímulo sobre el eflujo del glutatión que el reportado en hígados perfundidos (Graf y Sies, 1985; Sies *et al.*, 1987)

En conclusión, los resultados obtenidos indican que tanto la hormona como sus agonistas estimulan la movilización del GSH_T tal como ocurre en hígado perfundido, lo anterior plantea la posibilidad de que el transporte de glutatión, que se da a través de la membrana sinusoidal del hepatocito, sea un efecto facilitado por hormonas y que esta regulación hormonal de la poza de GSH_T puede ser de gran importancia para la movilización de grandes cantidades de GSH_T desde su reservorio hepático, para su utilización por los tejidos y órganos periféricos. Además, dicho efecto puede ocasionar un incremento significativo en los niveles de GSH_T plasmático y de los aminoácidos que lo constituyen, lo cual puede ser de importancia crítica en la regulación de la homeostasis orgánica que desempeña el hígado al proveer tanto de glutatión como de cisteína a órganos extrahepáticos tales como el riñón, el pulmón, el intestino y el cerebro.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

- La incubación de hepatocitos aislados con una dosis aguda de etanol (50 mM) ocasiona una disminución de los niveles de GSH_T tanto extracelular como intracelular.
- La disminución en los niveles de GSH_T se observa tanto en células de animales alimentados como ayunados.
- La incubación de hepatocitos aislados de ratas con 48 horas de ayuno con los aminoácidos: glutamina, serina, glicina y metionina incrementa la síntesis de GSH_T lo que repercute tanto en el medio extracelular como intracelular.
- En hepatocitos aislados e incubados con aminoácidos más epinefrina, fenilefrina e isoproterenol, se incrementa el eflujo de GSH_T.
- En hepatocitos aislados e incubados con aminoácidos más etanol más epinefrina, fenilefrina o isoproterenol, se incrementa el eflujo y la síntesis de GSH_T.
- En hepatocitos aislados y bajo las condiciones del modelo experimental empleado se observa una mayor cantidad de GSH_T en el medio extracelular.
- El efecto del etanol al disminuir la poza de GSH_T en el hepatocito es independiente de la acción de los agonistas adrenérgicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.D. Jr, Lauterburg, B.H. and Mitchell, J.R. (1983) Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227: 749 – 754.
- Adachi, A. and Ishii, H. (2002) Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free. Radic. Biol. Med.* 32: 487-491.
- Adibi, S.A., Barahona, E. and Lieber, C.S. (1992) Effects of ethanol on amino acids and protein metabolism. In: Lieber, C.S., ed Medical and nutritional complications of alcoholism: Mechanism and management. New York: Plenum Press, 1992. pp 127-155.
- Ahmed, S., Leo, M.A. and Lieber, C.S. (1994) Interactions between alcohol and beta-carotene in patients with alcoholic liver disease. *Amer. J. Clin. Nutri.* 60: 430-436.
- Akerboom T.P.M. and Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth. Enzymol.* 77: 373-382.
- Alarcon, N.M. (2001) influencia de los lípidos de la dieta sobre la defensa antioxidante en el hepatocito aislado de rata. Tesis Licenciatura. FES Iztacala, UNAM.
- Altomare, E., Vendemiale, G., Ajano, O. (1998) Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and no alcoholic liver diseases. *Life Sci.* 43: 991-998.
- Anderson, M.E. (1997) Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv. Pharmacol* 38: 65-78.
- Anderson, M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Inter.* 111 – 112: 1 –14.
- Anand, B.S. (1999) Cirrhosis of the liver. *West. J. Med.* 171: 110 – 115.
- Apte, M.V. and Wilson, J.S. (2003) Alcohol-induced pancreatic injury. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17: 593 – 612
- Atmaca, G. (2004) Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei. Med. J.* 45: 776- 788.
- Bailey, S.M., Pietsch, E.C. and Cunningham, C.C (1999) Etanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III. *Free. Radic. Biol. Med.* 27: 891-900.

- Bailey, S.M. and Cunningham, C.C. (2002) Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. *Free. Radic. Biol. Med.* 32: 11-16.
- Bautista, A.P., Spitzer, J.J. (1992) Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by *in situ* perfused rat liver. *Hepatology*. 15: 892-898
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E. and Hess, B. (1965) Lactic Dehydrogenase. *Methods of Enzymatic Analysis*. 7: 737-743.
- Biaglow, J.E., Varnes, M.E. and Epp, E.R., Clark, E.P., Tuttle, S.W. and Held K.D. (1989) Role of glutathione and other thiols in cellular response to radiation and drugs. *Drug. Metab.Rev.* 20: 1-12.
- Bigelow, D.J. and Squier, T.C. (2005) Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1703: 121-134.
- Bode, J.C.H. (1980) Alcohol and the gastrointestinal tract. *Adv. Intern. Med. Pediatr.* 1980:451-455
- Bondy, S.C. and Pearson, K.R. (1993). Ethanol induced oxidative stress and metabolic status. *Alcoholism Clin Exp Res* 17: 1651-1655.
- Bosrom, W.F.; Li, T.K. (1981) Genetic determination of alcohol and aldehyde dehydrogenases and alcohol metabolism. *Semin. Liver Dis.* 1: 179-188
- Brown, P.C., Thurman, R.G., Belinsky, S.A. and Kauffman, F.C. (1991) Effect of allyl alcohol on xanthine dehydrogenase activity in the perfused rat liver. *Toxicol Lett.* 58:1-6.
- Buettner, G.R. and Schafer, F.Q. (2000) Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratol.* 62: 234.
- Cadenas, E. and Davies, K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222- 230
- Cai, J., Chen, Y., Seth, S., Furukawa, S., Compans, R.W. and Jones, D.P. (2003) Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 34 : 928- 936.
- Calvo, B.H. (2003) Alcohol y neuropsicología. *Trast. Adic.* 5: 256 - 268
- Castrejón, M., Villalobos, R., Guinzberg, R. and Piña, E. (2002) Adrenaline (via α_{1B} -adrenoceptors) and ethanol stimulate OH radical production in isolated rat hepatocytes. *Life Sci.* 71: 2469-2474.

- Carvalho, F., Remiao, F., Soares, M.E., Catarino, R., Queiroz, G. And Bastos, M.L. (1997) *d*-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 71: 429-436.
- Cederbaum, A.I., and Dicker, E. (1981) The effect of cyanamide on the metabolism of ethanol and acetaldehyde and on gluconeogenesis by isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 30: 3079-3088
- Choi, D.W., Kim, s.Y., Kim, S.K. and Kim, Y.C. (2000) Factors involved in hepatic glutathione depletion induced by acute ethanol administration. *J. Toxicol. Environ. Health.* 60: 459-469.
- Cobreros, A., Sainz, L., Laceras, B. and Cenarruzabeitia, E. (1997) Hepatotoxicity of ethanol: protective effect of calcium channel blockers in isolated hepatocytes. *Liver.* 17: 76-82.
- Comporti, M. and Benedetti, A. (1985) Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Inv.* 53: 599-623.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T. (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107: 526-545.
- Crews, F.T., Braun, C.J., Hoplight, B., Switzer, R.C. and Knapp, D.J. (2000) Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24: 1712-1723.
- Cuadrado, P. (2000) Trastornos y problemas relacionados con la salud mental. Alcoholismo y drogodependencias. *Enfermería en psiquiatría y salud mental.* 1^{er} ed. Edit. DAE. Barcelona, España, pp 292-303.
- Cunningham, C.C. and Bailey, S.M. (2001) Ethanol consumption and liver mitochondrial function. *Biol. Signals. Recept.* 10: 271-82.
- Cunningham, C.C. and Van Horn, C.G. (2003) Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol Res. Health.* 27: 291-299.
- Dan, Z., Popov, Y., Patsenker, E., Preimel, D., Liu, C., Wang, X.D., Seitz, H.K., Schuppan, D. and Stickel, F. (2005). Hepatotoxicity of alcohol-induced polar retinol metabolites involves apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential. *FASEB J.* 24: 1-20.

- De Leve, L.D., Kaplowitz N. (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 52: 287 – 305.
- De Groot, H. (1994) Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepato-Gastroenterol.* 41: 328-332.
- Dickinson, D.A. and Forman, H.J. (2002) Glutathione in defense and signaling. Lessons from a small thiol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 973: 488-504.
- Dickinson, D.A. and Forman H.J. (2002) Glutathione and thiols metabolism . *Biochem. Pharmacol.* 64: 1019-1026.
- Dringen, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62: 649-671.
- Droge, W. (2002) Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
- Elizondo, L.J.A. (2004) El alcoholímetro II: como beber sin emborracharse. *Liberaddictus.* 77: 59-64.
- Eriksson, C.J.P. (1983) Human blood acetaldehyde concentration during ethanol oxidation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18: 141-150
- Estrala, J.M., Gil, F., Vila, J.M. and Viña, J. (1988) Adrenergic modulation of glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. *Am J. Physiol.* 255: E801-E805.
- Estruch, R. (2002) Efectos del alcohol en la fisiología humana. En: Pascual, F., Torres M., Gual, A., editores. Monografía del alcohol. Adicciones .pp 43 – 62.
- Feng, X.L., Garcia, G.E., Hwang, D. and Wilson, C.B.(1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 95: 1669-1675.
- Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N, García-Ruiz, C. Colell, A. Merce, M., Ardite, E. and Morales, A. (1997) GSH transport in mitochondrial: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 273: G7-G17.
- Fernández-Checa, J.C., García-Ruiz, C., Colell, A., Morales, M., Mari, M. and Ardete, E. (1998) Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *BioFactors.* 8 :7-11
- Ferreira, R. (1984) Que son los radicales libres (RL). Antioxidantes y Calidad de Vida, pp. 6-89.

- Fink, G. (2000) Encyclopedia of stress. *Academic Press, San Diego, C. A.*
- Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 248-253
- Friedl, H.P., Till, G.O., Ryan, U.S. and Ward, P.A. (1989) Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J.* 3: 2512-2518.
- García-Ruiz, C., Morales, A., Ballesta, A., Rodes, J., Kaplowitz, N. and Fernández-Checa, J.C. (1994). Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J. Invest.* 94: 193-201.
- 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.
- Gibson, A.G. (1975) Alcohol can be absorbed through the respiratory tract (A case report). *Med. Sci. Law* pp 64.
- Graf, P. and Sies, H. (1986) Hepatic glutathione release upon decreases of extracellular calcium concentration. *Biochem. Pharmacol.* 35: 2832-2833.
- Griffith, O.W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 922-935.
- Guerri, C. (2000) Como actúa el alcohol en nuestro cerebro. *Trastornos Adictivos.* 2: 14 – 25.
- Hall, P. (1995) Pathological spectrum of alcoholic liver disease. En *Alcoholic liver disease; Pathobiology and Patogénesis.* 2ª ed. Londres. pp 412-68
- Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1: 358-364.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1999) *Free radicals in biology and medicine.* 3 Edition. Oxford University Press. Oxford, New York.
- Halsted, C.H., Villanueva, J. and Chandler, C.J. (1993) Centri-lobular distribution of acetaldehyde and collagen in the ethanol-fed micropig. *Hepatol.* 18: 954-960.

- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S. and Floyd, R.A. (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1456-1462.
- Hernández-Muñoz, R., Caballeria, J., Baraona, E., Uppal, R., Greenstein, R. And Lieber, C.S. (1990) Human gastric alcohol dehydrogenase: its inhibition by H₂-receptor antagonists, and its effect on the bioavailability of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14: 946-950.
- Herzenberg, L.A., De Rosa, S.C and Dubs, J.G. (1997) Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1967-1972.
- Hwang, C., Sinsky, A.J. and Lodish, H.F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.* 257: 1496 – 1502.
- James, R.C., Roberts, S.M: and Harbison, R.D. (1983) The perturbation of hepatic glutathione by alpha 2-adrenergic agonists. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3: 303-308.
- Jung, Y.S., Kwak, H.E., Choi, K.H. and Kim, Y.C. (2003) Effect of acute ethanol administration on S-amino acid metabolism: increased utilization of cysteine for synthesis of taurine rather than glutathione. *Adv. Exp. Med. Biol.* 526: 245.252.
- Kanbagli, O., Balkan, J., Aykac, G., Toker, G. and Uysal, M. (2002) Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol inducer liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* 25. 1482-1486
- Kannan, R., Tang, D., Hu, J. and Bok, D. (2001) Glutathione transport in human retinal pigment epithelial (HRPE) cell: apical localization of sodium-dependent GSH transport. *Exp. Eye Res.* 72: 661-666.
- Kaplan, H.I. y Sádock, B.J. (1996) Manual de psiquiatría de urgencias. Edit. Medica Panamericana. Madrid, España, pp 310-315.
- Keisari, Y., Braun, L. and Flescher, E. (1983) The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiol.* 165: 78-89.
- Keyse, S.M. and Tyrrell, R.M. (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 99-103

- Kharchenko, N.K. (2000) Effects of glycine on the catecholamine levels and activities of alcohol-metabolizing enzymes in rats with alcohol intoxication and addiction. *Neurophysiol.* 32: 312-320.
- Kidd, P.M. (1985) Liver biotransformation of xenobiotics, foods, and drugs to free radical oxidants. In Levine, S. A. Kidd, P.M. Antioxidant adaptation its role in free radical pathology. San Leandro, C. A: Biocurrents, p 222-281.
- Kidd, P.M. (1991) Natural antioxidants first line of defense. In Kidd P. M., Huber, W. Living with the AIDS virus: a strategy for long-term survival. Albany, California: PMK Biomedical-Nutritional Consulting. p 115-142.
- Knight, J.A. (1998) Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Annals Clin. Lab. Sci.* 28: 331-346.
- Kricka, I.J. and Clark, P.M.S. (1979) Biochemistry of alcohol and alcoholism. (Ellis Horwood series in Chemical Science) Halsted Press. pp1- 69.
- Koop D.R (1989) Minor pathways of ethanol metabolism. In: Crow K. E., Batt, R. D., editors. Human Metabolism of Alcohol, Vol. II: Regulation, Enzymology and Metabolites of Etanol. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 133.
- Kondo, T., Yoshida, K. and Urata, Y. (1993) γ -Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock on K562 erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 268: 20366-20372.
- Kono, H., Rusyn, I., Yin, M., Gabele, E., Yamashina, S., Dikalova, A., Kadiiska, M.B., Connor, H.D., Mason, R.P., Segal, B.H., Brandford, B.U., Holland, S.M. and Thurman, R.G. (2000) NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J. Clin. Invest.* 106: 867-872.
- Kosower, N.S. (1978) The glutathione status of cells. *Inter. Rev. Cytol.* 54: 109 – 160.
- Kormarnisky, L.A., Christopherson, R.J. and Basu, T.K. (2003) Sulfur: its clinical and toxicologic aspects. *Nut.* 19: 54-61.
- Kovács, G.L., Soronez, M., Tegyei, I. (2002) Plasma catecholamines in ethanol tolerance and withdrawal in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 448: 151-156.
- Kowaltowski, A.J. and Vercesi, A.E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26 :463-471.

- La Casa, C., Villegas, I., De la Lastra, C.A., Moltiva, V. and Calero, M.M.J. (2000) Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.* 71: 45-53
- Laguna, J., Piña, E. (2002) Bioquímica. 5ª ed. Manual Moderno. México.
- Lang, C.A., Naryshkin, S., Schneider, D.L., Mills, B.J., and Lindeman, R.D. (1992) Low blood glutathione concentrations in healthy aging adults. *J. Lab. Clin. Med.* 120: 720-725.
- Lee R.G. (1994) Fatty changes and steatohepatitis. En: Diagnostic liver pathology. New York: Mosby: 167-194.
- Lee, H.C. and Wei, Y.H. (2005) Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int. J. Biochem. Biol.* 37: 822-834.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M (2001) Principios de bioquímica. 3ª ed. Omega. España.
- Leo, M.A. and Lieber, C.S. (1999) Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interacciones, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Amer. J. Clin. Nutri.* 69: 1071-1085.
- Lieber, C.S., Gentry, R.T. and Baraona, E. (1994) First pass metabolism of ethanol. *Alcohol Alcohol.* 2: 163-169.
- Lieber, C.S. (2000) Alcohol and liver: metabolism of alcohol and role in hepatic and extrahepatic diseases. *The Mount Sinai J. Med.* 67: 84-94.
- Lieber, C.S. (2003) Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res. Health.* 27: 220-231.
- Lieber, C.S. (2004) The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug. Metab. Rev.* 36: 511-529.
- Liu, H., Wang, H., Shenvi, S., Hagen, T.M. and Liu, R.M. (2004) Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1029: 346-349.
- Lu, S., Garcia-Ruiz, C., Kuhlenkamp, J., Ookhtens, M., Salas-Prato, M. and Kaplowitz, N. (1990) Hormonal regulation of glutathione efflux. *J. Biol. Chem.* 265: 16088-16095.
- Lu, S., Kuhlenkamp, J., Garcia-Ruiz, C. and Kaplowitz, N. (1991) Hormone mediated down regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin. Invest.* 88: 260-269.

- Lu, S. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13: 1169-1183.
- Lomaestro, B.M. and Malone, M. (1995) Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Anna. Pharmacother.* 29: 1263-1273.
- Los, M., Schenk, H., Hexel, K., Baeuerle, P.A., Droge, W. and Schuize-Osthoff, K. (1995) IL-2 gene expression and NF- κ B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J.* 14: 3731-3740.
- Mates, J.M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.* 153: 83-104.
- Mira, L., Maia, L., Barreira, L. and Manso, C.F. (1995) Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 53-58.
- Martínez, C.S., Martínez, C.M.J., Esquivel, HR., (2001) Hígado y sistema endocrino. Su aparición en el metabolismo. 1^{era} ed. Edit. UNAM FESIztacala. México,
- Mantersson, J., Lai, J.C.K., Meister, A. (1990) High affinity transport of glutathione is part of a multi-component system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7185-7189.
- McDonough, K.G. (2003) Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicol.* 189: 89-97.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Meister, A. (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* 269: 9397-9400.
- Meister, A. (1995) Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim. Biophys. Act.* 1271: 35-42.
- Meister, A. and Larsson, A. (1995) Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the gamma-glutamyl cycle. In: Scriver C. R., *et al.*, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Vol.1)*. New York: McGraw-Hill, p. 1461-1495. (Chapter 43).
- Mendenhall, C., Roselle, G.A., Gartside, P. (1995). Relationship of protein calorie malnutrition to alcoholic liver disease: a reexamination of data from two veterans administration cooperative studies. *Alcoholism Clin. Exper. Res.* 19: 635-641.

- Merck Index (1989) Encyclopedia of chemical, drugs and biological. 11 ed. Edit. Budavari, S. Mer & Co. Ratway. New Jersey.
- Mezey, E., James, J.P., Savitri, S. and Akinshola, B.E. (1990) Effect of epinephrine on ethanol metabolism by isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2473-2478.
- Milke, G.M. (1995) Metabolismo del alcohol en presencia del daño hepático. Tesis de licenciatura en nutrición y ciencias de los alimentos. Universidad Iberoamericana, México D.F. IX-XI
- Mira, L.; Maia, L.; Barreira, L.; Manso, C.F. (1995) Evidence for Free Radical generation due to NADH oxidation by Aldehyde Oxidase during ethanol metabolism. *Arch. Bioch. Bioph.* 318: 53-58.
- Mittal, C.K. and Murad, F. (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutasa and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4360-4364.
- Moser, K.; Pепенberg, J.V.; Wartburg, J.P. (1968) Heterogenitat and organverteilung der Alkoholdehydrogenase bei verschiedenen spezieis. *Enzym. Biol. Clin.* 9: 447
- Moshage, H. (2001) Alcoholic liver disease: a matter of hormones?. *J Hepatol.* 35: 130-133.
- Mosharov, E., Cranford, M.R. and Banerjee, R. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochem.* 39: 13005-13011.
- Musallam, L., Ethier, C., Haddad, P., denizeau, F. and Bilodeau, M. (2002) Resistance to fas-induced apoptosis in hepatocytes: role of GSH depletion by cell isolation and culture. *AJP- Gastrointest Liver Physiol.* 283: G709-G718.
- Nakazawa, J., Genka, C. and Fujishima, M. (1996) Pathological aspects of active oxygens / free radicals. *Japan. J. Physiol.* 46: 15-32.
- Nagy, L.E. (2004) Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 55-78.
- Nanji, A.A and Hiller-Sturmhofel, S. (1997) Apoptosis and necrosis. *Alcohol Health Res. Worl.* 21: 325-330.

- Niemela, O., Parkkila, S. and Yla- Erütala, S (1995) Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology*. 22: 1208-1214.
- Niemela, O. (1999) Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol – induced oxidative stress. *Front. Biosci.* 4: d506-d513.
- Niemela, O. (2001) Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1533-1538.
- Nieto, N., Friedman, S.L., Greenwel, P. and Cederbaum, A.L.(1999) CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 30: 987-996.
- Nieto, N., Greenwel, P., Friedman, S.L., Zhang, F., Dannenberg, A.J. and Cederbaum, A.L.(2000) Ethanol and arachidonic acid increase alpha 2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. Role of H₂O₂ and cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275: 20136- 20145.
- Nomiyama, K. and Nomiyama, H. (1974) Respiratory retention uptake and excretion of organic solvents in man. *Int. Arch. Arbeitsmed* 32: 75-83
- Nordberg, J. and Arnér, E.S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1287-1312.
- Oh, S.I., Kim, C.L., Chun, H.J., Lee, M.S. and Park, S.C.(1997) Glutathione recycling is attenuated by acute ethanol feeding in rat liver. *JKMS.* 12: 316-321.
- Olmedo, G.M.S. y Sánchez, P.J. (2003) Entrevista de valoración de alcoholismo en salud mental. *Annales de Psiquiatria.* 19: 355-360.
- Oneta, M.C., Simanowski, U.A., Martinez, M., Allali-Hassani, A., Parés, X., Omán, N., Conradt, C., Waldherr, R., Fiehn, W., Coutelle, C. and Seitz, H.K. (1998) First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut.* 43: 612-619.
- Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cysteine. *Sem. Liver Dis.* 18: 313 – 329.
- Organización Mundial de la Salud. (1996) CIE. 10. Trastornos mentales y del comportamiento. Madrid. Meditor.

- Pansky, B. (1985) Embriología médica. Edit. Medica- Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Paolisso, G., Tagliamonte, M.R., Rizzo, M.R. (1998) Oxidative stress and advancing aging: results in healthy centenarians. *J. Am. Geriatr. Soc.* 46: 83-138.
- Parcell, S. (2002) Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rev.* 7: 22-44.
- Parks, A, Gelman, S, Maze, M.(1998) Fisiología Hepática. En: Miller E, editor. Anestesia. 4^{ta} ed. España: Harcourt Brace, p. 629 - 42.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 333: 19-39.
- Pileblad, E. and Magusson, T. (1992) Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of γ -glutamylcysteine. *Biochem. Pharmacol.* 44: 895-903.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. and Casini, A.F. (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 66: 1499-1503.
- Pronko, P., Bardina, L., Satanovskaya, V., Kuzmich, A. and Zimatkin, S. (2002) Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol-and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract. *Alcohol & Alcohol.* 37 :229-235.
- Rahman, Q., Abidi, P., Afaq, F., Schiffmann, D., Mossman, B.T., Kamp, D.W. and Athar, M. (1999) Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit. Rev. Toxicol.* 29: 543-568.
- Rana, S.V., Allen, T. and Singh, R. (2002) Inevitable glutathione, then and now. *Indian J. Exp. Biol.* 40: 706-716.
- Riveros, H., Julian, A., Piña, E. (1997) Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch. Med. Res.* 28: 453-471.
- Roberts, J.C., and Francetic, D.J. (1997) The importance of sample preparation and storage in glutathione analysis. *Anal. Biochem.* 211: 183-187
- Roberts, S.M., DeMott, R.P. and James, R.C. (1997) Adrenergic modulation of hepatotoxicity. *Drug. Metab. Rev.* 29: 329-353.

- Roberts, A.W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J.B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollok, J.D., Borneo, J.B., Branford, G.B., Atkinson, S.J., Dinauer, M.C., and Williams, D.A. (1999) Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity*. 10: 183-196.
- Roth, S. and Droge, W. (1987) Regulation of T cell activation and T cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell. Immunol.* 108: 417-424.
- Salaspuro, M. (1997) Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences. *Addic. Biol.* 2: 35-46.
- Salmela, K.S., Kaihovaara, P., Salaspuro, M. and Roine, R.P. (1996) Role of catalase in rat gastric mucosal ethanol metabolism in vitro alcoholism. *Clin. Exp. Res.* 20: 1011-1015.
- Salmela, K.S., Sillanaukee, P., Itala, L., Vakevainen, S., Salaspuro, M. and Roine, R.P. (1997) Binding of acetaldehyde to rat gastric mucosa during ethanol oxidation. *J. Lab. Clin. Med.* 129: 627-633.
- Sanchez-Turet, M. (1999) Enfermedades y problemas relacionados con el alcohol. Edit DAE. Barcelona, España.
- Schafer, F.Q. and Buettner, G.R. (2001) Redox environment of cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1191-1212.
- Shaw, S., Jayatileke, E., Ross, W.A., Gordon, E.R. and Lieber, C.S. (1981) Ethanol induced lipoperoxidation. Potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 417-425.
- 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.
- Schuckit, M.A. and Irwin, M. (1988) Diagnosis of alcoholism. *Med. Clin. North. Am.* 72: 1133-1153.
- Scott, R.B., Reddy, K.S., Husain, K., Schlorff, E.C., Rybak, L.P. and Somani, S.M. (2000) Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. *Pathophysiol.* 7: 25-32.

- Seitz, H.K., Gartner, U., Egerer, G., Simanowski, U.A. (1994) Ethanol metabolism in the gastrointestinal tract and its possible consequences. *Alcohol, Alcohol.* 2: 157 – 162.
- Sen, C.K. (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell. Regul.* 36: 1-30.
- Sies, H. and Graf, P. (1985) Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. *Biochem. J.* 226: 545-549.
- Sies, H., Brigelius, R. and Graf, P. (1987). Hormones, glutathione status and protein s-thiolation. *Adv. Enzyme. Regul.* 26: 175 189.
- Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free. Radic. Biol. Med.* 27: 916-921.
- Speisky, H., MacDonald, A., Giles, G., Orrego, H. and Israel, Y. (1985) Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies. *Biochem. J.* 225: 565-572.
- Storz, G., Tartaglia, L.A. and Ames, B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes : direct activation by oxidation. *Sci.* 248: 189-194.
- Sultatos, L.G. (1988) Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase / oxidase system in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 946-949.
- Sun, A.Y., Sundberg, M.I., Neve, E., Matsumoto, H., Nishitani, Y., Minowa, Y., Fukui, Y., Bailey, S.M., Patel, V.B., Cunningham, C.C., Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Popov, P., Malbohan, I., Janebova, M., Nesper, K. and Sun, G.Y.(2001) Ethanol and oxidative stress. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25: 237S-243S.
- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.R. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279: L1005-L1028.
- Tirmenstein, M.A., Nicholls-Grzemeski, F., Zhang, J. and Fariss, M. (2000) Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chem. Biol. Interac.* 127: 201-217.
- Townsend, D.M., Tew, K.D. and Tapiero, H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 57: 145-155.
- Toyokuni, S. (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol. Int.* 49: 91-102.

- Tuma, D.J. and Casey, C.A. (2003) Dangerous byproducts of alcohol breakdown-focus on adducts. *Alcohol Res. Health.* 27: 285-290.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552: 335-344.
- Upadhyay, S.C., Ravindranath, V. (2002) Detection and localization of protein-acetaldehyde adducts in rat brain after chronic ethanol treatment. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26: 856-863.
- Urata, Y., Yamamoto, H. and Goto, S. (1996) Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of γ -Glutamylcysteine synthetase by interleukin- β and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 15146-15152.
- Velasco, R. (1992) Esa enfermedad llamada alcoholismo. Ed. Trillas México p 11-16.
- 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.
- Videla, L.A. (1986) Effect of ethanol, acetaldehyde and acetate on the antioxidant sensitive respiration in the perfused liver. *Alcohol.* 3: 163-167.
- Wang, L.Y., Wang, L., Zhu, C.Q., Dong, L., Xia, T.T., Chen, H.Q. and Bian, G.R. (2004) Spectrofluorimetric determination of reduced glutathione using organic nanoparticle probes. *Chin. J. Anal. Chem.* 22: 445 - 449.
- Watson P.E. (1989). Total body water and blood alcohol levels: updating the fundamentals. In : Crow K E, Batt R D, editors. Human metabolism of alcohol, Vol. 1: Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects and General Interest. Boca Raton, FL; CRC Press, p 41.
- 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.
- Woods, J.S. and Ellis, M.E. (1995) Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 50: 1719-1724.

- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N.D.(2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134: 489-492.
- Wu, D and Cederbaum, A.I. (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res. Health.* 27: 277-284.
- Yang, C.M. and Carlson, G.P. (1991) Effects of ethanol on glutathione conjugation in rat liver and lung. *Biochem Pharmacol.* 41: 923-929.
- Zentella de Piña, M. y Piña, E. (1987) Metabolitos del etanol. Mensaje Bioquímico. 10: 143-175. Dep. Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM México.
- Zentella de Piña, M., Diaz, B.A., Rodríguez, L.L. y Escotto, V.J. (1993) Importancia del polimorfismo en el metabolismo del etanol. *Rev. Med. del Hospital General.* 56: 113-124.
- Zentella de Piña, M. (1994) Daño celular por alcoholismo: papel de un anti-inflamatorio. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). UNAM.
- Zentella de Piña, M. (2002) Los antiinflamatorios no esteroides modifican la respuesta lipolítica a la epinefrina en los adipositos aislados de la rata. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomedicas. UNAM
- Zentella de Piña, M., García, S.C., Balmori, Y.S. (1994) Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *Bol. Educ. Bioq.* 13: 87-93.
- Zentella, de Piña M. and Balmori Y.S. (1996) Papel fisiológico de los radicales libres, *Bol. Educ. Bioq.* Facultad de Medicina UNAM, 15:152-161.
- Zima, T., Fialova, L., Mestek, O., Janebová, M., Crkovská, J., Malbohan, I., Stípek, S., Mikulíková, L. and Popov, P. (2001) Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J. Biomed. Sci.* 8: 59-70.