



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA.

“MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AINE’s SOBRE LA POZA DE GLUTATIÓN EN HEPATOCITOS TRATADOS CON ETANOL.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
B I O L Ó G I C A S
AREA: BIOLOGIA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A :
BIOL. ALAIN DE JESÚS HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS

Facultad de Medicina



México, D. F.

2009



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.

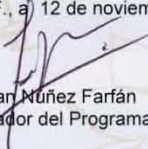
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **HERNÁNDEZ VÁZQUEZ ALAIN DE JESÚS** con número de cuenta **97291813** con la tesis titulada **"MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AINE's SOBRE LA POZA DE GLUTATIÓN EN HEPATOCITOS TRATADOS CON ETANOL"**, realizada bajo la dirección del **DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS**:

Presidente:	DR. GUILLERMO ROBLES DÍAZ
Vocal:	DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Secretario:	DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS
Suplente:	DR. JESÚS AGUIRRE LINARES
Suplente:	DRA. BEATRIZ VÁZQUEZ CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de noviembre de 2009.


Dr. Juan Muñoz Farfán
Coordinador del Programa

Agradecimientos

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos recibidos por el CONACYT (beca de maestría), por el Apoyo a Proyectos de Investigación PAPIIT (IN-208308)

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Héctor Riveros Rosas

Dra. Beatriz Vázquez Cruz

Dr. Rafael Villalobos Molina

Agradecimientos

Por medio de la presente quiero poner de manifiesto mi agradecimiento infinito a todas las personas que han contribuido de manera directa e indirecta en mi formación académica.

A mi tutor el Dr. Héctor Riveros Rosas, por todas sus enseñanzas, comprensión, apoyo y sobre todo gran paciencia al conducirme en la realización de este proyecto.

A la candidata a Dra. Deyamira Matuz Mares, por ser mi mentora, ya que sus comentarios y apoyo en la realización de este trabajo siempre fueron muy importantes.

Al candidato a Dr. Héctor Vázquez Meza, por sus observaciones y comentarios tan atinados, y sobre todo por la amistad y todos los momentos que hicieron más ameno este trabajo.

A la Dra. Martha Zentella, por la paciencia y por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio a su cargo.

Al Dr. Enrique Piña, por todos los comentarios y sugerencias que enriquecieron de manera muy importante este trabajo y mi desarrollo tanto personal como profesional.

Al MVZ. Enrique Moreno por el apoyo en la manipulación de los animales y por la amistad brindada durante todo este tiempo.

Al Dr. Oscar Flores y al Dr. Juan Pablo Pardo quienes contribuyeron de manera muy importante en la determinación de la actividad enzimática.

A la Dra. Emma Saavedra y la M en C. Viridiana Olin por todo el apoyo brindado en la validación por HPLC, del método para determinar glutatión.

A la Dra. Raquel Guinzberg y a la Dra. Magdalena Vilchis por sus comentarios que siempre fueron bien recibidos para enriquecer este trabajo.

A la Dra. Beatriz Vázquez Cruz y al Dr. Rafael Villalobos Molina por sus consejos y su dedicación en cada uno de mis tutoriales, siempre dispuestos a mejorar este trabajo.

Al Dr. Guillermo Robles Díaz y al Dr. Jesús Aguirre Linares por su dedicación en la revisión de esta tesis.

A la Dr. Susana Gutiérrez por sus consejos para mejorar este trabajo.

Dedicatoria

A mi madre amorosa, que es un ejemplo de vida para mi, le agradezco infinitamente todo el apoyo incondicional que me ha brindado siempre.

A Gilda, mi novia hermosa por tu comprensión, paciencia, consejos y tantos bellos momentos de felicidad que hemos compartido juntos.

A mis queridos hermanos, Emmanuel, Carlos y Oswaldo, por todo su apoyo.

A mi querida familia, todos ellos son parte de mis logros.

A la familia De La Rosa Cuevas, por su apoyo incondicional y ser como mi segunda familia.

A todos mis amigos, de los cuales afortunadamente la lista es larga y prefiero no comenzarla, ya que no me perdonaría cometer omisiones.

CONTENIDO	PAGINAS
INDICE	I
Lista de abreviaturas	1
Resumen	4
Abstract	6
Introducción	7
Antioxidantes	7
Antioxidantes Enzimáticos	8
Antioxidantes no Enzimáticos	11
Glutación	15
Estructura	16
Propiedades físico-químicas	17
Síntesis y Regulación	18
Glutamato cisteína ligasa	20
Degradación del Glutación y ciclo del γ -glutamilo	22
Precusores del Glutación	25
Transporte del Glutación	27
Localización del Glutación	31
Funciones fisiológicas del Glutación	33
Papel antioxidante del Glutación: Ciclo Redox	35
Hígado	37
Alcoholismo (aspectos históricos)	40

Alcohol	43
Absorción	46
Metabolismo del alcohol	48
Sistema de las alcohol deshidrogenasas (ADH's).	51
Sistema microsomal oxidante del etanol	53
Catalasa	55
Oxidación no enzimática del etanol	56
Sistema de las aldehído deshidrogenasas.	57
Otros sistemas oxidantes	58
Radicales Libres	58
Clases	59
Génesis	60
Fuentes endógenas	60
Fuentes exógenas	65
Anti-inflamatorios	66
Aspirina	67
Piroxicam	68
Antecedentes	70
Hipótesis	73
Objetivos	73
Materiales y Métodos	74
Resultados	80

Discusión	102
Conclusiones	109
Bibliografía	111

LISTA DE ABREVIATURAS

4-NHE	4-hidroxi-2-nonenal
AC	Área centrolobular
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADP	Adenosina difosfato
AINE'S	Anti-inflamatorios no esteroideos
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AOX	Antioxidantes
AO	Aldehído oxidasa
AP-1	Proteína activadora 1
ARE	Respuesta antioxidante
ATP	Adenosina-trifosfato
BAC	Concentración de alcohol en sangre
BSO	Butionina sulfoximina
CFTR	Regulador transmembranal de la fibrosis quística
COX	Ciclooxigenasa
CONADIC	Consejo Nacional Contra las Adicciones
CYP2E1	Citocromo P450
DEM	Dietilmaleato
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DSM	Manual de diagnóstico estadístico

EP	Espacio periportal
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
EtOH	Etanol
γ -GCS	γ -glutamilcisteín sintetasa
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GCLC	Glutamato cisteína ligasa subunidad catalítica
GGT	γ -glutamyltranspeptidasa
GR	Glutación reductasa
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación reducido
GSH(X)	Conjugado de glutación
GSSH	Glutación oxidado
GSH-Px	Glutación peroxidasa
GT	Glutación total
HSL	Lipasa sensible a hormonas
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAOS	Sistema microsomal oxidante del acetaldehído
MEOS	Sistema microsomal oxidante del etanol
MRE	Respuesta de metales
MRP	Proteína asociada a la resistencia de multidrogas
NAC	N-acetilcisteína
NAD ⁺	Nicotinadenína dinucleótido

NADH	Nicotinadenína dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinadenína dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinadenína dinucleótido fosfato reducido
NOX	NADPH oxidasa
NFκB	Factor nuclear kappa B
OATP	Péptidos transportadores de aniones orgánicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PKA	Proteína cinasa A
RKH	Ringer-Krebs-Henseleit
RL	Radicales libres
SOD	Superóxido dismutasa
SP-1	Proteína de especificidad 1
TBARS	Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terbutilhidroquinona
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XOR	Xantina óxidoreductasa

Resumen

El glutatión (*GSH*) es considerado como el principal tiol no proteico intracelular en plantas y animales. De la amplia gama de funciones descritas para el glutatión, la más importante es la que desempeña como antioxidante intracelular, ya que actúa como atrapador de radicales libres y como cofactor de diferentes enzimas antioxidantes. El hígado, es uno de los órganos con mayor contenido de *GSH* y desempeña un papel central en la compleja homeostasis de dicho tiol, a tal grado que el 90% del *GSH* presente en el plasma proviene del hígado. Por otro lado, esta bien documentado que una intoxicación aguda con etanol causa un estado de estrés oxidativo en hígado, ya que durante el metabolismo del etanol se producen especies reactivas de oxígeno. Actualmente se sabe que el etanol administrado tanto *in vivo* como *in vitro* produce un decaimiento en la poza de glutatión. Por otro lado, algunos trabajos han reportado que *in vivo* el etanol disminuye la actividad de la enzima glutamato cisteína ligasa (*GCL*). Recientemente estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que el etanol 50 mM disminuye los niveles de glutatión total (*GT*) en hepatocitos aislados. Sin embargo, este decaimiento se evitó cuando los hepatocitos se incubaron simultáneamente con AINE's como la aspirina, piroxicam y meloxicam (Hernández, Tesis Licenciatura, FES Iztacala, UNAM, 2006). Por ello, el objetivo de este trabajo fue obtener información que nos ayude a entender el mecanismo a través del cual los AINE's (aspirina y piroxicam) evitan el decaimiento de la poza de glutatión provocado por el etanol.

En hepatocitos aislados de ratas ayunadas se encontró una disminución del 40% en los niveles de *GT* en comparación con hepatocitos aislados de ratas alimentadas; esta disminución se acentúa después de 60 min de incubación en Ringer-Krebs-Henseleit. En contraste, al incubar los hepatocitos en presencia de los aminoácidos se observa que los niveles de *GT* no se modificaron, lo que sugiere que los aminoácidos actúan como precursores de la síntesis de *GSH*, permitiendo mantener constante el contenido de *GT* durante el periodo de incubación. En presencia de etanol los niveles de *GT* de los hepatocitos aislados disminuyen significativamente; sin embargo cuando se incubaron simultáneamente con aspirina y piroxicam, el efecto del etanol no se observó. Para determinar si estos últimos resultados son debidos a alteraciones en la síntesis de *GSH*, se estudio el efecto de los AINEs, etanol y su principal producto, el acetaldehído, sobre la actividad de la *GCL*. En una fracción citosólica de hígado de rata, la actividad de la *GCL* mostró una cinética Michaeliana, con valores de K_M y V_{max} , semejantes a los reportados previamente (Seeling y Meister, 1985). En presencia de etanol [10–100mM] o acetaldehído [0.001-1mM] no se observaron cambios en la actividad de la enzima *GCL*. Los AINE's aspirina y piroxicam tampoco tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima en un rango de $[10^{-8}–10^{-4}M]$. El peróxido de hidrógeno, en un rango de concentraciones de [1-100 μ M], no modifica *in vitro*, la actividad de la *GCL*. Estos resultados descartan un efecto directo del etanol y el acetaldehído sobre la actividad de la *GCL* y sugieren que la disminución de la actividad enzima observada *in vivo*, es una consecuencia indirecta del metabolismo del etanol, efecto que es revertido por los AINE's. Sin embargo en

ratas intoxicadas en forma aguda con etanol (5g/kg peso), el eflujo de glutatión desde el hígado hacia el torrente sanguíneo, aumenta dos veces con respecto a los animales control. La glibenclamida, un inhibidor de los canales *CFTR*, inhibe completamente la salida de glutatión estimulada por etanol. El piroxicam, a una dosis de 10 mg/kg peso, inhibe también la salida de glutatión estimulada por etanol. Así, se puede concluir que el mecanismo por el cual los AINE's evitan la disminución del glutatión hepático en animales intoxicados con etanol, se debe principalmente a una disminución en el eflujo de glutatión.

Abstract.

Glutathione (GSH) is considered as the major intracellular non-protein thiol in plants and animals. A wide range of functions has been described for GSH; the most important is as intracellular antioxidant, it acts as free radical trapping and as cofactor of several antioxidant enzymes. Liver is one of the organs with higher GSH content, it therefore plays a central role in the complex homeostasis of such thiol; indeed, 90% of GSH present in the plasma is produced by the liver. By other side, is well documented that acute ethanol intoxication produces oxidative stress in the liver, as reactive oxygen species are generated as a consequence of ethanol metabolism. Ethanol administered both, *in vivo* and *in vitro* induces a decrease in the pool of glutathione. Some reports indicate that ethanol *in vivo* decreases the activity of glutamate cysteine ligase (GCL). Recently, we reported that ethanol 50 mM decreases the levels of total GSH in isolated hepatocytes. Furthermore, this decrease was avoided if isolated hepatocytes were incubated simultaneously with NSAIDs such as aspirin, piroxicam and meloxicam (Hernández, Tesis Licenciatura, FES Iztacala, UNAM, 2006). Therefore, in this work we look for additional insights to understand the mechanism through which NSAIDs (aspirin and piroxicam) prevent the decrease of the glutathione pool caused by ethanol.

Isolated hepatocytes from fasted rats showed a 40% decrease in total GSH pool in comparison to isolated hepatocytes from fed rats; after 60 minutes of incubation in Krebs-Ringer-Henseleit. In contrast, hepatocytes incubated in the presence of amino acids showed no change in total GSH pool, indicating that amino acids are used as precursors for GSH synthesis, maintaining a constant amount of GSH during the incubation period. Presence of ethanol significantly decreased levels of GSH in isolated rat hepatocytes, however when incubated simultaneously with aspirin and piroxicam, the effect of ethanol was not observed. To determine whether these results are due to changes in the synthesis of GSH, we examined the effect of NSAIDs, ethanol and its main product, acetaldehyde, on the activity of the GCL. In a cytosolic fraction from rat liver, the activity of the GCL showed a Michaelis-Menten kinetic with K_m and V_{max} values similar to those reported previously (Seeling and Meister, 1985). In presence of ethanol (10 to 100 mM) or acetaldehyde (0.001 mM - 1 mM), no changes were observed in the of the enzyme activity GCL. The NSAIDs aspirin and piroxicam also had no effect on the enzyme activity in a range of $[10^{-8}$ - 10^{-4} M]. Hydrogen peroxide in a concentration range of $[1$ - 100μ M] don't modify the activity of the GCL *in vitro*. These results exclude a direct effect of ethanol and acetaldehyde on GCL activity, and suggest that the decreased activity observed *in vivo* is an indirect consequence of the metabolism of ethanol, which is increased by NSAIDs. However, in rats acutely intoxicated with ethanol 5 g/kg weight, the efflux of glutathione from the liver to the bloodstream, increases two times compared with control animals. Glibenclamide, a CFTR channel inhibitor, completely inhibits glutathione release stimulated by ethanol. Piroxicam, at a dose of 10mg/kg weight, inhibits the output of glutathione stimulated by ethanol. Thus, we conclude that the mechanism by which NSAIDs

prevent the decrease of hepatic glutathione in animals intoxicated with ethanol, is mainly due to a decrease in the efflux of hepatic glutathione.

INTRODUCCIÓN

ANTIOXIDANTES.

La maquinaria celular está produciendo continuamente especies reactivas del oxígeno (*ERO*) durante los procesos metabólicos. En consecuencia necesita de sistemas de contención de estos prooxidantes. La célula ha desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes, que recibe el nombre genérico de antioxidantes (*AOX*) (Yu, 1994; Alarcón, 2001). Halliwell y Gutteridge (1995), definieron antioxidante como: "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato". También pueden definirse como aquellas moléculas que previenen la formación descontrolada de *ERO*, o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

Muchos de los *AOX* son enzimas o nutrientes esenciales, o bien que incorporan nutrientes esenciales en la estructura de sus moléculas (Machlin y Bendich, 1987), entendiendo como nutriente esencial a aquel compuesto que debe ser ingerido porque el organismo es incapaz de sintetizarlo en cantidades adecuadas. Esta característica se puede tomar para clasificar los *AOX* en enzimáticos y no enzimáticos (Larkins, 1999; Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

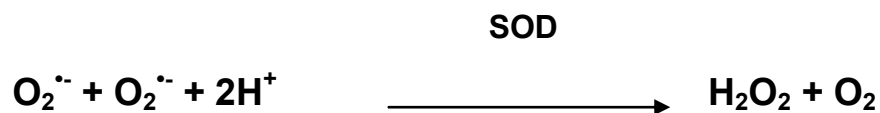
Otro criterio de clasificación se basa en el mecanismo mediante el cual los *AOX* ejercen su acción protectora, agrupándolos en aquellos que cumplen una función preventiva en la formación de los radicales libres (*RL*), y en aquellos que interceptan o capturan los que ya se han producido. También es posible clasificarlos conforme a su localización, ya sea en intracelulares o extracelulares (Larkins, 1999).

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.

La función antioxidante desempeñada por enzimas puede presentar ventajas frente a los compuestos AOX, en el sentido de que su actividad es regulada acorde con los requerimientos celulares: pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectores endógenos (Harris, 1992). El grupo de antioxidantes enzimáticos cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los *RL*. Posteriormente los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del *NADPH* producido en las diferentes vías metabólicas (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). Frente a una exposición prolongada de *ERO* puede ocurrir una disminución en la concentración del *NADPH*, necesario en otros importantes procesos fisiológicos, a pesar de que algunos AOX enzimáticos no consumen cofactores (Miller *et al*, 1993).

Las superóxido dismutasas.

Son un conjunto de metaloproteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Están presentes en todas las células que utilizan oxígeno en su metabolismo, incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan, 1989). Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich, (1969). La superóxido dismutasa (*SOD*) transforma el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 , constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord *et al*, 1974; Fridovich, 1978).



La catálisis de la reacción de dismutación es espontánea, pero llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa, se incrementa la velocidad en 10,000 veces (Fridovich, 1974).

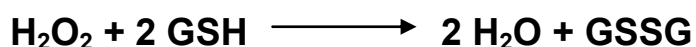
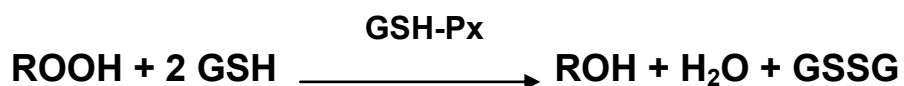
En las células de mamífero existen tanto las isoformas ligadas al cobre (*SOD-Cu*) y zinc (*SOD-Zn*), como las isoformas ligadas al manganeso (*SOD-Mn*) (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). Las isoformas *SOD-Cu* y *SOD-Zn* se localizan en citoplasma y núcleo, y a escala tisular existen en gran concentración en el hígado, cerebro y testículos, y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas. Extracelularmente aparece otra isoforma ligada al cobre y zinc (*EC-SOD*), caracterizada por su gran peso molecular (Marklund *et al*, 1982). Aunque esta isoforma es detectable en plasma, se localiza principalmente en la matriz extracelular, probablemente para interceptar el daño causado por el $O_2^{\cdot-}$ que liberan neutrófilos y macrófagos al ejercer su función (Fridovich, 1997).

La isoforma ligada a manganeso en mamíferos se localiza, mayoritariamente, en la matriz mitocondrial (Weisger y Fridovich, 1973; Kinnula *et al*, 1995) y en menor medida en el citosol. Su presencia en la mitocondria es de gran importancia, puesto que la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de *RL* en las células (Poyton *et al*, 2009).

Las glutatión peroxidasas.

Son las principales enzimas eliminadoras de peróxidos alquílicos y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se trata también de enzimas que se comportan como antioxidantes primarios. Convierten el H_2O_2 y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance *et al*, 1979). Hay dos tipos de glutatión peroxidasas (*GSH-Px*), y ambas requieren glutatión reducido como donador de equivalentes reductores (Powers y Lennon, 1999).

Por un lado está la glutatión peroxidasa selenio/dependiente (Stadman, 1996), es una proteína tetramérica con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción del H_2O_2 y peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986; Holben y Smith, 1999; Arthur, 2000). Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom *et al*, 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).



Por otro lado, la glutatión peroxidasa no dependiente de selenio sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). La mayor parte de la actividad de glutatión peroxidasa esta en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

La catalasa.

La catalasa fue una de las primeras enzimas en ser aislada en forma altamente purificada, y su cristalización (Summer y Dounce, 1937), a partir de extractos de hígado marco todo un hito en la historia de la bioquímica (Schonbaum y Chance, 1976).

La catalasa es un enzima tetramérica con un grupo hemo en cada subunidad. El gen de la catalasa humana ha sido localizado en el cromosoma 11 (Goth y Pay, 1996). Se encuentra en todos los organismos aeróbicos y todo indica que su función es degradar rápidamente peróxido de hidrógeno. La catalasa es uno de los catalizadores más activos producidos por la naturaleza. Es única entre las

enzimas que degradan H_2O_2 porque lo hace de una manera muy eficiente, por ello se ha propuesto como sistema regulador de la homeostasis de peróxido de hidrógeno en la célula (Escarabajal, 2000).



También es capaz de catalizar ciertas reacciones de oxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Aruoma *et al*, 1989). En general las bajas concentraciones de peróxido generado dentro de la célula son preferentemente catalizadas por la catalasa (Yu, 1994).

ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS.

Los AOX no enzimáticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrofílicas y lipofílicas que capturan *RL* y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. El mecanismo involucrado es la donación de un electrón a un *RL* con el fin de estabilizarlo (Larkins, 1999).

Los AOX no enzimáticos lipofílicos se localizan en las membranas celulares y lipoproteínas, y algunos de ellos son: β -caroteno (precursor de la vitamina A), y algunas sustancias llamadas carotenoides como el α -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina entre otras.

Bajo el nombre de Vitamina *E* se engloba una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles, de los cuales, el α -tocoferol es el más activo y abundante. En el organismo existen 4 tipos principales de tocoferoles: α , β , γ y δ tocoferol. Estos compuestos, altamente lipofílicos, tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas, actuando como

antioxidantes del organismo, en cuanto a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación (Pryor, 2000).

El ácido lipoico es un tiol endógeno que sirve como cofactor de los complejos α -deshidrogenasa. Normalmente el ácido lipoico está presente en pequeñas cantidades (5-25nmol/g) en los tejidos animales. Una vez adquirido a partir de la dieta, éste se reduce a ácido dihidrolipoico (*DHLA*), que participa en la regeneración de antioxidantes fisiológicos, tales como la vitamina *E*, el ascorbato y el *GSH* (Packer *et al*, 1995).

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el ser humano y otros primates, ya que carecen de la enzima uricasa, la cual hace que continúe la degradación hasta alantoína y urea. El ácido úrico no parece ser simplemente un producto de desecho de una vía metabólica, de hecho, su concentración en el plasma se ha correlacionado positivamente con la esperanza de vida en distintas especies (Cutler, 1984). Se ha demostrado, *in vivo*, su papel como un agente antioxidante ubicuo, aunque en algunos casos sólo en presencia de otros antioxidantes, como la vitamina C (Aruoma y Halliwell, 1989). Neutraliza radicales hidroxilo, oxígeno singulete, oxidantes oxohemoglobínicos, radicales hidroperóxidos y ácido hipocloroso (Becker, 1993). Además, el ácido úrico es capaz de formar complejos estables en proporción 2:1 con iones férricos, actuando como protector contra la oxidación catalizada por el hierro (Davies *et al*, 1986).

Los carotenoides, colorantes que se aíslan principalmente de las plantas, poseen una pronunciada actividad antioxidante. Otros compuestos de interés son los flavonoides que constituyen una familia muy extensa de antioxidantes polifenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas), que actúan como potentes quelantes de metales y atrapadores *in vitro* de *ERO* y especies reactivas del nitrógeno (*ERN*). Pueden ser liposolubles o hidrosolubles y se localizan tanto intra como extracelularmente (Larkins, 1999).

Los AOX no enzimáticos hidrófilicos se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y núcleo, así como en fluidos extracelulares, entre ellos esta la vitamina C, ácido úrico, ergotioneína, flavonoides polifenólicos y glutatión (Chihuailaf *et al*, 2002).

La vitamina C o ácido ascórbico, es una molécula hidrosoluble y quizá la menos tóxica de entre los antioxidantes naturales hidrofílicos (Bendich *et al*, 1986). Se encuentra en alta concentración en muchos tejidos, el plasma contiene alrededor de 60µmol/L. Los humanos, otros primates superiores y los cobayos no poseen una de las enzimas imprescindibles para su síntesis, teniendo que adquirirla a partir de la dieta. Es capaz de ceder dos electrones transformándose en dihidroascorbato, que será reciclado a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa. Por ello, el dihidroascorbato esta en concentración mucho menor que el ascorbato. Reacciona con numerosas especies reactivas, como el radical $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) y el oxígeno singulete. En solución acuosa también puede reaccionar con *ERN*, previniendo la nitración de moléculas blanco. Por otro lado, es capaz de regenerar la forma oxidada de la vitamina E.

Existen transhidrogenasas, como la glutarredoxina, capaces de reducir el ácido dihidroascórbico utilizando al glutatión reducido como donador de electrones, por lo que el glutatión contribuye a mantener alta la concentración de vitamina C y viceversa, ésta puede actuar como ahorradora de glutatión en caso necesario (Meister, 1994).

La N-acetilcisteína (*NAC*), aunque no es un antioxidante propiamente dicho, genera cisteína que participa en la síntesis de glutatión (Prescott *et al*, 1977) que, como hemos comentado anteriormente, tiene como principal función la protección de los tejidos frente al daño oxidativo (Kosower y Kosower, 1978).

La ergotioeína llega a las células de los mamíferos vía la ingesta de vegetales. Es un poderoso atrapador de *ERO* producido por acción de la mieloperoxidasa en neutrófilos. Puede reaccionar con peroxinitritos, así como sus derivados y capturar iones hidroxilo. Sus estados oxidados intermedios son rápidamente regenerados en presencia de ascorbato (Powers y Lennon, 1999).

El glutatión es un tripéptido intracelular con diversas funciones que incluyen la detoxificación, el mantenimiento de grupos tiol, la modulación de la proliferación celular, pero sobre todo, en la defensa antioxidante, ya que tiene propiedades químicas que le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como el H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$ (Yu, 1994), además, reduce el radical tocoferoxilo y deshidroascorbato reconvirtiéndolos a su forma reducida (Powers y Lennon, 1999; Zentella de Piña y Saldaña, 1996), su importancia dentro del contexto de este trabajo es tal, que será revisado con más detalle en la siguiente sección.

En la Figura 1 se indica la distribución intracelular de las diferentes moléculas y enzimas antioxidantes presentes en las células de mamíferos.

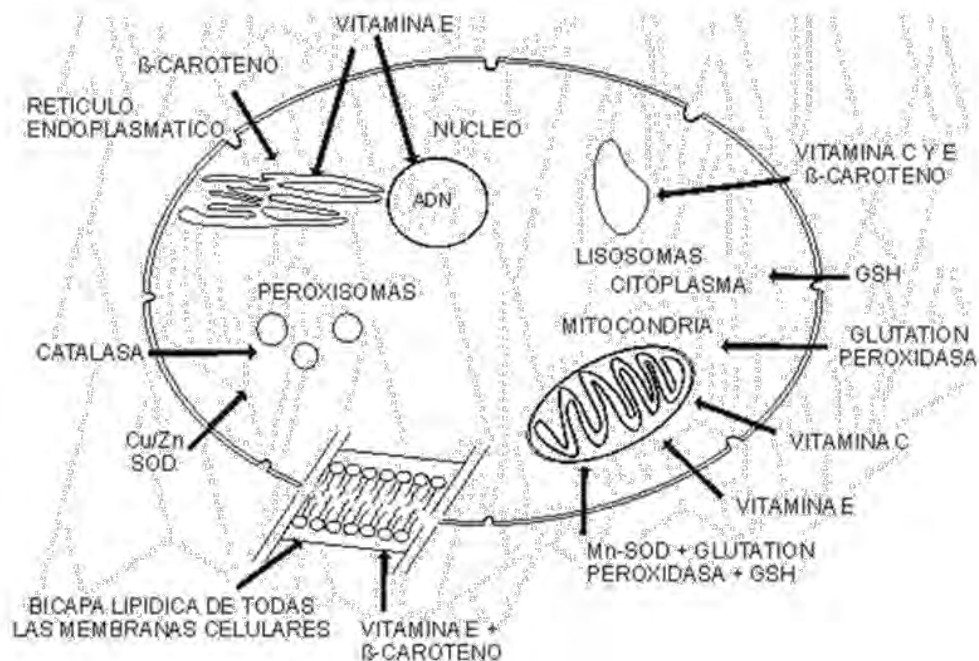


Figura 1. Distribución de moléculas antioxidantes dentro de la célula (Modificado de Machlin y Bendich, 1987).

EL GLUTATIÓN.

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos (Meister y Anderson, 1983). Su concentración intracelular es tan elevada como la concentración de glucosa, que es de las moléculas más comunes dentro de las células (Viña *et al*, 1978). Fue descubierto en el siglo XIX por deRey-Pailhade (1888) en Montpellier, Francia. Su estructura fue estudiada por Hopkins, que pensaba que era un dipéptido compuesto de glutamato y cisteína. Harington y Mead (1935), describieron finalmente la estructura correcta de la molécula: γ -glutamil cisteinil glicina. El nombre de glutatión se lo designó Hopkins en 1921.

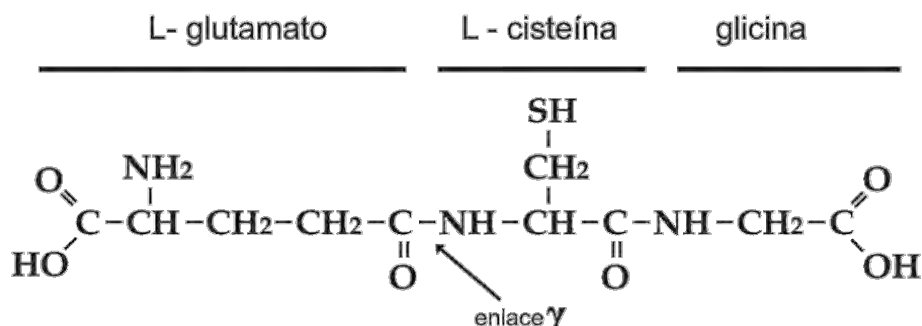
El glutatión está presente en la mayoría de los organismos eucariotes, con excepción de aquellos que no tienen ni mitocondrias ni cloroplastos (Masip *et al*, 2006), pero su producción entre organismos procariotes está restringida a cianobacterias, proteobacterias, bacterias púrpura (Fahey y Sundquist, 1991;

Riveros-Rosas *et al*, 2003; Smirnova y Oktyabrsky, 2005; Masip *et al*, 2006), bacterias gram-negativas (*Escherichia coli*), así como en algunas variedades de bacterias gram-positivas (*Streptococcus* y *Enterococcus*) (Smirnova y Oktyabrsky, 2005). Recientemente se ha demostrado que algunos protozoos, del tipo de las amebas de vida libre (*Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba polyphaga*), tienen la capacidad de sintetizar glutatión (Ondarza *et al*, 2002; Ondarza *et al*, 2006). Hasta el momento sólo en algunos grupos de eubacterias y archaeobacterias no se ha encontrado glutatión (Masip *et al*, 2006).

Estructura del glutatión.

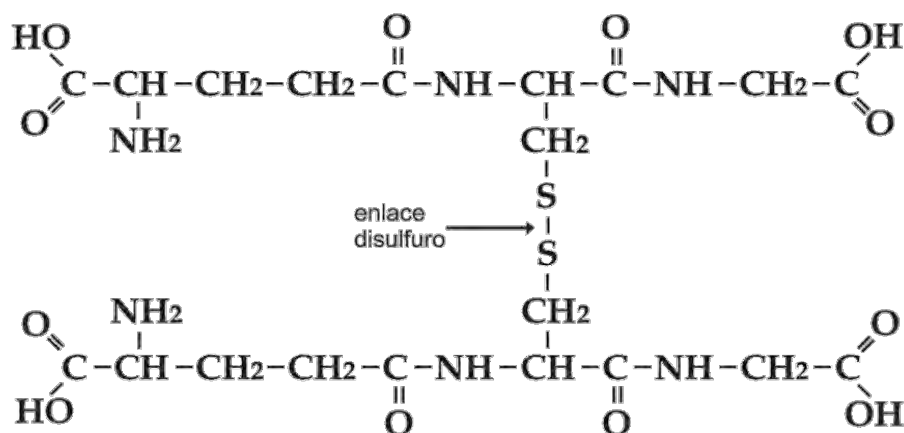
Tiene numerosas e importantes funciones fisiológicas y metabólicas que se derivan de su peculiar estructura (Viña *et al*, 1990):

- 1.- Presenta un grupo tiol libre (-SH) que corresponde al aminoácido de cisteína, que es el que interviene en las reacciones redox del glutatión.
- 2.- Posee un enlace peptídico muy particular con el γ -glutamilo, que le confiere alta resistencia para no ser degradado por las peptidasas de la célula. En la actualidad, sólo se conoce una enzima capaz de hidrolizar este enlace, la γ -glutamil transpeptidasa, que está situada en la cara externa de la membrana celular (Viña *et al*, 1992^a).



Glutatión reducido (GSH).

El glutatión se puede encontrar principalmente de dos formas, según su estado de óxido-reducción: como glutatión reducido (*GSH*), o como glutatión oxidado (*GSSG*). El *GSSG* está compuesto por dos moléculas de *GSH* unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas. ¹



Glutatión Oxidado (GSSG).

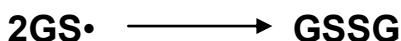
Propiedades físico-químicas del glutatión.

El glutatión, gracias a su grupo tiol, puede intervenir en reacciones de tipo redox intercambiando electrones a través del azufre en la cisteína de su estructura (Kosower y Kosower, 1978). Por ello, puede actuar de las siguientes formas:

1.- Reacción directa con un radical libre.

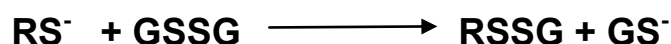
El *GSH* reacciona con un radical libre formándose el radical *GS•*. Este radical es estable y persiste hasta encontrar otro radical *GS•* y formar una molécula de *GSSG*.

¹El glutatión se puede encontrar en una tercera forma, unido a proteínas o moléculas glutatióniladas (Pajares *et al*, 1992^a; Sies, 1999).



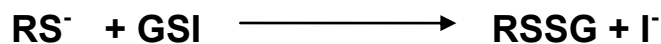
2.- Intercambio tiol – disulfuro.

Puede reaccionar estando en forma oxidada con otro tiol uniéndose una molécula de glutatión al tiol formando **GS⁻**.



3.- Oxidación dieléctrica.

Se produce a través de la formación de un intermediario, seguida por la sustitución de una molécula adecuada. Este mecanismo es uno de los empleados para disminuir el *GSH* de forma no enzimática:



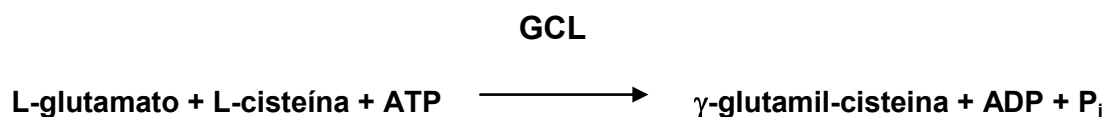
Síntesis y Regulación del glutatión.

El hígado es uno de los órganos con más alto contenido de glutatión y único en dos aspectos de síntesis. El primero, es que el hepatocito es el único que tiene la capacidad de convertir metionina a cisteína a través de la transulfuración. El segundo es el balance que hay en la taza de exportación al plasma, la bilis y a la

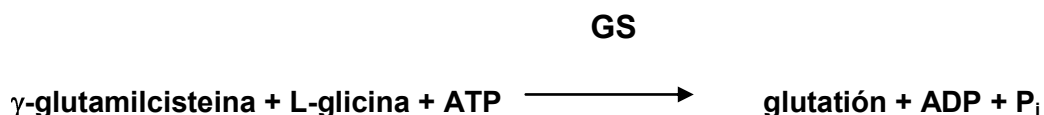
mitocondria por distintos sistemas transportadores; estos transportadores mantienen la poza mitocondrial ya que ésta última no lo puede sintetizar, aunque la poza puede ser alterada en ratas alimentadas con etanol y provocar una caída del glutatión mitocondrial (Fernández-Checa *et al*, 1992).

El glutatión es sintetizado a partir de sus aminoácidos precursores en el citosol de prácticamente todas las células (DeLeve y Kaplowitz, 1991; Meister, 1988). Los aminoácidos requeridos para esta síntesis son L-glutamato, L-cisteína y L-glicina y se requiere de dos moléculas de *ATP* en la reacción (Lu, 1999).

En la síntesis de *GSH* intervienen dos enzimas. La primera es la γ -glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS) o glutamato cisteína ligasa (*GCL*), que da lugar al dipeptido γ -glutamil-cisteína a partir de L-glutamato y L-cisteína. En situaciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de *GSH* es la disponibilidad de cisteína (Tateishi *et al*, 1974; Tateishi *et al*, 1977). La síntesis de glutatión está regulada por retroalimentación, ya que el *GSH* inhibe la *GCL* (Richman y Meister, 1975; Seelig *et al*, 1984).



El segundo paso de la síntesis de *GSH* está catalizado por la glutatión sintetasa (*GS*), que une la L-glicina con la cisteína, formando así γ -glutamil-cisteína. La enzima glutatión sintetasa se compone de dos subunidades idénticas y no está sujeta a inhibición por retroalimentación (Oppenheimer *et al*, 1979). En el riñón de la rata se glicosila, pero el papel de la glicosilación de la enzima en la regulación de su actividad es desconocido (Oppenheimer *et al*, 1979; Lu, 1999).



Glutamato cisteína ligasa.

La enzima *GCL* se compone de una subunidad catalítica pesada de 73 *kDa* y de una subunidad reguladora ligera de unos 30 *kDa*, que son codificadas por diferentes genes en humanos y en ratas (Gipp *et al*, 1992; Huang *et al*, 1993). La subunidad catalítica se inhibe por retroalimentación ejercida por el *GSH* (Richman y Meister, 1975; Seelig *et al*, 1984). La regulación fisiológica de la actividad de la *GCL* recae en la disponibilidad de L-cisteína (Tateishi *et al*, 1974; Tateishi *et al*, 1977) y en la inhibición que ejerce el *GSH* sobre la enzima (Meister, 1988; Lu, 1999). La concentración de la cisteína intracelular se acerca a la *Km* de la *GCL* (de 0.1 a 0.3mM en humanos y ratas), mientras que el nivel de glutamato es varias veces mayor que el valor de *Km* de la *GCL* para el glutamato [1.8mM] (Lu *et al*, 1992). Así el nivel de cisteína determina la tasa de síntesis en condiciones fisiológicas.

Es importante señalar que ambas subunidades de la *GCL* son reguladas, a nivel transcripcional, por el estrés oxidativo (Lu, 1999), y numerosos agentes que inducen estrés oxidativo como el H_2O_2 , las quinonas, las radiaciones ionizantes, el *TNF- α* o el 4-hidroxi-2-nonenal (4-*HNE*), elevan la actividad de la *GCL* así como la transcripción de la subunidad pesada de la enzima (Cai *et al*, 1997; Lu, 1999). La transcripción de la subunidad ligera de la *GCL* está también incrementada en respuesta de terbutilhidroquinona (*TBHQ*) o de 4-*HNE* (Cai *et al*, 1997; Lu, 1999). Además, el 4-*HNE* es capaz de estabilizar el *mRNA* de las dos subunidades de la *GCL* (Liu *et al*, 1998).

La elevación de la transcripción de ambas subunidades de la *GCL* por el estrés oxidativo está mediada por diferentes factores de transcripción; sin embargo, muchos estudios se han enfocado en la regulación transcripcional de la subunidad catalítica de la *GCL* (*GCLC*) al nivel del promotor. Las regiones 5' han sido clonadas en las subunidades de la *GCL* tanto en humano como en ratas (Mulcahy y Gipp, 1995^b; Mulcahy *et al*, 1997; Galloway *et al*, 1997; Moinova y Mulcahy, 1998; Hudson y Kavanagh, 2000; Yang *et al*, 2001; Solis *et al*, 2002; Yang *et al*, 2005^b). En consenso, el factor nuclear *kappa* B (*NF κ B*), la proteína de especificidad-1 (*SP-1*), la proteína activadora-1 (*AP-1*), la proteína activadora-2 (*AP-2*), la respuesta de metales (*MRE*), la respuesta antioxidante (*ARE*), y la respuesta electrofílica, son elementos que se han identificado en promotores humanos de la *GCLC*. Algunos estudios han identificado un elemento proximal (≈ 263 a ≈ 269 Pb), que es crítico en la mediación del efecto del estrés oxidativo, induciendo un incremento en la transcripción de la *GCLC* humana (Morales *et al*, 1997; Morales *et al*, 1998; Rahman *et al*, 1996; Rahman *et al*, 1998; Sekhar *et al*, 1997^b).

La regulación hormonal de la expresión de la *GCL* tiene una especial relevancia fisiológica. La fenilefrina, el glucagón, o el dibutiril *AMPc* inhiben la actividad de la *GCL*, que hace disminuir la síntesis de glutatión y conlleva la disminución de glutatión en hepatocitos de rata (Estrela *et al*, 1988; Lu *et al*, 1991). La pérdida de la actividad de la *GCL* inducida por estas hormonas de estrés está mediada por la fosforilación de la subunidad catalítica, debida a la activación de la proteína cinasa A y la proteína cinasa C (Sun *et al*, 1996). De esta manera, la respuesta al estrés disminuye la síntesis de *GSH*, incrementándose la disponibilidad de cisteína para la síntesis de proteínas de estrés (Lu, 1999).

Contrastando con esta respuesta aguda, la insulina o la hidrocortisona necesitan varias horas para incrementar la actividad de la *GCL* y, por tanto, para elevar los niveles de glutatión en los hepatocitos de rata (Lu *et al*, 1992). En estos casos, el

incremento de la *GCL* está mediado por un aumento en la transcripción del gen que codifica la subunidad catalítica de la enzima. Así, estas hormonas se requieren para la expresión normal de la *GCL* y el mantenimiento de los niveles de *GSH*, pero la regulación de los niveles de glutatión durante el estrés parece que ocurre en dos fases: al principio algunas hormonas de estrés como el glucagón o la fenilefrina, disminuye el glutatión a corto plazo, y después otras hormonas de estrés como el cortisol, repone el glutatión a mediano y largo plazo. Hay una inducción coordinada de las subunidades de *GCL* y de la glutatión sintetasa por los agentes que disminuyen la poza de glutatión, como es el dietilmaleato (*DEM*), la butionina sulfoximina (*BSO*) o *TBHQ* (Huang *et al*, 2000).

Además, el factor de transcripción *AP-1* se requiere para la inducción coordinada de la *GCL* y de la glutatión sintetasa (Yang *et al*, 2002). En el carcinoma hepatocelular, se ha descrito un incremento en los niveles de *mRNA* de la subunidad catalítica y de glutatión sintetasa, que conlleva un nivel alto de glutatión. Este nivel alto de glutatión también facilita la proliferación celular (Huang *et al*, 2001).

Degradación del glutatión, ciclo del γ -glutamilo.

Las reacciones que participan en la síntesis y degradación del glutatión constituye el llamado ciclo del γ -glutamilo y fue postulado por Meister a mediados de los 70,s. Tras su síntesis, el glutatión es utilizado o degradado. El catabolismo del glutatión se realiza en parte dentro de la célula y en parte fuera (Figura 2). El glutatión se exporta fuera de la célula por un transportador específico. Comienza entonces la acción de la γ -glutamil transpeptidasa (*GGT*), que cataliza dos reacciones diferentes:

- a) Transpeptidación, en la que el γ -glutamilo se transfiere a un aceptor, que puede ser el mismo *GSH*.
- b) Hidrólisis, en la que se hidroliza el enlace γ -glutamilo.

Los sustratos de la enzima son el *GSH*, el *GSSG*, el *GSH* S-sustituido y otros compuestos del γ -glutamilo (Meister y Anderson, 1983).

La actividad *GGT* se localiza en la superficie externa de las células (Meister y Anderson, 1983). Cuando el *GSH* interacciona con la membrana, la *GGT* forma el γ -glutamil aminoácido, que entra a la célula vía un transportador específico. La γ -glutamil ciclotransferasa hidroliza el γ -glutamil aminoácido, liberando el aminoácido 5-oxo-L-prolina (Meister y Anderson, 1983). La oxoprolinasa cataliza la hidrólisis dependiente de *ATP* de la 5-oxo-L-prolina, liberando glutamato. Una dipeptidasa hidroliza la cisteinilglicina formada por la *GGT* (Meister y Anderson, 1983).

El ciclo de γ -glutamilo postulado por Meister (1973), presentado como un mecanismo de transporte de aminoácidos, tiene algunas peculiaridades: La mayor es de carácter energético, ya que se requieren tres moléculas de *ATP* por cada vuelta del ciclo, de manera que se gastan tres moléculas de alta energía por cada glutatión sintetizado. Existe evidencia que sugiere que el ciclo del γ -glutamilo aparte de explicar la síntesis y degradación del glutatión, también podría actuar como generador de señales que activarían el transporte de aminoácidos hacia el interior de la célula (Viña *et al*, 1989b).

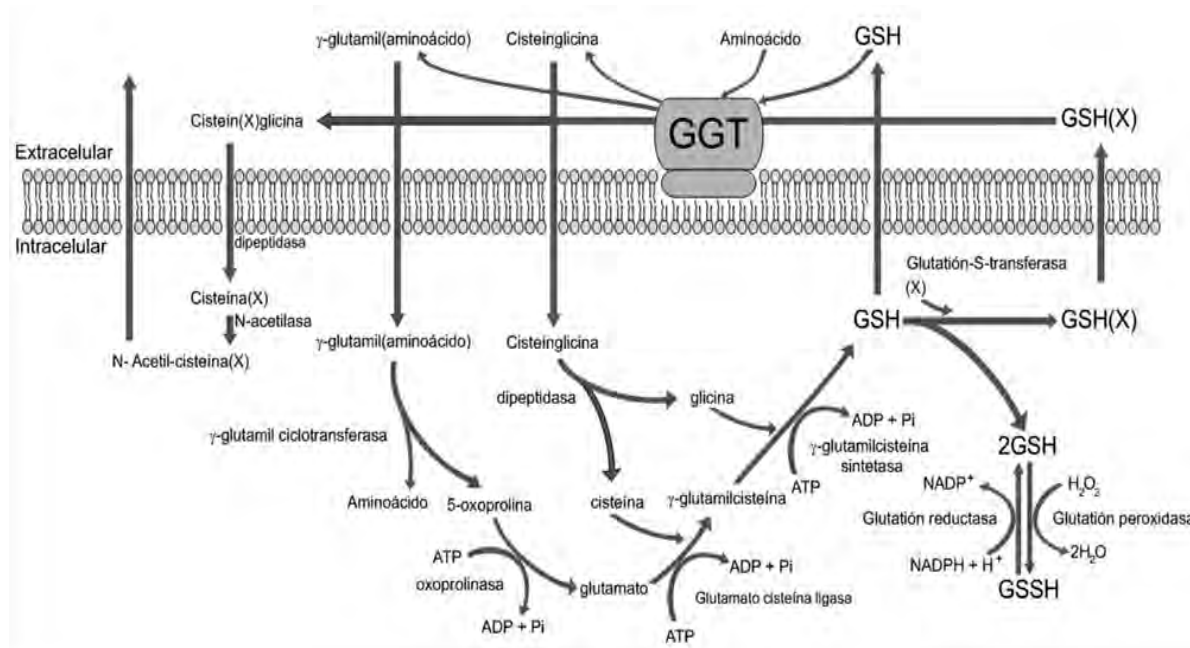


Figura 2. Esquema del ciclo del γ -glutamilo, que comprende las enzimas que sintetizan y degradan glutatión (Modificado de Lu, 2009).

El recambio de glutatión se debe considerar como un proceso multiorgánico. De hecho, en un órgano como el hígado en que la síntesis de glutatión es muy activa, la degradación es muy lenta debido a la baja actividad de la γ -glutamilo transpeptidasa. Sin embargo, en riñón la γ -glutamilo transpeptidasa está muy elevada. Por tanto, el ciclo del γ -glutamilo debe ser considerado como un ciclo multiorgánico en el que la parte sintética sucede principalmente en el hígado, mientras que la parte catabólica sucede principalmente en riñón entre otros órganos (Griffith y Meister, 1979; Haberle *et al*, 1979).

Una importante función del GSH es la detoxificación de xenobioticos (X) y/o de sus metabolitos, estos compuestos forman conjugados con el GSH de manera espontánea o enzimáticamente, en reacciones catalizadas por la glutatión-S-transferasa (Mesiter, 1988). Los conjugados formados son usualmente excretados fuera de la célula o en la bilis como es el caso de los hepatocitos. Los conjugados GSH(X) pueden sufrir una ruptura del enlace γ -glutamilo mediado por la GGT y desprender al conjugado cisteína(X)glicina. La cisteína(X)glicina es hidrolizada por

una dipeptidasa, resultando cisteína(X); posteriormente actúa una N-acetilasa para formar ácido mercaptúrico (N-acetilcisteína(X)) y eliminarse como tal, como se muestra en la figura 2 (DeLeve y Kaplowitz, 1990).

Precusores del glutatión.

La disponibilidad de L-cisteína es el factor limitante para la síntesis de glutatión en condiciones fisiológicas. La cisteína proviene de la dieta, de la proteólisis o es sintetizada a partir de la metionina por medio de la vía de transulfuración (Viña *et al*, 1996).

En la dieta del ser humano, las frutas, cereales y vegetales contribuyen con cerca del 50% del *GSH* aportado, mientras que el consumo de carne contribuye con menos del 25% (Parcell, 2002), por lo que las condiciones nutricionales y los valores de *GSH* se encuentran estrechamente relacionados, al grado de que las condiciones de ayuno inducen una caída del *GSH* del 50% en ratas, lo que subraya la importancia del estado nutricional en la síntesis de *GSH* (Lu, 1999; Videla *et al*, 1982). De hecho, el ayuno durante 48 h produce una marcada disminución de glutatión en hígado y se restaura al alimentarse normalmente (Tateishi y Sakamoto, 1983). Además, el glutatión hepático se relaciona íntimamente con el contenido de cisteína y/o cistina de la dieta.

La cisteína entra en la célula vía transportadores específicos para aminoácidos neutros y es rápidamente transportada en hepatocitos aislados de rata. El transporte es un proceso altamente dependiente de Na^+ , homogéneo y muy similar al sistema de transporte de aminoácidos ASC (Kilberg *et al*, 1981; Franchi-Gazzola *et al*, 1982). Esencialmente no se detectó transporte de cisteína a través del sistema A, incluso en hepatocitos que no presentaban otros aminoácidos en el medio. Por lo tanto se ha propuesto que en hepatocitos de rata, los transportadores dependientes de Na^+ tienen como sustrato específico a la cisteína en el sistema ASC. Sin embargo, el uso de la cisteína como un sustrato específico

de este sistema es limitado, porque la cisteína no es específica para el sistema ASC, por lo que en presencia de inhibidores, se bloquea también el transporte de otros aminoácidos por el sistema A (Bannai, 1984). A pesar que este sistema no se expresa en hepatocitos normales, se induce por la disminución de glutatión causada por agentes electrofílicos (Bannai *et al*, 1989).

La vía de transulfuración ocurre en varios tejidos, pero principalmente en el hígado. Esta vía incluye cinco pasos:

1. Activación de la metionina a S-adenosil metionina
2. Desmetilación
3. Liberación de la fracción S-adenosil para formar homocisteína.
4. Formación de cistationina a partir de homocisteína y serina
5. Ruptura de la cistationina para dar cisteína y β -cetobutirato.

El paso más importante de esta secuencia de reacciones es el primero, que está catalizado por la metionina s-adenosil transferasa, y el último, que es irreversible y está catalizado por la enzima β -cistationasa.

La vía de transulfuración es escasa o incluso ausente en muchas condiciones fisiológicas y patológicas que implican decaimiento de glutatión. Está es bloqueada en la cirrosis hepática, donde la disminución de glutatión se asocia con baja expresión y baja actividad de la metionina adenosiltransferasa, cistationina β -sintasa y β -cistationasa (Horowitz *et al*, 1981; Serviddio *et al*, 2004). El caso de la hiperhomocisteinemia es de especial relevancia clínica debido a la deficiencia en cistationina β -sintasa que conlleva retraso mental y disfunción trombovascular (Finkelstein, 2000). La actividad β -cistationasa está reducida dramáticamente y llega a ser la tasa limitante de la síntesis de glutatión en la vida fetal (Pallardo *et al*, 1991), en los prematuros (Vina *et al*, 1995), estrés quirúrgico (Viña *et al*, 1992^b), envejecimiento (Ferrer *et al*, 1990) y sida (Viña *et al*, 1986).

Para restablecer los niveles de glutatión, en estas situaciones se debe utilizar N-acetilcisteína como precursor de cisteína, ya que la vía de transulfuración no es capaz de aportar la suficiente para la síntesis de glutatión (Sastre *et al*, 1994). Sin embargo, la dosis diaria de N-acetilcisteína en tratamientos crónicos debe ser elegida con cuidado para prevenir la acumulación de cisteína intracelular. Además, la cisteína libre puede sufrir auto-oxidación generando radicales libres (Viña *et al*, 1983).

Transporte de glutatión.

El transporte a través de la membrana celular juega un papel clave en la homeostasis interórganica del tripéptido. Hay que tener en cuenta que la vida media del glutatión es baja en el plasma sanguíneo: sólo unos minutos en ratas y humanos (Viña *et al*, 1983). El hígado es uno de los órganos principales de síntesis de glutatión y de liberación del mismo al plasma, mientras que el riñón es el principal órgano que lo elimina de la circulación (Griffith y Meister, 1979; Haberle *et al*, 1979).

El eflujo de glutatión sinusoidal es el principal determinante de los niveles de glutatión, de cisteína y de cistina, así como del estatus de tiol-disulfuro en el plasma sanguíneo (Ookhtens y Kaplowitz, 1998). De hecho, la mayor tasa de eflujo de glutatión se realiza en los hepatocitos a través de la membrana sinusoidal ($15\text{nmol}/\text{min}^{-1}/\text{g}^{-1}$ hígado de rata), siendo la tasa de excreción biliar mucho más baja ($1\text{-}3\text{nmol}/\text{min}^{-1}/\text{g}^{-1}$ hígado de rata). El transporte de glutatión a través de la membrana sinusoidal es sodio/dependiente y es unidireccional en condiciones fisiológicas, es decir, no hay recaptación de *GSH* o de *GSSG* por los hepatocitos intactos (Hahn *et al*, 1978). El eflujo de glutatión puede también ocurrir en el intercambio para la captación de compuestos γ -glutamilo y aniones orgánicos (García-Ruiz *et al*, 1992). La adrenalina, la fenilefrina y el glucagón incrementan el eflujo de *GSH* por el hígado a través de la membrana sinusoidal (Lu *et al*, 1990). De esta forma, la liberación de glutatión por el hígado puede inducirse durante el

estrés para abastecer las demandas incrementadas de otros tejidos (Pyke *et al*, 1986).

El hígado desempeña un papel importante en la homeostasis interorgánica de glutatión, el suministro de *GSH* a los órganos extrahepáticos a través del eflujo, mediado por sistemas de transporte membranal localizados en los polos sinusoidal y canalicular del hepatocito (Kaplowitz *et al*, 1985; Meister y Anderson, 1983). Estos sistemas de transporte se han caracterizado en diferentes modelos y son bidireccionales y electrogénicos; sin embargo, difieren en afinidad por el *GSH* y en especificidad por inhibición *cis* y estimulación *trans* de aniones orgánicos (Ookhtens *et al*, 1985; García-Ruiz *et al*, 1992).

La mitocondria no puede sintetizar glutatión, y la poza mitocondrial de *GSH* proviene del citosol, atravesando la membrana mediante un transportador mitocondrial. Este transportador, identificado en la mitocondria de hígado de rata, es diferente de los transportadores canaliculares y sinusoidales (García-Ruiz *et al*, 1995). La ingesta crónica de etanol dificulta el transporte mitocondrial de *GSH* y en consecuencia se presenta disminución del glutatión mitocondrial (Fernández-Checa *et al*, 1991). El causante de la disminución del transporte de glutatión parece ser un incremento de la viscosidad de las membranas mitocondriales debido al alto contenido en colesterol (Lluis *et al*, 2003).

Bajo condiciones fisiológicas, hay una excreción muy baja de *GSSG* (0,4 nmol/min⁻¹/g⁻¹ hígado de rata) en la bilis. El *GSH* y el *GSSG* se liberan también de los tejidos extrahepáticos, como el corazón, a pesar que la liberación es mucho menor que por el hígado (Ishikawa y Sies, 1984). Se ha demostrado, en eritrocitos de humano, la existencia de un sistema de transporte dependiente de *ATP* para exportar el *GSSG* (Srivastava y Beutler, 1969; Kondo *et al*, 1981). Los eritrocitos pueden sintetizar *GSH*, ya que contienen todas las enzimas necesarias para su biosíntesis (Dass *et al*, 1992). Además, tanto *GSSG* como los conjugados de glutatión (*GS-X*), son exportados activamente cuando su concentración intracelular

es alta (Rossi *et al*, 2001; Thom *et al*, 1997). La re-síntesis de *de novo* puede mantener el equilibrio por la pérdida de *GSH* debido a la exportación de *GSSG* y *GS-X*, este mecanismo es regulado por la retroalimentación del glutatión (Beutler and Dale, 1989). Poco se sabe acerca de la exportación de *GSH* en eritrocitos y su papel en la homeostasis de la poza extracelular (Giustarini *et al*, 2008).

El estrés oxidativo incrementa la liberación de *GSSG* por las células, los eritrocitos y los tejidos, como el hígado, el pulmón y el corazón (Sies y Akerboom, 1984). Los agentes prooxidantes aumentan la cantidad de excreción de *GSSG* en la bilis de forma paralela a la concentración de *GSSG* intracelular (Sies y Akerboom, 1984). Parece que la concentración de *GSSG* en la bilis está mediada por un transporte activo, y sucede contra gradiente de concentración.

El eflujo de *GSSG* se inhibe por glutatión-S- conjugados en el hígado, corazón y eritrocitos (Ishikawa y Sies, 1984). En concordancia, un translocador común se relaciona con el transporte tanto del *GSSG* como de los conjugados de glutatión. Además, la formación de estos conjugados contribuye al consumo de *GSH* durante estrés oxidativo, ya que puede reaccionar a través de su grupo tiol con radicales o moléculas oxidadas (Kosower y Kosower, 1978).

La actividad del transportador sinusoidal de *GSH* está también influenciada por el estatus de tiol-disulfuro (Lu *et al*, 1994). La oxidación de tioles estimula el transporte hacia dentro por la inhibición del eflujo y consecuentemente, cambia la dirección del transporte de *GSH* por medio de este transportador.

Se ha observado captación de *GSH* por el riñón, el pulmón y por las células intestinales (Hagen *et al*, 1986; Lash *et al*, 1986). Cerca del 80% del *GSH* plasmático presente en la arteria renal es extraído tras un único paso por el riñón. Esta capacidad de eliminación es, en parte, debida a la alta actividad de la *GGT* que posee dicho órgano, localizada principalmente en el lado luminal del borde en cepillo de la membrana (Horiuchi *et al*, 1978). El *GSH* presente en la filtración

glomerular se degrada a sus aminoácidos constituyentes, que son reabsorbidos en la membrana luminal. La filtración glomerular y posterior lisis del *GSH* por la γ -glutamyl transpeptidasa, constituye un 20-30% de la extracción renal (Griffith y Meister, 1979). La captación de *GSH* renal también se realiza a través de la membrana basolateral por un sistema de transporte de *GSH* dependiente de sodio (Lash y Jones, 1984).

Se han visto transportadores de *GSH* sodio/dependientes y sodio/independientes en el epitelio del cristalino, en células de Muller retinales, células epiteliales cerebrales y astrocitos (Kannan *et al*, 1996; Kannan *et al*, 1999; Kannan *et al*, 2000). El transportador sodio/dependiente controla la captación de *GSH*, mientras que el transportador sodio/independiente parece estar principalmente relacionado con el eflujo de *GSH*. Es interesante conocer que estos sistemas de transporte permiten el paso de glutatión a través de la barrera hematoencefálica (Kannan *et al*, 1992).

Tres familias de transportadores presentes en células de mamíferos están implicadas en el transporte y movilización del glutatión y son llamadas: la familia de proteínas asociadas a la resistencia a múltiples drogas (*MRP*), la familia del regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR*) y la familia de péptidos transportadores de aniones orgánicos (*OATP*) (Rius *et al*, 2003; Ballatori *et al*, 2005) que co-transportan S-conjugados, *GSSG*, además de los sustratos que ordinariamente transportan (ejemplo: iones orgánicos, Cl^- , HCO_3^- , Na^+ , sales biliares, esteroides, leucotrienos, prostaglandinas). Los transportadores *MRP* y *OATP* tienen baja afinidad por el *GSH* (Mao *et al*, 2000; Cole y Deeley, 2006; Briz *et al*, 2006). Mientras que el transportador *CFTR* facilita el transporte transmembranal de *GSH* (Ballatori *et al*, 2005; Cantin *et al*, 2007), el cual es activado por *AMPc* y puede ser regulado por fosforilación catalizada por las proteínas cinasas A y C (Aleksandrov y Riordan 1998; Wright *et al*, 2004; Riordan, 2005).

Localización del GSH.

Las funciones tan dispares que ejerce el glutatión indican que el nivel y el estado redox no debe ser igual en los diferentes compartimentos celulares. Usando técnicas de separación celular, se ha puesto en evidencia la rica variedad de niveles de glutatión. De interés especial es la distribución del glutatión en la mitocondria, retículo endoplasmático y núcleo.

La importancia del glutatión mitocondrial fue puesta en relieve por Jocelyn y Kamminga (Jocelyn y Kamminga, 1974). La distribución actual y el nivel de glutatión en la mitocondria, en relación con el citosol se describieron por Sies y sus colaboradores (Wahllander *et al*, 1979). El glutatión tiene una tasa diferente de renovación en la mitocondria que en el citosol (Griffith y Meister, 1985). Además, no es sintetizado dentro de la mitocondria, pero es transportado en estos organelos por un transportador específico del citosol. El glutatión mitocondrial tiene importantes funciones celulares tanto en la patología como en la fisiología normal de la célula (Linnane *et al*, 1989). De especial importancia es su función en el envejecimiento, que fue postulado por primera vez por Miquel y colaboradores (1980). El *GSH* disminuye ligeramente con la edad, en el citoplasma, en una proporción de aproximadamente el 30% de todo el glutatión celular.

Así mismo, cuando se determina el glutatión en la mitocondria, se puede observar que, también disminuye significativamente con la edad en dicho organelo y que depende de la pérdida de glutatión observada en toda la célula (Sastre *et al*, 1996).

Además, existe una correlación entre el glutatión mitocondrial y el incremento de estrés oxidativo en el *DNA* de la mitocondria (De la Asunción *et al*, 1998). El glutatión mitocondrial tiene un papel importante en muchas otras enfermedades, como en el SIDA (principalmente debido a la toxicidad de los agentes antirretrovirales), y también es importante en diversos estados fisiológicos. Por

ejemplo, la vía mitocondrial de la apoptosis celular se dispara por la oxidación del glutatión mitocondrial (Esteve *et al*, 1999).

El retículo endoplasmático es otro compartimento celular en donde el glutatión juega un papel importante, particularmente debido a su relevancia en el plegamiento de las proteínas secretadas. El glutatión está significativamente oxidado en el retículo endoplasmático y la tasa *GSH/GSSG* en dicho organelo es de alrededor de 1. Chakravarthi y Bulleid, atribuyeron la alta oxidación del glutatión a un importante transporte de glutatión oxidado, del citosol al retículo endoplasmático. Parece que se necesita un estado altamente oxidativo para la correcta formación de los puentes disulfuro durante el plegamiento de las proteínas (Chakravarthi y Bulleid, 2004).

El glutatión nuclear también merece atención. Las características estructurales de la membrana nuclear, particularmente sus complejos de poros que permiten la difusión de pequeñas proteínas, hacen difícil obtener una tasa *GSH/GSSG* razonable. Los estudios usando técnicas de fraccionamiento lipídico con microscopía confocal, sugieren que la concentración nuclear de GSH es similar a la del citoplasma (Voehringer *et al*, 1998). Por otra parte, se ha descrito (utilizando fluorocromos específicos), que las concentraciones de glutatión en el núcleo son mayores que en el citoplasma en hepatocitos aislados (Bellomo *et al*, 1992). Estos autores concluyen que debe existir un transporte de glutatión que lo traslade del citoplasma al núcleo.

Además, la poza nuclear de glutatión es más resistente al decaimiento que la poza citosólica, de manera que es muy probable que el tripéptido cumpla una función esencial en la fisiología del núcleo. De hecho, el glutatión se relaciona con la regulación de la organización de la matriz nuclear, con la regulación de la estructura de la cromatina (De Capoa *et al*, 1982) y con la síntesis de *DNA*. Más recientemente, varios estudios han subrayado la importancia del estrés oxidativo en la regulación de algunos factores de transcripción (Droge, 2002), como el *NF-*

κB (Li y Karin, 1999) y la *AP-1* (Los *et al*, 1995), que son activados por H_2O_2 en linfocitos T.

Funciones fisiológicas del GSH.

El *GSH* participa en gran cantidad de procesos fisiológicos, la gran mayoría de ellos directamente relacionados con la estructura del mismo. Sus funciones son:

- Tiene papel protector frente al estrés oxidativo. Dado que el *GSH* es uno de los antioxidantes principales de la célula, constituye una importante barrera de protección frente al estrés oxidativo (Sies, 1986). El *GSH* protege a la membrana celular contra el daño oxidativo ya que mantiene el estatus tiólico de la misma (Kosower y Kosower, 1983). El glutatión oxidado puede excretarse también de las células como un mecanismo de emergencia frente a los efectos deletéreos que un exceso puede causar, puesto que el *GSSG* reacciona con los grupos tioles de proteínas formando disulfuros mixtos (Ishikawa *et al*, 1989). También detoxifica peróxidos por la glutatión peroxidasa.
- Mantiene el balance redox en la célula (Meister, 1994; Dickinson y Forman, 2002).
- Participa en la regulación de la síntesis de proteínas. Cuando el glutatión reducido se oxida, los procesos de iniciación y elongación de la traducción se inhiben (Ochoa, 1983). Por otra parte, cuando el glutatión oxidado se reduce, la elongación se reanuda y parece que es un aumento en la concentración de *GSSG* lo que hace que la síntesis proteica se inhiba. Sin embargo, el *GSSG* ayuda a mantener la correcta estructura tridimensional de muchas proteínas que en ocasiones están S-glutationiladas.

-
- Participa en la detoxificación de xenobióticos catalizada por la glutatión S-transferasas (Orrenius y Moldeus, 1984; Meister, 1988; Fang *et al*, 2004). Interviene en la remoción de formaldehído (Townsend *et al*, 2003; Wu *et al*, 2004).
 - Juega un papel en la síntesis del *DNA*: en este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos, reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. Debe intervenir un donante de hidrógeno que puede ser la tiorredoxina, o la glutarredoxina (Holmgren, 1979) dependiente de *GSH*.
 - Constituye un reservorio de cisteína, principalmente en el hígado (Tateishi *et al*, 1974^b).
 - Contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos; como pulmones, riñón, intestino e hígado (Viña *et al*, 1989^a).
 - Modula actividades enzimáticas, por glutathionilación o por regulación del estatus redox (Pajares *et al*, 1992^a; Pajares *et al*, 1992^b), y es coenzima de diversas enzimas.
 - También juega un papel en la homeostasis del calcio (Bellomo *et al*, 1982). Participa en la regulación de la proliferación celular (Terrádez *et al*, 1993). Participa en el metabolismo de prostaglandias y leucotrienos (Wang y Ballatori, 1998).
 - El glutatión es un importante factor de movilización y excreción de metales pesados, específicamente mercurio, cadmio y arsénico (Patrick, 2002).
 - Es requerido para la regeneración del ácido ascórbico (Meister, 1994).

-
- Regula procesos de glicosilación (Martinez *et al*, 2006).
 - La relación citosólica de *GSH/GSSG* activa varias vías de señalización intracelular: niveles altos de *GSSG* activa a la proteína cinasa *B*, a las fosfatasa 1 y 2, y al factor *NF-κB*; en general reducen la proliferación celular e incrementan los procesos apoptóticos (Droge *et al*, 1994; Sen, 2000; Pastore *et al*, 2003).
 - Participa en la activación de linfocitos-T, por lo que juega un papel importante en la respuesta inmune (Droge *et al*, 1994).
 - Juega un papel importante en la espermatogénesis y maduración espermática (Sles, 1999; Wu *et al*, 2004).
 - 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 (Parcell, 2002; Townsend *et al*, 2003; Turrens, 2003).

Papel antioxidante del Glutathión: Ciclo Redox

El *GSH* puede reaccionar directamente con los *RL*, sin intervención enzimática alguna, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa.

Cuando se da una agresión oxidativa, el *GSH* se oxida a *GSSG* por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El *GSSG* formado es inmediatamente reducido a *GSH* por medio de la glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere *NADPH* como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-

fosfato deshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa (Figura 3) se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria (Orrenius y Moldeus, 1984).

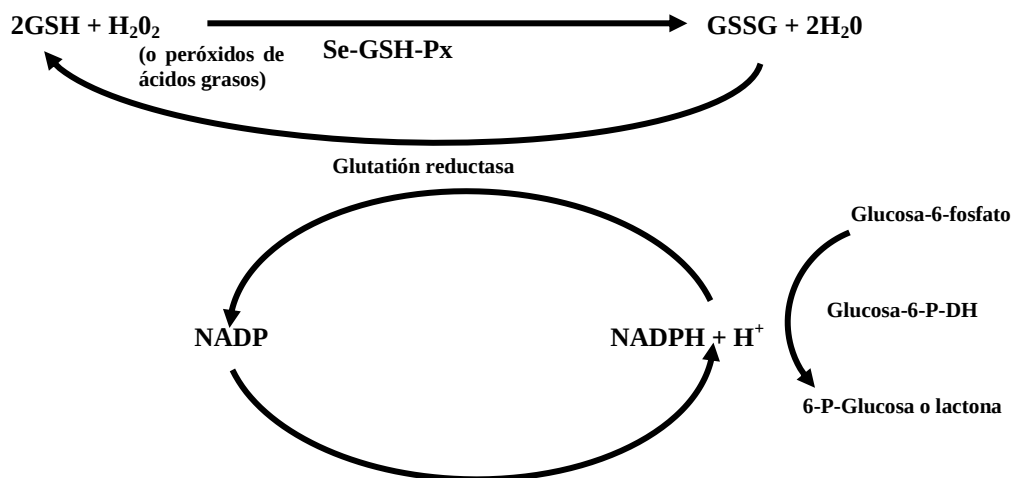


Fig 3. Reacciones en las que intervienen las enzimas glutatión peroxidasa (*GSH-Px*) y la glutatión reductasa (*GR*).

Como ya se ha indicado, la concentración de glutatión en la célula es alta, sin embargo, la concentración de la forma oxidada GSSG es notablemente más baja. Asumiendo en equilibrio la glutatión reductasa y conociendo la relación *NADP/NADPH*, la relación *GSH/GSSG* debería ser cercana al valor de 10,000 (Viña *et al*, 1978). A pesar del cuidado experimental, en el laboratorio se encuentran relaciones entre el 10 y el 100, por lo que se puede suponer que la glutatión reductasa no está en equilibrio *in vivo* (Viña *et al*, 1978). Por tanto, un cambio de glutatión reducido por oxidación de un 5% puede suponer un incremento de GSSG de más del 100% lo que implica que experimentalmente se debe utilizar un método de medida que conlleve una oxidación del *GSH* mínima para medir con precisión el GSSG (Asensi *et al*, 1994).

El hígado.

El hígado es el órgano interno más grande en los vertebrados y representa del 2% al 5% del peso corporal total, la proporción del peso del hígado con el peso corporal suele ser una constante. El hígado es en realidad un complejo de glándulas tubulares con funciones endocrinas y exocrinas. Este órgano es esencial para la vida, la reserva potencial de este órgano es grande ya que por lo menos una tercera parte puede quedar sin detección de insuficiencia hepática (Martínez *et al*, 2001).

El hígado en los humanos está formado por dos lóbulos principales, de los cuales el derecho es más grande que el izquierdo, sin embargo en la rata (Figura 4) se observa una mayor complejidad lobular (William, 1974). El color café rojizo de esta glándula se debe a la cápsula de tejido conectivo que lo cubre. Histológicamente está constituido por hepatocitos, células de Kupffer, células endoteliales, células estelares y células granulares, las cuales se disponen de una forma particular junto con el sistema arterial y venoso constituyendo el "acino hepático", que representa la unidad estructural y funcional de la fisiología hepática (Martínez *et al*, 2001).

Al hígado llega la vena porta, la cual transporta los compuestos absorbidos en el intestino y en el estómago, incluyendo las sustancias que podrían causar toxicidad. Al hígado también llega la arteria hepática, la cual transporta hasta un 25% del gasto cardiaco y se encarga de oxigenar todos los tejidos del hígado. Del hígado salen vasos linfáticos y dos ductos biliares (uno de cada lóbulo). Los dos ductos biliares se unen entre sí para luego unirse a la arteria cística que sale de la vesícula biliar, entonces forman un solo conducto que viaja hasta el duodeno del intestino delgado, donde descarga la bilis producida (Martínez *et al*, 2001).

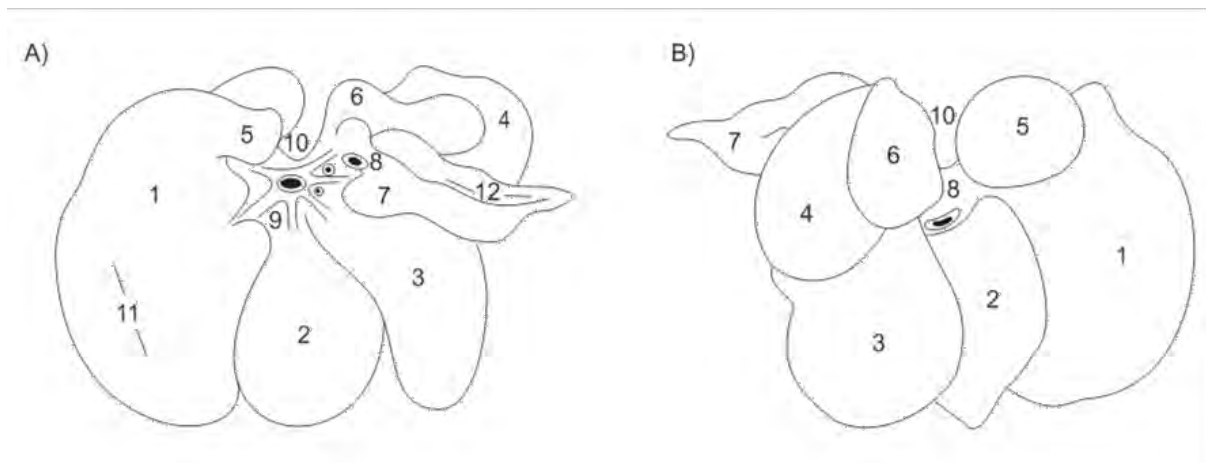


Figura 4. Representación esquemática del hígado de rata: (A) Cara visceral; (B) Cara diafragmática. 1) Lóbulo lateral siniestro, 2) Lóbulo medial siniestro, 3) Lóbulo medial diestro, 4) Lóbulo lateral diestro 5) Proceso papilaris partes retroventriculares (lóbulo caudal), 7) Proceso caudal (lóbulo caudal), 8) Crecimiento de la vena cava caudal, dentro del hígado colecta a la vena hepática, 9) arteria hepática, vena porta y ducto hepatoentericus, 10) Margen dorsal con surco esofágico (impresión esofágica), 11) en la cara visceral del lóbulo lateral siniestro se encuentra la impresión gástrica, 12) en el proceso caudal se muestra la impresión renal.

La unidad funcional del hígado está formada por tres vasos (la vena porta, la arteria hepática y el ducto biliar) y los hepatocitos que los rodean. Los vasos van del espacio periportal (*EP*) al área centrolobular (*AC*). En el *EP* existe una mayor concentración de oxígeno, por lo que las sustancias que se bioactivan por medio de oxigenación son más peligrosas en esta área. En el *AC* la concentración de oxígeno es menor y como la concentración de citocromo P-450 es alta, existen las condiciones para que se presenten reacciones de reducción catalizadas por esta enzima (Riveros-Rosas *et al*, 1997; Martínez *et al*, 2001). Las sustancias que se bioactivan en estas condiciones pueden producir daño en esta región. Un ejemplo es el CCl_4 que es más tóxico en esta área (Zentella de Piña *et al*, 1997).

El hígado ejecuta un gran número de funciones y entre las más importantes están el almacenamiento y biotransformación de las sustancias que recibe del torrente circulatorio y el sistema portal. Normalmente biotransforma y acumula sustancias

útiles en el organismo tales como glucosa, en forma de glucógeno, aminoácidos, grasas, vitamina A y vitamina B₁₂ (Martínez *et al*, 2001; Lieber, 2003).

El hígado está muy propenso a sufrir daño por exposición a xenobióticos, debido a que los dos sistemas circulatorios pueden llevar hasta al hígado sustancias tóxicas, o que se vuelven tóxicas con las transformaciones que tienen lugar en esta glándula. Algunas de las reacciones que experimentan los tóxicos en el hígado, de hecho los convierten en sustancias menos tóxicas o no tóxicas y más fáciles de excretar, en este caso se dice que el hígado hizo una destoxificación (Martínez *et al*, 2001; Lieber, 2003; Zentella *et al*, 1997).

Para realizar sus funciones, el hígado tiene con una gran cantidad de enzimas con funciones oxidativas y reductivas, entre las cuales están el sistema del citocromo P-450, flavinmonooxigenasas, peroxidasas, hidroxilasas, esterasas y amidasas. Otras enzimas también presentes son las glucuroniltransferasas, las sulfotransferasas, metilasas, acetiltransferasas, tioltransferasas (Martínez *et al*, 2001). Todas estas enzimas tienen gran importancia en la biotransformación de los xenobióticos (Lieber, 2003).

El hepatocito.

Es una célula poligonal que posee uno o dos núcleos relativamente grandes con un solo nucléolo. Presenta un gran número de finas mitocondrias granulosas de forma oval y con crestas laminares, los perfiles circulares de algunas crestas sugieren que también existen crestas tubulares. Los abundantes gránulos de glucógeno tienen una distribución regular, las superficies laterales de las células tienen un canal, de modo que dos células, al alinear su superficie acanalada, forman un conducto diminuto: el canalículo biliar. Muchas células pareadas lateralmente constituyen un canalículo dirigido hacia la periferia del lobulillo. Las células hepáticas en la periferia disminuyen de tamaño, hasta adquirir forma de células cuboideas pequeñas que forman los conductillos biliares de la periferia, los canalículos se caracterizan por tener microvellosidades diminutas que sirven para

aumentar la superficie de los mismos. La célula hepática tiene gran diversidad morfológica, debido a la presencia de una cantidad muy variable de lípidos, glucógeno y retículo endoplasmático granular (Martínez *et al*, 2001).

Alcoholismo (aspectos históricos).

La ingesta de bebidas alcohólicas ha acompañado a la humanidad desde los primeros años de la civilización. Hay indicios del vino en Mesopotamia, 4000 años a. C., y de la cerveza con los egipcios, 2200 años a. C. (Kricka y Clark, 1979). También los fenicios y los chinos, a partir de la fermentación de granos, obtenían bebidas alcohólicas, o en el caso de los aztecas que obtenían de la savia del maguey, el pulque (Mike, 1995), el consumo moderado del alcohol es legalmente aceptado por la gran mayoría de las culturas y religiones del mundo (Rodríguez *et al*, 1993).

El consumo del alcohol, ha sido reconocido como un factor de integración social y favorecedor de la convivencia, consumido con moderación y en los contextos permitidos, reduce la tensión, desinhibe y provoca sensaciones de bienestar (Kricka y Clark, 1979). Sin embargo, la influencia del alcohol en la sociedad ha tenido gran peso como factor problemático en la conformación y funcionamiento de la familia, el individuo y la sociedad. El consumo inmoderado de alcohol por el ser humano ha llegado a ser un problema prioritario, en el campo de la salud pública, ya que afecta a individuos cada vez más jóvenes (Zentella de Piña, 1994).

Alcoholismo en México

En nuestro país, los resultados de la Encuesta Nacional de Adicciones realizada por el Consejo Nacional Contra las Adicciones (CONADIC, 2008), reportan que en la población mexicana 8 de cada 1 000 personas consumen alcohol todos los días, en una proporción de 7.5 hombres por cada mujer. Este tipo de consumo aumenta con la edad; por ejemplo, es 3.4 veces más frecuente en hombres mayores de 50

años que en aquellos que tienen entre 18 y 29. Sin embargo, en nuestro país el patrón de consumo típico es de grandes cantidades por ocasión de consumo. En total, casi 27 millones de mexicanos (26 828 893) entre 12 y 65 años beben con este patrón y presentan frecuencias de consumo que oscilan entre menos de una vez al mes y diario. Esto significa que, aunque beban con poca frecuencia, cuando lo hacen ingieren grandes cantidades. Casi 4 millones (3 986 461) beben grandes cantidades una vez a la semana o con mayor frecuencia (usuarios consuetudinarios).

El consumo consuetudinario es más frecuente entre hombres que entre mujeres, en una proporción de 5.8 hombres por cada mujer. Sin embargo, esta manera de beber está aumentando entre las mujeres, especialmente entre las adolescentes. La diferencia entre mujeres adultas y adolescentes (una mujer entre 12 y 17 años, por cada 1.9 mujeres adultas mayores de 18 años) es menor que la que se observa entre los hombres (un adolescente entre 12 y 17 años por cada cinco adultos mayores de 18 años).

Tanto en hombres como en mujeres, el grupo de edad que muestra los niveles más altos de consumo es el de 18 a 29 años. Los niveles descienden después conforme aumenta la edad. Los resultados indican que la población adolescente está copiando los patrones de consumo de la población adulta.

La proporción de la población que presenta abuso/dependencia al alcohol es muy elevada. Poco más de cuatro millones de mexicanos (4 168 063) cumple con los criterios para este trastorno; de éstos, tres y medio millones (3 497 946) son hombres y poco más de medio millón (670 117) son mujeres.

Esta forma de beber se asocia con una proporción importante de problemas. Las dificultades más frecuentes ocurren con la familia (10.8%), a continuación aparecen las peleas (6%). Los problemas con la policía son menos frecuentes (3.7%), pero en una proporción importante (41.3%) se encontraron personas que

fueron detenidas bajo los efectos del alcohol. Los problemas laborales no son muy comunes (3.7%) y en una proporción aun menor los problemas derivaron en la pérdida del empleo o en la posibilidad de perderlo (1.4%). Los problemas con la familia son más frecuentes en los hombres, especialmente entre los mayores de edad (3.8 hombres por cada mujer). Entre los adolescentes, estas diferencias son menos marcadas (1.3 hombres por cada mujer). Más mujeres adolescentes (7.8%) que mujeres adultas (3.9%) informaron haber tenido problemas con la familia.

El Consejo Nacional sobre Alcoholismo y Farmacodependencia y la Sociedad Americana de Medicina y Adicción define el alcoholismo como "una primaria, enfermedad crónica caracterizada por el deterioro de control sobre la bebida, la preocupación con el alcohol, las drogas, el uso de alcohol a pesar de consecuencias adversas, y distorsiones en el pensamiento." (Morse and Flavin, 1992) El DSM-IV (manual de diagnóstico y estadístico de trastornos mentales), define el abuso de alcohol de uso repetido a pesar de recurrentes consecuencias adversas. Además, define la dependencia del alcohol, como el abuso del alcohol combinado con la tolerancia, la abstinencia, y una forma incontrolable de beber (Gary, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ denomina en la actualidad al alcoholismo como la dependencia de fenómenos conductuales, cognitivos y fisiológicos que pueden aparecer después del consumo repetido de alcohol. Estos fenómenos típicamente incluyen deseo intenso de consumir alcohol, dificultad para controlar el consumo, persistencia del consumo a pesar de las consecuencias perjudiciales, mayor prioridad al consumo frente a otras actividades y obligaciones, aumento de la tolerancia al alcohol y abstinencia física cuando el consumo se interrumpe.

¹ <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>

Además los criterios para identificar el síndrome de dependencia del alcohol o alcoholismo, a partir del CIE-10, son los siguientes:

- Deseo intenso o vivencia de una compulsión a consumir alcohol.
- Disminución de la capacidad para controlar el consumo de alcohol, unas veces para controlar el inicio del consumo y otras para poder terminarlo o para controlar la cantidad consumida.
- Síntomas somáticos de un síndrome de abstinencia cuando el consumo de alcohol se reduzca o cese, cuando se confirme por: el síndrome de abstinencia característico del alcohol o el consumo de la misma sustancia (o una muy próxima) con la intención de aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.
- Tolerancia, de tal manera que se requiere un aumento progresivo de la dosis de alcohol para conseguir los mismos efectos que originalmente producían dosis más bajas;
- Abandono progresivo de otras fuentes de placer o diversiones, a causa del consumo de alcohol, aumento del tiempo necesario para obtener o ingerir el alcohol o para recuperarse de sus efectos.
- Persistencia en el consumo de alcohol a pesar de sus evidentes consecuencias perjudiciales, tal y como se evidencia por el consumo continuado una vez que el individuo es consciente o era de esperar que lo fuera, de la naturaleza y extensión del daño.

El alcohol.

El etanol, alcohol etílico o simplemente alcohol tiene un peso molecular de 46.07 g/mol, tiene la siguiente composición porcentual C: 52.14%, H: 13.13%, O: 34.74% un punto de fusión de -114.1°C , un punto de ebullición de 78.5°C , un calor de vaporización de 854 J/g y una densidad relativa de 0.789g/cm^{-3} a 20°C , (Merck Index, 1989).

El etanol es el producto reducido en la fermentación alcohólica de la levadura y otros microorganismos que fermentan la glucosa a etanol y CO₂, en lugar de formar lactato. Durante la fermentación alcohólica, la glucosa se convierte en piruvato durante la glucólisis y finalmente el piruvato se transforma en etanol y CO₂ (Lehninger *et al*, 2001).

El etanol es un líquido volátil incoloro de un olor característico, posee una desigual distribución de sus cargas lo que le confiere una polaridad natural, es soluble en agua, aunque también puede disolverse en cloroformo, y acetona entre otros disolventes, y es prácticamente insoluble en grasas y aceites.

Es importante mencionar que algunas publicaciones han descrito, erróneamente, al etanol como una sustancia soluble en lípidos, posiblemente esto se deba a que es una molécula pequeña neutra y es capaz de pasar libremente a través de las membranas biológicas, de la misma manera que lo hace una sustancia liposoluble. Sin embargo, otras moléculas de bajo peso molecular, como el agua, también pueden pasar con facilidad a través de la doble capa de fosfolípidos, sin tener que ser solubles en lípidos (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

En los mamíferos el etanol es un metabolito que normalmente está presente en muy baja, concentración, de 0.1-1mM, su presencia se debe a la actividad fermentativa de la flora gastrointestinal (McManus *et al*, 1960; Barahona *et al*, 1986). Sin embargo, estas cantidades de etanol no son suficientes para justificar la presencia de todo un conjunto de siete isoenzimas, capaces de oxidarlo a acetaldehído (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

Hay que hacer notar que existen variaciones genéticas que influyen en las enzimas responsables del metabolismo del etanol, además de otros factores como la edad, sexo, estado de ayuno o alimentación, etc., que contribuyen a la absorción, la distribución y el metabolismo del alcohol (Riveros-Rosas *et al*, 1997). Por lo tanto, cada individuo responde de forma diferente al consumo de etanol.

Además, la oxidación del etanol libera 7kcal/g, a estas calorías se les conoce como “calorías vacías”, ya que no van acompañadas de aminoácidos, ni vitaminas, ni ningún otro elemento que permita la síntesis de las moléculas estructurales de la célula (Laguna y Piña, 2002)

En general, la concentración de etanol en sangre permite predecir el grado de modificación conductual y cognitiva de un sujeto. Así, y con carácter estimativo Bogen (1932) propuso una clasificación de los efectos del etanol, según diferentes concentraciones séricas. Esta clasificación se mantiene en la actualidad con algunas variaciones. Según esta clasificación, el porcentaje de alcohol en sangre (*BAC*, del inglés *Blood alcohol concentration*) se muestra en la tabla 1.

Tabla 2. Efectos Progresivos del Alcohol.		
BAC (%)	Conducta	Afectación
0.01–0.029	Individuo aparentemente normal	Los efectos solo se pueden detectar con pruebas especiales
0.03–0.059	- Sensación de bienestar - Relajación - Hablar sin descanso - Disminución de la inhibición	- En estado de alerta - Coordinación - Concentración
0.06–0.10	- Sentimentalismo - Desinhibición - Extroversión	- Reflejos - Razonamiento - Percepción de profundidad - Agudeza en la distancia - Visión periférica - Recuperación de deslumbramiento - Funcionamiento sexual
0.11–0.20	Expresiones exageradas	Tiempo de reacción aumentado

	• Inestabilidad emocional • Ira y tristeza • Bullicioso	• Control motriz • Escalonamiento • Dificultad al hablar
0.21–0.29	• Estupor • Perdida del entendimiento • Deterioro de las sensaciones	• Deterioro motriz grave • Perdida de la conciencia • Perdida de la memoria
0.30–0.39	• Depresión severa • Perdida del conocimiento • Posible muerte	• Función de la vejiga • Respiración • Ritmo cardiaco
>0.40	• Perdida del conocimiento • Posible muerte	• Aumenta la respiración • Acelera el Ritmo cardiaco • Capacidad de vivir • Daño cerebral

tomada de Federal Aviation Regulation (CFR) 91.17: *Alcohol and Flying*:

Absorción del alcohol.

El etanol una vez ingerido, se absorbe inmediatamente a través de los epitelios mucosos y en los alvéolos pulmonares como vapor; sin embargo, la cantidad absorbida por estas dos vías es prácticamente insignificante, por lo que se puede considerar que todo el alcohol ingerido va al estómago, donde es absorbido por difusión simple por el epitelio del estómago e intestinos, como ocurre con el agua.

En el estómago, es absorbido en pequeñas cantidades hacia el torrente sanguíneo, a través de la mucosa gástrica (aproximadamente 20% al 30%), mientras que la cantidad más grande es canalizada, por el mismo vaciamiento gástrico, hacia el intestino delgado (Fig. 5) (Batt, 1989; Cooke y Birchall, 1969; Smith *et al*, 1992). Es en el intestino delgado (principalmente duodeno y yeyuno), en donde se lleva a cabo la principal absorción del etanol, hacia la vena porta y directamente al hígado para ser metabolizado (Fig. 6) (Watson, 1989). Su oxidación se realiza, principalmente, en este órgano, que contiene la mayor

cantidad de enzimas que lo oxidan. Durante su metabolismo, es capaz de desplazar el 90% de otros sustratos utilizados por el hígado, lo que convierte al hepatocito en la principal célula que metaboliza al etanol (Lieber, 1991).

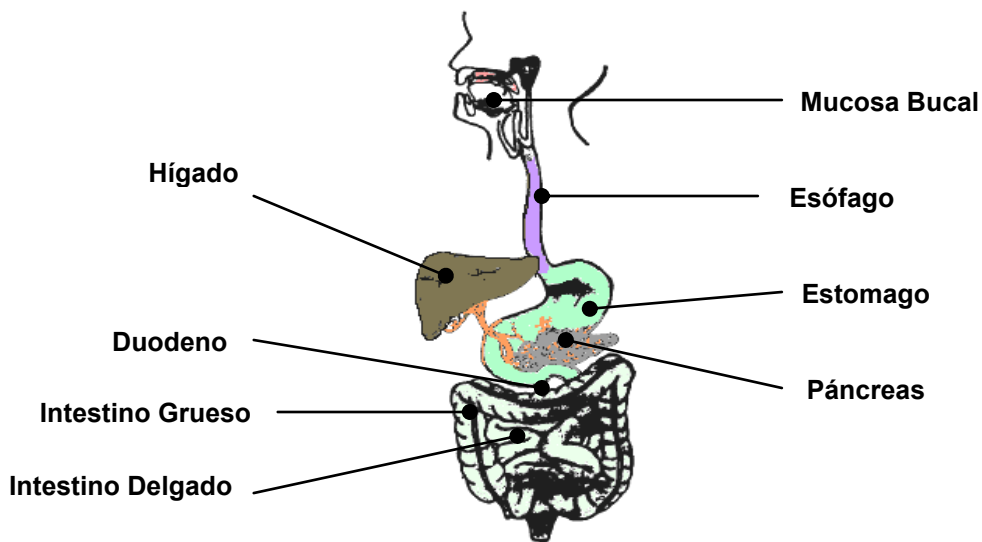


Fig 5. Órganos involucrados en la absorción y oxidación del etanol, cuando el alcohol es administrado por vía orogástrica (modificado de Riveros-Rosas *et al*, 1997).

Una vez que el etanol está en sangre, se distribuye sobre todos los líquidos corporales, atravesando libremente las membranas biológicas (Watson, 1989), por tal motivo, en la mujer, que tiene una menor proporción de fluidos corporales que el hombre (53% contra 61.8%), alcanza nivel más alto de etanol en sangre, habiendo ingerido ambas dosis equivalentes de etanol (Batt, 1989; Watson, 1989).

La velocidad de absorción de etanol, depende principalmente de la velocidad con la que pasa del estómago al intestino delgado, que a su vez depende de la velocidad del vaciamiento gástrico. En general, la presencia de alimento sólido retarda el vaciamiento gástrico y la velocidad de absorción del etanol (Horowitz *et al*, 1989). En otros casos, la concentración del etanol ingerido también influye en la

absorción y retarda el vaciamiento gástrico (Roine *et al*, 1991). Si bien estos factores son determinantes para establecer la velocidad de absorción, hay muchos más factores que pueden modificar la velocidad de absorción, como son: el flujo sanguíneo en el sitio de absorción, las propiedades irritantes del etanol, la velocidad de ingestión, el tipo de bebida, la deficiencia proteica, la temperatura corporal, el ejercicio físico y el ciclo menstrual (Agarwal y Goedde, 1989).

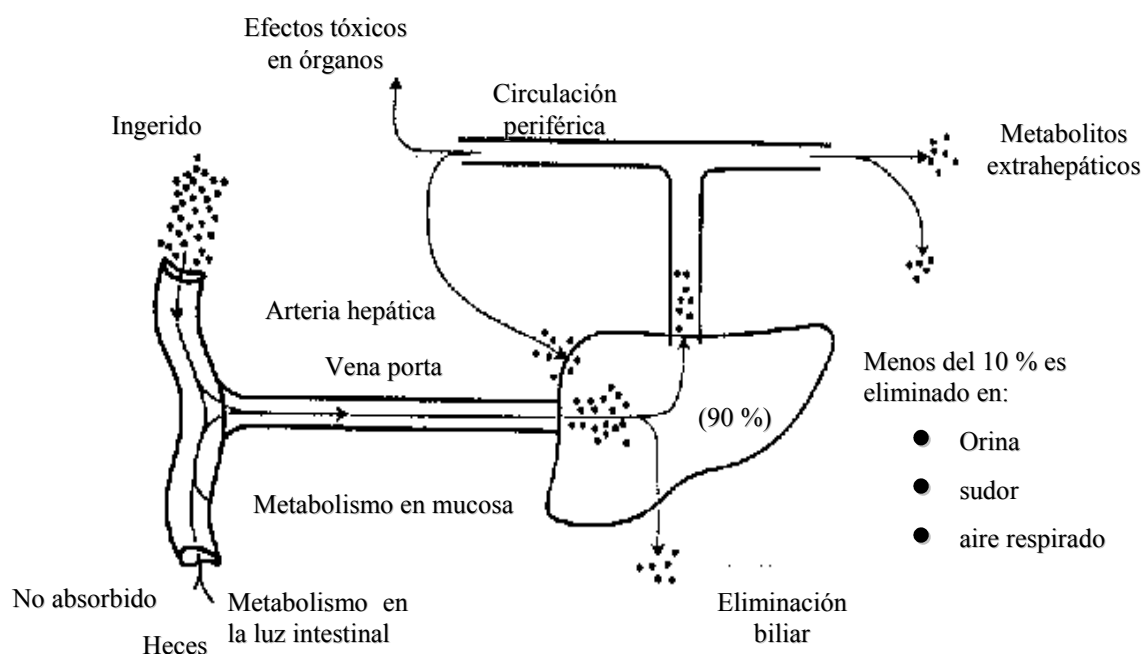


Fig 6. Metabolismo hepático y extrahepático del etanol (Zentella de Piña *et al*, 1993).

Metabolismo del Alcohol.

El hígado es el principal órgano responsable de la oxidación y eliminación del alcohol ingerido, así como de la mayoría de los fármacos y compuestos xenobióticos (Riveros-Rosas *et al*, 1997). La importancia del hígado en el metabolismo del etanol se debe a que contiene tres sistemas metabólicos, capaces de oxidar al etanol (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

El primer sistema esta constituido por una serie de enzimas especializadas, denominadas alcohol deshidrogenasas (*ADHs*), las cuales se localizan en el citosol de los diferentes tejidos que conforman nuestro cuerpo, principalmente el hepático. Estas enzimas oxidan el etanol a acetaldehído, acoplando esta oxidación a la reducción de un dinucleótido de nicotina y adenina (NAD^+) (Petersen *et al*, 1983). En cuanto a la oxidación del acetaldehído, la enzima es la aldehído deshidrogenasa (*ALDH*) y genera acetato, los últimos productos del metabolismo son el dióxido de carbono (CO_2) y el agua (H_2O) (Escarabajal, 2000).

Por otra parte, un 10% o menos de ese etanol puede ser metabolizado por rutas alternativas, como por ejemplo: un sistema oxidante localizado en los peroxisomas de las células hepáticas, en donde la oxidación de una molécula de etanol a acetaldehído esta acoplada a la descomposición simultánea de una molécula de peróxido de hidrógeno, en una reacción catalizada por la enzima catalasa. Un tercer y último sistema se denomina sistema microsomal oxidante del etanol (*MEOS*), el cual se localiza en el interior de los microsomas y requiere la participación de citocromos P-450, los cuales acoplan la oxidación del etanol, y de un dinucleótido de nicotinadenina fosfato ($NADP^+$), a la reducción de una molécula de oxígeno para formar H_2O_2 (Lieber, 1977; Zimatkin y Deitrich, 1997).

Estos tres sistemas trabajan de manera simultánea en presencia de etanol, aunque con diferentes actividades y afinidades (Figura 7). El *MEOS* y la catalasa tienen valores para la constante de Michaelis (K_m) mayores que la *ADH*, por eso sólo llegan a ejercer una acción significativa con alta concentración de etanol, cuando la *ADH* está inhibida o, en el caso del *MEOS*, cuando el consumo de etanol es crónico (Zimatkin y Deitrich, 1997). Es importante considerar que la oxidación del etanol a través del *MEOS* implica la formación de *RL* (Winston y Cederbaum, 1983^{a-b}).

Existe, además de los tres sistemas enzimáticos antes descritos para la oxidación del etanol, un mecanismo de oxidación no enzimático que, probablemente, es funcional *in vivo*, y que depende de la participación de quelatos de hierro en presencia de radicales hidroxilo (Koop, 1989).

Por último, existe una vía metabólica no oxidativa (Lange *et al*, 1981; Koop, 1989), en donde el etanol forma ésteres etílicos de acil grasos, a través de una sintetasa de ésteres de acil graso. Sin embargo, es probable que su contribución al metabolismo total del etanol no sea significativa (Koop, 1989).

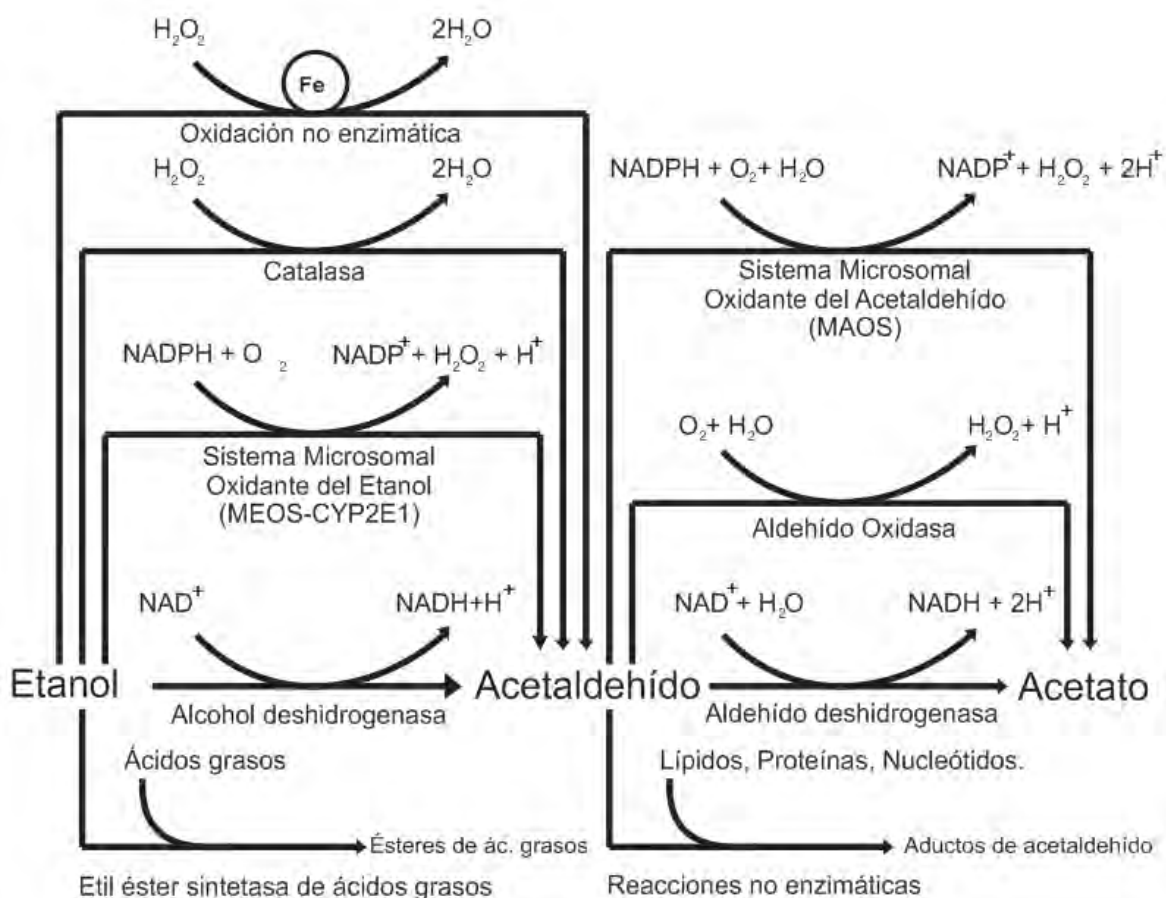


Fig 7. Principales vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del etanol y acetaldehído (tomado de Riveros-Rosas *et al*, 1997).

El sistema de las alcohol deshidrogenasas (ADH's).

Este sistema en mamíferos, está constituido por la familia de las alcohol deshidrogenasa de “cadena media y larga”, que esta dividida a su vez en 6 clases distintas, las cuales están codificadas por al menos 7 genes distintos (Danielsson *et al*, 1994; Arnon *et al*, 1995; Riveros-Rosas *et al*, 2003). Estas enzimas, están ampliamente distribuidas en los diferentes tejidos de nuestro cuerpo (Tabla 2) (Boleda *et al*, 1989), y todas se caracterizan por ser moléculas diméricas con subunidades, de $\approx 40\text{kDa}$; cada subunidad se caracteriza por contener 2 átomos de Zn unidos por cisteínas, los cuales ayudan a estabilizar la estructura de la enzima (Jelokova *et al*, 1994), además de que uno de ellos forma parte del sitio activo (Eklund *et al*, 1976-1981; Arnon *et al*, 1995). La Tabla 3 muestra las diferentes clases de ADH hasta ahora descritas, así como los distintos genes y subunidades que comprenden.

Tabla 2. Actividad de Alcohol Deshidrogenasa en varios órganos de rata con [33mM] de etanol y [4mM] NAD^+ como sustratos, pH 7.5

Órgano	Actividad		Órgano	Actividad	
	mU/g de tejido	Total (mU/órgano)		mU/g de tejido	Total (mU/órgano)
Ojos	5.87 ± 0.7	1.5 ± 0.2	Hígado	260.0 ± 50	3500.0 ± 640
Mucosa del oído	8.9 ± 1.3	2.0 ± 0.3	Glándula Suprarrenal	4.0 ± 0.5	0.8 ± 0.3
Mucosa nasal	15.3 ± 2.6	1.3 ± 0.2	Riñón	16.0 ± 7.0	26.0 ± 13
Traquea	5.3 ± 0.7	1.2 ± 0.1	Vejiga urinaria	10.0 ± 2	1.8 ± 0.5
Pulmones	8.1 ± 1.4	13.5 ± 2	Testículos	26.2 ± 9.0	60.0 ± 20
Mucosa bucal	3.8 ± 0.8	0.3 ± 0.1	Pene	10.5 ± 4.1	40.0 ± 16
Lengua	5.4 ± 0.5	4.0 ± 0.3	Epidídimo	17.5 ± 8.09	4.44 ± 1.16
Esófago	16.1 ± 3.2	3.7 ± 0.7	Ovarios	7.0 ± 5.0	0.9 ± 0.7
Estómago	11.8 ± 1.7	19.6 ± 3	Útero	17.4 ± 7.2	9.6 ± 4
Intestino delgado	19.3 ± 4.3	58.0 ± 14	Vagina	12.5 ± 4.6	3.0 ± 1
Colon	13.5 ± 1.3	30.0 ± 3	Piel	2.8 ± 0.3	88.0 ± 15
Recto	37.3 ± 7.0	28.5 ± 6			

Datos reportados por Boleda *et al*, 1989.

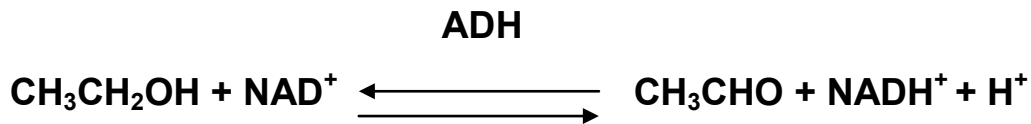
Tabla 3. Polimorfismos de las deshidrogenasas alcohólicas (ADH) en mamíferos.

Clase	Locus Genético	Alelos	Subunidades	Distribución
I	ADH - 1	ADH1	α_1	Hígado
I	ADH - 2	ADH2*1	β_1	Hígado
I		ADH2*2	β_2	Y
I		ADH2*3	β_3	pulmón
I	ADH - 3	ADH3*1	γ_1	Hígado y
I	ADH - 3	ADH3*2	γ_2	estómago
II	ADH - 4	ADH4	Π	Hígado, córnea, riñón y pulmón
III	ADH - 5	ADH5	X	Todos los tejidos
IV	ADH - 7	ADH σ	σ	Hígado, estómago, córnea, piel
V	ADH - 6	ADH6	?	Hígado, estómago
VI	?	?	?	Hígado (roedores)

Modificado de Arnon *et al*, (1995).

Las *ADH*'s catalizan la oxidación de etanol a acetaldehído y la reducción simultánea de NAD^+ a $NADH$. Estas enzimas están localizadas mayoritariamente en el citosol (Von Wartburg *et al*, 1983), y funcionan a su capacidad máxima con cantidades relativamente pequeñas de alcohol en sangre. El paso limitante, en esta etapa del metabolismo del etanol, depende de la velocidad con la que el hígado regenera NAD^+ desde el $NADH$. De hecho, durante la intoxicación alcohólica, la oxidación del etanol por las *ADH*'s provoca la acumulación del $NADH$ a expensas del NAD^+ . El cambio en la relación $NAD^+/NADH$, tiene diversas consecuencias metabólicas, por ejemplo, el piruvato es reducido a lactato por el

NADH y el lactato pasa a la sangre (Eriksson, 1977). Puesto que la concentración de etanol satura fácilmente las *ADH*'s (exceptuando a la *ADH* de la clase III), estas enzimas presentan una cinética de orden cero y su velocidad de reacción no se incrementa por la presencia de etanol en cantidades grandes.

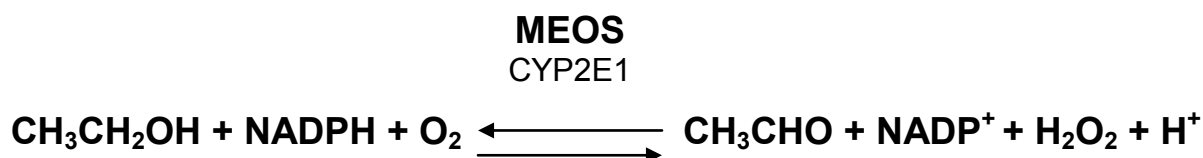


Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la actividad de las *ADH*'s hepáticas humanas tiene una gran variedad interindividual (Li y Magnes, 1975). En este sentido las diferencias en el metabolismo reflejan, principalmente, el amplio intervalo de propiedades catalíticas de la *ADH* hepática humana (y la de otros animales), y que se deben al amplio número de formas moleculares observadas en esta enzima. Se puede decir que las *ADH*s, en función de sus características electroforéticas y catalíticas, son una mezcla de un amplio número de isoenzimas (Smith *et al*, 1973; Jornvall *et al*, 1987). Teniendo en cuenta que el sistema de las *ADH*s es multigénico, es decir, un sistema alélico múltiple (Jornvall *et al*, 1991) en seres humanos constituye una familia compleja, por lo que a partir de sus rasgos estructurales y cinéticos, y por la composición de sus isoenzimas puede ser dividida en 7 genes distribuidas en V clases y una clase más en roedores (Yin, 1994).

Sistema microsomal oxidante de etanol (MEOS).

Este sistema fue estudiado por primera vez por Lieber a finales de la década de los 60's (Lieber y DeCarli, 1968; Rubin y Lieber, 1968), a partir de un reporte inicial de Orme-Johnson y Ziegler (1965), en donde describieron incrementos paralelos en la capacidad para metabolizar fármacos y etanol, con la actividad total del

citocromo P-450 en retículo endoplásmico liso de células hepáticas. A partir de estos trabajos rápidamente se demostró la existencia de una nueva vía de oxidación del etanol dependiente de citocromos P-450 (Riveros-Rosas *et al*, 1997). Hasta hace algunos años se reportó la presencia del *MEOS* en microsomas de células de diferentes tejidos (González, 1992), y se conoce que involucra la participación de varias enzimas de la ahora superfamilia de citocromos P-450, las cuales catalizan la oxidación del etanol a acetaldehído, acoplando esta reacción a la oxidación de una molécula de *NADPH* y la reducción de una molécula de oxígeno para formar peróxido de hidrógeno (Teschke and Gellert, 1986).



El H_2O_2 formado durante la actividad del sistema *MEOS*, estimula también la oxidación no enzimática del etanol, a través de la formación de radicales hidroxilo en presencia de quelatos férricos, por lo que durante mucho tiempo se consideró que el sistema *MEOS* poseía dos mecanismos de reacción: uno dependiente y otro independiente de la formación de radicales hidroxilo.

Existen diferentes tipos de citocromos P-450 capaces de catalizar la oxidación del etanol, aunque el más eficiente es el citocromo P-450 2E1 (Koop y Casazza, 1985; Koop, 1989), también llamado CYP2E1. El citocromo 2E1 es el constituyente básico del sistema *MEOS* (Lasker *et al*, 1987; Lieber, 1994), que posee actividad para oxidar, además del etanol, otros alcoholes como el butanol o pentanol (Morgan *et al*, 1982), además de otros compuestos xenobióticos como la anilina, acetaminofen, CCl_4 , acetona, benceno, fenol y N-nitrosodimetilamina, entre otros (Morgan *et al*, 1982-1983; Ingelman-Sundberg y Johansson, 1984; Koop y

Casazza, 1985; Yang *et al*, 1985). Este sistema posee una baja afinidad por el etanol, con una *K_m* de 8-10mM (Lieber, 1994), por lo que se considera que en individuos no alcohólicos, su participación es importante solo a alta concentración de sustrato (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

La actividad del CYP2E1 aumenta por la exposición prolongada al etanol, lo que conlleva a un aumento paralelo en el metabolismo de diferentes drogas, así como al aumento en la producción de metabolitos tóxicos derivados de xenobióticos (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

La catalasa.

La catalasa que se encuentra en los peroxisomas de las células hepáticas, puede participar en el proceso de oxidación del etanol, al utilizar al etanol como donador de electrones durante la descomposición del H₂O₂ (Berkaloff *et al*, 1988). No obstante, existen pruebas que indican que el nivel de H₂O₂ presente *in vitro* puede ser menor de lo existente *in vivo*, lo que puede estar reduciendo la importancia aparente de ésta vía metabólica mediada por la catalasa (Escarabajal, 2000).

Sin embargo, la principal limitante en la actividad de esta enzima es la presencia de peróxidos, por lo que su participación en la oxidación etílica es muy reducida (Lieber, 1994).



Oxidación no enzimática del etanol.

Aparte de los sistemas enzimáticos involucrados en la oxidación del etanol, existe un mecanismo no enzimático dependiente de la participación de fierro (Fe^{2+}) quelado y en presencia del H_2O_2 el cual se genera en la mitocondria y el retículo endoplásmico, esto da lugar a la formación de iones oxhidrilo ($\text{HO}^\cdot$) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) vía la reacción de Fenton que también puede ser iniciada por iones ferricos (Fe^{3+}) (Zentella de Piña y Saldaña, 1996).

Se ha demostrado *in vitro* que la oxidación del etanol en microsomas se estimula, significativamente, en presencia de algunos quelatos de fierro, como por ejemplo Fe^{3+} -EDTA, sin la participación directa de citocromos *P-450* (Cederbaum y Dicker, 1983; Ingelman-Sundberg y Johansson, 1984; Koop, 1989; Dicker y Cederbaum, 1990). Esta oxidación no enzimática, depende de la formación de radicales $\text{HO}^\cdot$ a partir del H_2O_2 , en donde a través de una reacción espontánea entre el radical hidroxilo y el etanol, se forma agua y un radical alcohoxilo, y el cual a su vez, reacciona rápidamente con el oxígeno para formar, finalmente, acetaldehído y un ión superóxido protonado ($\text{HO}_2^\cdot$) (Ingelman-Sundberg y Johansson, 1984).

Es importante tener presente que el etanol por sí solo, es un excelente atrapador de $\text{HO}^\cdot$ (Cederbaum, 1987), por lo que esta serie de reacciones está limitada solo por la disponibilidad de $\text{HO}^\cdot$, que a su vez depende de la presencia de quelatos de Fe y un sistema reductor de estos, susceptibles de catalizar la formación de $\text{HO}^\cdot$ a partir de H_2O_2 ; o bien de la disponibilidad del peróxido de hidrógeno mismo, necesario para la formación del $\text{HO}^\cdot$ (Figura 8).

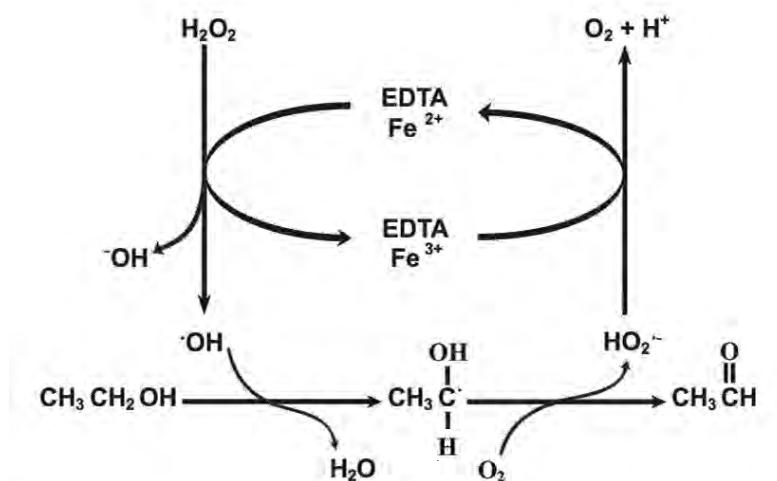


Fig 8. Mecanismo de oxidación no enzimático del etanol (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

Sistema de las aldehído deshidrogenasas.

Como se expuso con anterioridad el etanol, después de su ingestión, se absorbe rápidamente desde el tracto intestinal y es distribuido uniformemente en el agua del organismo. La vía para degradar el etanol es su oxidación en el hígado a acetaldehído mediante la acción de la *ADH*. Posteriormente, un sistema constituido por una serie de enzimas, denominadas como aldehído deshidrogenasas (*ALDH's*), se encargan de oxidar más del 90% del acetaldehído formado durante la oxidación del etanol, transformándolo en acetato, en una reacción acoplada a la reducción de una molécula de NAD^+ (Weiner, 1979).

Debido a sus efectos agudos y crónicos en humanos, el acetaldehído ha recibido una atención considerable. La *ALDH* cataliza la oxidación de acetaldehído en el hígado y en otros órganos, ya que al contrario de la *ADH*, que está localizada principalmente en el hígado, las *ALDHs* se localizan prácticamente en cualquier órgano del cuerpo (Escarabajal, 2000). También, a diferencia de la *ADH*, que se encuentra casi exclusivamente en el citosol, la *ALDH* se encuentra en los microsomas, en la mitocondria, así como en el citosol (Deitrich *et al*, 1976). La

reacción catalizada por la *ALDH* es esencialmente irreversible en dirección de la formación de acetato por la elevada eficiencia catalítica de la *ALDH* y el alto grado de reoxidación de $NADH + H^+$ a NAD^+ en la mitocondria, permite el metabolismo del etanol en una proporción importante en el hígado (Escarabajal. 2000).

Otros sistemas oxidantes.

La aldehído oxidasa (AO) es una enzima poco estudiada, la cual cataliza la oxidación del acetaldehído hacia acetato en una reacción dependiente de oxígeno y que genera H_2O_2 . El Sistema Microsomal de Oxidación del Acetaldehído (MAOS), requiere la participación de un citocromo P-450 para llevar a cabo la oxidación del acetaldehído hacia acetato, en una reacción acoplada a la oxidación de un fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida reducida ($NADPH + H^+$) y la reducción de una molécula de oxígeno para formar H_2O_2 , en una reacción análoga a la realizada por el MEOS sobre el etanol (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

LOS RADICALES LIBRES.

El metabolismo del etanol genera gran cantidad de *RL* que se definen como moléculas o átomos, que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo (Zentella de Piña *et al*, 1994^b); tienen una vida media extraordinariamente corta, del orden de milisegundos, debido a su gran reactividad, por lo que no viajan muy lejos de los sitios en donde se forman; son generados por el metabolismo normal y existen en concentraciones muy bajas, de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} M (Zentella de Piña y Saldaña, 1996).

Estas moléculas o átomos, tremendamente reactivos se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de numerosas enfermedades (Gutteridge, 1994). Tras la evidencia del papel patológico de *RL*, se han abierto numerosas líneas de investigación con el fin de modular sus efectos deletéreos. En el medio biológico, los *RL* más frecuentes son compuestos oxigenados, y se les llaman *ERO*. La vida,

al desarrollarse en presencia de oxígeno, ha convivido con estas *ERO* que han resultado ser las responsables del daño oxidativo a macromoléculas biológicas, como el *DNA*, lípidos, glúcidos y proteínas (Halliwell, 1996). Una gran diversidad de patologías se han visto relacionadas por la presencia de estas *ERO*, incluso en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Bondy, 1992), o el ejercicio físico (Sastre *et al*, 1992). De cualquier forma, en muchas de estas patologías y procesos fisiológicos se desconoce todavía si son causa o consecuencia. En general, cualquier daño a un tejido puede causar ruptura celular y liberación del contenido intracelular en el área que rodea la zona lesionada. Esto incluye a los metales de transición, capaces de generar pequeñas cantidades de *RL* que, al superar la capacidad de eliminación, pueden agravar un proceso patológico (Del Maestro *et al*, 1980).

Además de las especies reactivas de oxígeno, existen también *RL* nitrogenados o *ERN* cuya importancia, aunque en principio menor que la de las *ERO*, ha crecido considerablemente en la actualidad.

Clases de radicales libres.

Existen muchas clases de radicales libres, tanto dentro de las *ERO* como de las *ERN*. Entre los más importantes podemos destacar los siguientes: el ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), poco reactivo pero potencialmente tóxico por los intermediarios que puede producir; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, sin ser un radical libre, puede atravesar las membranas causando daño oxidativo lejano al sitio de origen; el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) es muy reactivo y con una vida media extremadamente corta; el radical peroxilo ($ROO^{\cdot}$) que surge de la peroxidación lipídica y el óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) que tiene muchas funciones fisiológicas, pero que reaccionando con el $O_2^{\cdot-}$ puede formar peroxinitrito ($ONOO^-$) que es muy tóxico (Gutteridge, 1994; Halliwell, 1996; Bondy, 1992).

Génesis de las especies reactivas del oxígeno.

Las *ERO* pueden producirse tanto de forma endógena como proceder de fuentes exógenas (Freeman y Crapo, 1982; Baeuerle y Henkel, 1994). Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies de formación endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres que no son producidos por él mismo. En la dieta son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante, además son fuente de radicales libres el humo del tabaco, la polución ambiental, el ozono, etc. (Ames, 1983; Pryor *et al*, 1995; Rock *et al*, 1996). En cambio, algunas especies reactivas de oxígeno surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, otras especies activadas de oxígeno sin embargo se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 (Halliwell, 1991).

Fuentes endógenas de los radicales libres.

La cadena mitocondrial de transporte de electrones.

La cadena de transporte de electrones no funciona de manera perfecta y es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. De hecho, se calcula que entre el 2 y el 5% de los electrones transportados por la cadena de transporte de electrones mitocondrial, en estado IV o condiciones de reposo (cuando todo el *ADP* está en forma de *ATP*), no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas *et al*, 1977; Frei, 1994). Para que la reducción del oxígeno sea completa su reducción requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante. Para ello, el citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria debe mantener estrechamente unidas, a su centro activo, todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta la formación de dos moléculas de H_2O (Benzi y Moretti, 1995). Por el contrario, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un

electrón directamente al O_2 , pero no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi y Moretti, 1995).

La especie radical así formada es el $O_2^{\cdot-}$, cuya producción es del orden de 10^{10} moléculas de $O_2^{\cdot-}$ por célula y por día (Ames *et al*, 1993) que realiza un daño *in situ*, pero también puede dismutarse formando H_2O_2 . El H_2O_2 sí es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de *RL* (Boveris *et al*, 1972).

La Reacción de Fenton-Haber-Weiss (genera radicales libres).

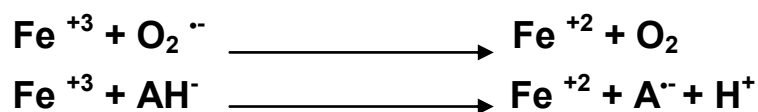
Se descubrió a finales del siglo XIX, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de H_2O_2 (una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición) y de Fe^{2+} (reactivo de Fenton) (Fenton, 1894). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{2+} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo (Haber y Weiss, 1932).

Así, se describió la reacción de reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{2+}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones, que hoy es denominada reacción de Fenton-Haber-Weiss, la cual se representa en general de la siguiente manera:



El hierro parece ser el metal más importante que actúa en los sistemas biológicos a pesar que se puede realizar la reacción con otros metales diferentes. El Fe^{2+} con facilidad se oxida a Fe^{3+} , que es químicamente más estable y muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy

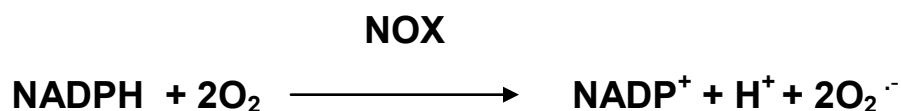
pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell y Gutteridge, 1986). El ion férrico puede, ser reducido por el ascorbato (Rawley y Halliwell, 1983).



No obstante, no se ha podido explicar claramente la reducción del H_2O_2 catalizada por metales en células de mamífero ya que hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina, etc.) que actúan como reserva de iones metálicos e impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell y Auroma, 1991; Rouault y Klausner, 1996).

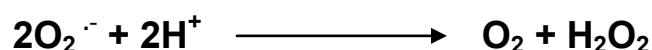
Las NADPH oxidasas.

La NADPH oxidasa, es una enzima que cataliza la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a partir de oxígeno y *NADPH*, de acuerdo con la siguiente reacción (Ago *et al*, 1999):



Esta enzima, que genera grandes cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$, se encuentra en la membrana citoplasmática de los fagocitos (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos) en ciertas etapas de su desarrollo (Babior, 1978; Batot *et al*, 1995; Segal *et al*, 1981). Las *NADPH* oxidasas forman una familia de enzimas conocidas como “NOX”, que es el nombre más generalizado (Lara-Ortíz *et al*, 2003; Arbiser *et al*, 2002; Cheng *et al*, 2001), también se les encuentra en el endotelio, el riñón y

el bazo, en donde producen pequeñas cantidades de $O_2^{\cdot-}$, aparentemente con fines de señalización. La función principal de la NADPH oxidasa en los fagocitos, es la de generar *ERO* que se encargan de matar organismos que están en contacto con los fagocitos. Estos organismos pueden ser ingeridos, en el caso de neutrófilos, monocitos y macrófagos, en el caso de eosinófilos que matan metazoos, tales como gusanos (Coffman *et al*, 1989). Los agentes oxidantes generados por la *NOX* incluyen H_2O_2 , que se produce por la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ (Babior, 1999-2004)



En los últimos años, seis homólogos de la *NOX* se han encontrado: *NOX1*, *NOX3*, *NOX4*, *NOX5*, *DUOX1*, y *DUOX2*. Junto con la del fagocito *NOX2/gp91phox*, los homólogos se han denominado la familia *NOX* de *NADPH* oxidasas. Estas enzimas comparten la capacidad de transporte de electrones a través de la membrana plasmática y la generación de $O_2^{\cdot-}$. Los mecanismos de activación, así como de distribución en los tejidos de los diferentes miembros de la familia son marcadamente diferentes (Bedard y Krause, 2007).

Las funciones fisiológicas de la familia *NOX* son entre otras: defensa, procesamiento postraducciona de proteínas, señalización celular, regulación de la expresión génica y diferenciación celular (Bedard y Krause, 2007).

La Xantina óxidoreductasa (XOR).

La XOR es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 (Schardinger, 1902). Actualmente se sabe que existen dos formas de la enzima, la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa, que se forma por modificaciones postransduccionales a partir de la forma deshidrogenasa. Ambas formas

enzimáticas catalizan la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos (Hille y Nishino, 1995; Hille, 1996).

Existen otras fuentes de radicales libres que constituyen los sistemas de transporte electrónico asociados a las membranas citoplasmática, mitocondrial y del retículo endoplásmico. Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P-450 y b5 (figura 9), que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila *et al*, 1981) y xenobióticos (Aust *et al*, 1993). Bajo la denominación de citocromos P-450 se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo ampliamente distribuidas entre los seres vivos. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster y Estabrook, 1993).

Los microsomas y peroxisomas (figura 9), son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa para la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen H_2O_2 (Boveris *et al*, 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del H_2O_2 formado en los peroxisomas (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994). Por otro lado, el citocromo P-450 tiene un papel importante en los microsomas en la detoxificación de xenobióticos (Philpot, 1991).

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado en la reducción del oxígeno por estas moléculas. Asimismo, también se produce H_2O_2 como producto secundario a partir de la dismutación del radical O_2^- , o bien catalizado enzimáticamente por la SOD.

Algunas enzimas como la óxido nítrico sintasa, la aldehído oxidasa, la dihidroorotato deshidrogenasa, la flavinproteína deshidrogenasa y la triptófano

dioxigenasa, también generan *RL* durante su ciclo catalítico (Aleman y Handler, 1967). Asimismo, existen enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, que producen radicales libres en el metabolismo de su sustrato, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White y Heckler, 1990).

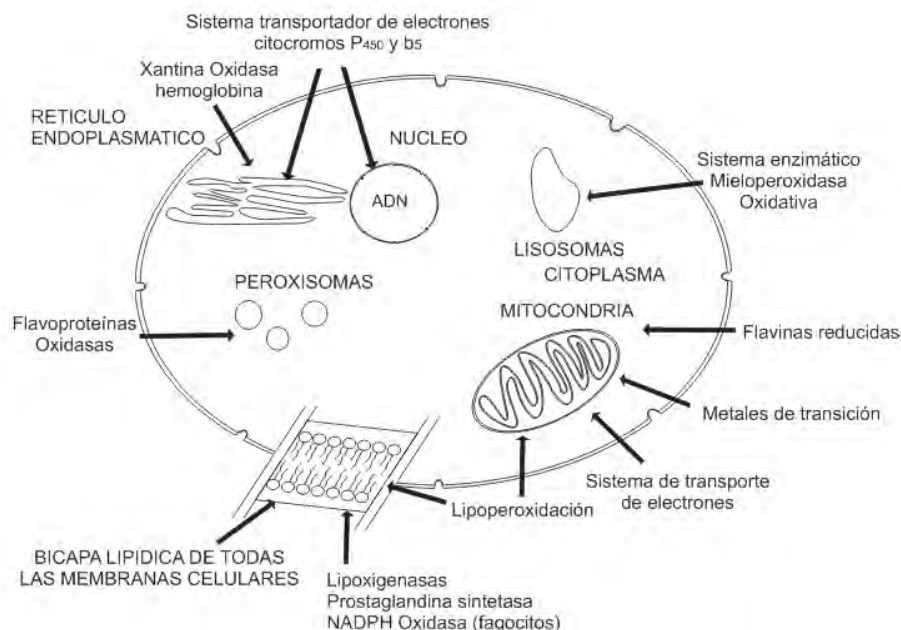


Fig 9. Distribución de los sistemas oxidantes en la célula (Modificado de Machlin y Bendich, 1987).

Fuentes exógenas de radicales libres.

La producción de *ERO* puede ser debida a la acción de radiaciones electromagnéticas (rayos x y γ), o a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β), solventes, hidrocarburos, aromáticos, contaminantes ambientales, tabaquismo, pesticidas (von Sonntag, 1994). También existen antineoplásicos como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina, anestésicos y algunos antibióticos que producen *ERO* (Doroshov y Davies, 1983). Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $HO^{\cdot}$.

Los factores ambientales tales como contaminantes aéreos fotoquímicos, la hiperoxia, los pesticidas, el humo del tabaco, los solventes, los anestésicos y los hidrocarburos aromáticos pueden ser otras fuentes de *ERO*. Estos agentes o bien poseen *RL*, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales por el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Trush *et al*, 1982).

Como hemos visto, la producción de cierta cantidad de *RL* es normal e inevitable (Slater, 1984). Estas especies tan reactivas serían capaces de causar un daño oxidativo si no fuese porque existe una cantidad de mecanismos antioxidantes que evitan dicho daño.

Anti-inflamatorios no esteroideos.

Los agentes anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) constituyen el grupo de fármacos más empleados en la terapéutica médica. Sin embargo, en los últimos años se han descrito numerosos efectos biológicos, adicionales a la clásica inhibición de la ciclooxigenasa (COX), que sintetiza prostaglandinas y los tromboxanos (Vane, 1971).

Los AINE's son una serie de compuestos que no presentan una similitud química, pero si comparten acciones terapéuticas y efectos moleculares, tienen tres acciones principales, antipiréticos, anti-inflamatorios y analgésicos, también disminuyen las constricciones bronquiales, musculares y producen irritaciones gastrointestinales (Vane, 1971 y Saldaña *et al*, 1996). En general es aceptado que los AINE's inhiben la actividad de las ciclooxigenasas, la *COX-1* constitutiva y la *COX-2* inducible (Frolich, 1997). Otros tienen acción dual e inhiben también la actividad de la lipoxigenasa y con ello impiden la formación de leucotrienos (Brogden *et al*, 1984).

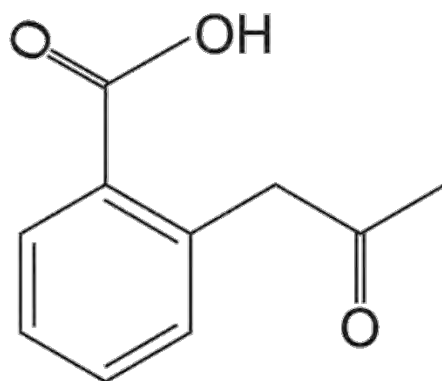
Los efectos de los AINE's resultan también de sus propiedades fisicoquímicas que probablemente impiden la interacción proteína-proteína en muchos tipos de membranas biológicas, ya que la mayoría son moléculas planas, sin carga, que pueden estar en ambientes lipídicos como las bicapas de las membranas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

También se ha reportado que los AINE's como el ácido acetilsalicílico, naproxen, nimesulide y piroxicam pueden disminuir el estímulo de la epinefrina o dibutilil- AMP_C sobre la liberación de glicerol, en adipocitos aislados de rata; el mecanismo reportado es a través de la inhibición en la actividad de la PKA dependiente de AMP_C , disminuyendo la fosforilación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y evitando que se transloque del citosol a la gota de grasa para llevar a cabo la lipólisis (Zentella de Piña *et al*, 2007).

Se piensa que los AINE's pueden también actuar como secuestradores de RL (Zentella de Piña, 1994). Los compuestos químicos precursores del ácido acetil salicílico, además de interferir en la síntesis de prostaglandinas, han resultado ser atrapadores de ERO . Un ejemplo de esto es el ácido benzoico, relacionado estructuralmente con el salicilato, que es un derivado descarboxilado e hidroxilado por el radical $HO\cdot$ (Sagone *et al*, 1987). Se ha demostrado que en animales íntegros el contenido de GT , cuando hay una administración aguda de etanol, disminuye, pero al aplicar piroxicam se revierte la disminución de GSH hepático (Zentella de Piña *et al*, 1994^a).

ASPIRINA.

El ácido acetilsalicílico o comercialmente conocido como aspirina es un AINE de la familia de los salicilatos, usado frecuentemente como antiinflamatorio, analgésico para el alivio del dolor leve y moderado, antipirético para reducir la fiebre y antiagregante plaquetario indicado para personas con alto riesgo de coagulación sanguínea (Lewis *et al*, 1983).



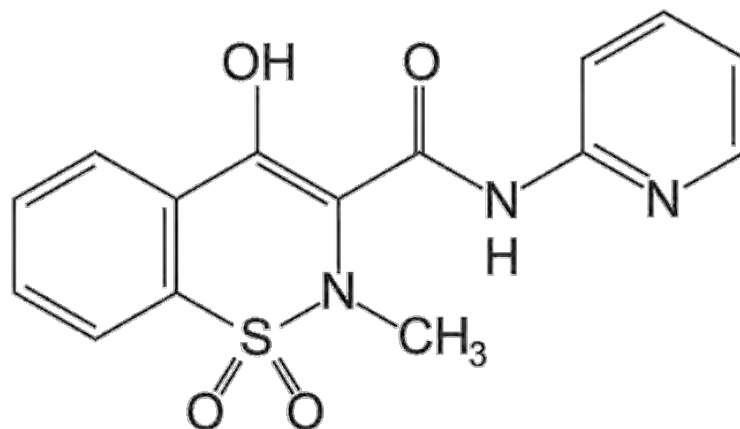
Ácido acetilsalicílico ó Ácido 2-(acetiloxi)-benzoico.

En 1971 Vane y colaboradores demostraron que concentraciones bajas de aspirina inhibían la producción enzimática de prostaglandinas, además de esta acción puede ser analgésico y antipirético, es el agente de este tipo más prescrito y un estándar en comparación con otros anti-inflamatorios y analgésicos.

La aspirina ingerida se absorbe principalmente como tal, se hidroliza parcialmente a ácido salicílico durante el primer paso a través del hígado, también es hidrolizada a ácido acético y salicilato por esterasas a nivel de los tejidos y la sangre. La aspirina puede detectarse en el plasma solamente por corto tiempo debido a la hidrólisis plasmática, hepática y eritrocitaria; por ejemplo, 30 minutos después de una dosis de 0.6g solamente el 27% del salicilato plasmático se encuentra en la forma acetilada. La vida media plasmática de la aspirina es de alrededor de 15 minutos pero puede modificarse dependiendo de la dosis. La del salicilato es de 2 a 3 horas en bajas dosis (Zentella de Piña, 2002).

PIROXICAM.

El piroxicam es un AINE utilizado para aliviar síntomas de la artritis reumatoide y la osteoartritis, la dismenorrea primaria, dolor postoperatorio, y actúa como analgésico.



Piroxicam ó (8*E*)-8-[hidroxi-(piridin-2-ilamino)metilidene]-9-metil-10,10-dioxo-10λ⁶-tia-9-azabicyclo[4.4.0]deca-1,3,5-trien-7-ona

Se ha demostrado que bloquea la síntesis de prostaglandinas por inhibición de la COX; inhibe la migración de polimorfonucleares y monocitos a las zonas inflamadas, disminuye la producción del factor reumatoide seropositivo (Abramson y Weissmann, 1989). Actúa disminuyendo la hipercontractilidad del miometrio y es eficaz en el tratamiento de la dismenorrea primaria. Se absorbe bien por la vía oral o rectal. La vida media plasmática es de alrededor de 50 horas y las concentraciones plasmáticas se mantienen con una administración única al día; con dosis de 10mg y 20mg alcanza el máximo de 3 a 5 horas después de la administración. Por vía intra-muscular, las concentraciones plasmáticas son más altas que por vía oral. Se metaboliza ampliamente, excretándose sin modificaciones por la orina y heces menos del 5% de la dosis diaria (Abramson y Weissmann, 1989; Zentella de Piña, 2002).

ANTECEDENTES.

Existen datos experimentales que indican que los mecanismos de daño tisular mediados por la presencia de los *RL*, contribuyen al establecimiento de enfermedades como son la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la diabetes, la porfiria, el cáncer y el daño hepático (Badawy, 1978; Bondy, 1992; Zentella de Piña, 1994^b; Gutteridge, 1994; Halliwell, 1996). Está bien documentado que una intoxicación aguda con etanol 4-6g/kg causa un estado de estrés oxidativo en hígado (Mallov y Bloch, 1956; Kalant *et al*, 1975; Zentella de Piña *et al*, 1997). El exceso de *RL* también aumenta la degradación peroxidativa de los lípidos (lipoperoxidación), que parece ser el mecanismo más importante relacionado con el daño celular durante el consumo agudo o crónico de bebidas alcohólicas (Di Luzio, 1966).

El consumo agudo y crónico de alcohol aumenta la producción de *ERO* y potencia la peroxidación de los lípidos, las proteínas y *ADN* (Conde de la Rosa *et al*, 2008). Diversos mecanismos participan en el proceso por el que se induce estrés oxidativo, como los cambios de estado redox, la producción de acetaldehído, el daño mitocondrial, la lesión en la membrana, la apoptosis, la hipoxia inducida por etanol, los efectos sobre el sistema inmune y la producción alterada de citoquinas, el aumento de los niveles de endotoxina y la activación de las células de Kupffer (Nieminen, 2003), la movilización del hierro, la modulación de la defensa antioxidante, especialmente del *GSH* mitocondrial, la oxidación monoelectrónica del etanol al radical 1-hidroxietilo y la inducción de la CYP2E1 (Lu y Cederbaum, 2006).

Las evidencias experimentales han permitido responsabilizar a los *RL* generados durante una intoxicación aguda, como iniciadores de la degradación peroxidativa de los ácidos grasos insaturados estructurales de las membranas celulares. Algunos autores, han planteado el empleo de sustancias atrapadoras de *RL* o bien de sustancias capaces de aumentar las defensas antioxidantes de las células,

para así contrarrestar el daño producido por *RL* (Zentella de Piña, 1994). Tanto el glutatión reducido como el oxidado se encuentran involucrados en el mecanismo de protección, contra los efectos de la oxidación metabólica del etanol, y como consecuencia un mayor consumo de *GSH* en hígado (Videla *et al*, 1980). El Glutatión total es la suma de *GSH* y *GSSG*, se emplea como indicador de la reserva antioxidante tisular, que se abate en sangre conforme el daño hepático es más severo. (Zentella de Piña *et al*, 1995).

En estudios con animales íntegros han mostrado que los AINE's: aspirina, naproxen, nimesulide, dipirone y piroxicam, pueden prevenir la lipoperoxidación hepática y, por lo tanto, el estrés oxidativo promovido por la intoxicación aguda de etanol (Zentella de Piña *et al*, 1993^a). Asimismo, ratas intoxicadas en forma aguda con etanol, incrementan el contenido de triacilglicérols, malondialdehído y *GSSG*, este último a expensas de una disminución del *GSH* (Zentella de Piña *et al*, 1994). Sin embargo, al administrar simultáneamente etanol y piroxicam, la oxidación del glutatión y los efectos deletéreos antes mencionados se atenúan considerablemente, y la concentración de etanol en sangre también disminuye significativamente (Zentella de Piña *et al*, 1992).

El etanol administrado *in vivo* en una dosis 4-6g/kg, produce un decaimiento en la poza de glutatión hepático (MacDonald *et al*, 1977.; Videla *et al*, 1980.; Videla y Valenzuela, 1982; Zentella de Piña *et al*, 1994b.; Choi *et al*, 2000). También Viña y colaboradores encontraron que si se incuban hepatocitos con etanol [20mM] el contenido de glutatión disminuye hasta en un 40%. Sin embargo cuando incubaron simultáneamente con pirazol (un inhibidor de la alcohol deshidrogenasa), se evitó la acumulación del acetaldehído y en consecuencia no disminuyó el *GSH* (Viña *et al*, 1980). El acetaldehído proveniente del metabolismo del etanol, puede reaccionar con el glutatión en forma no enzimática. De igual manera, al administrar en ratas acetaldehído por vía orogástrica, se induce una disminución de los niveles de *GT* en hígado (Videla y Villena, 1986). Sin embargo, puesto que la velocidad de reacción entre el acetaldehído y el *GSH* es tan solo del 6% de la

velocidad en que desaparece el *GSH* hepático después de la administración de etanol (Speisky *et al*, 1985), se puede concluir que el acetaldehído no es el único responsable de la disminución del *GSH* en hígado.

Algunos trabajos reportan que en ratas intoxicadas en forma aguda con etanol, se disminuye la síntesis de *GSH*, ya que se observa una inhibición del 30% aproximadamente en la actividad de la enzima γ -glutamylcisteina sintetasa, que es la enzima limitante en la síntesis de *GSH* (Lauterburg *et al*, 1984; Speisky *et al*, 1985; González *et al*, 1988; Choi *et al*, 2000). Otro de los factores que pueden afectar el decaimiento en los niveles de glutatión es un aumento en el eflujo hacia el torrente sanguíneo (Speisky *et al*, 1985; Choi *et al*, 2000).

In vitro, el etanol produce también una disminución de los niveles de glutatión total en hepatocitos aislados (Matuz, 2005), el cual puede ser revertido cuando los hepatocitos se incuban simultáneamente en presencia de algunos AINE's, como la aspirina, el piroxicam o el meloxicam en una concentración 1 μ M (Hernández, 2006). Sin embargo, no queda claro el mecanismo a través del cual estos fármacos pueden revertir los efectos deletéreos del etanol, y en especial, el decaimiento del glutatión. Así, de acuerdo a los antecedentes arriba mencionados, el etanol puede modificar la concentración intracelular de glutatión en células hepáticas a través de tres mecanismos distintos: I) por un aumento en la producción de radicales libres, II) por una disminución en la actividad de la enzima γ -glutamylcisteina sintetasa o bien, III) por un aumento en la salida de glutatión desde los hepatocitos hacia el torrente sanguíneo. Dado que los AINE's podrían ejercer su efecto a través de cualquiera de estos tres mecanismos, en este trabajo buscamos dilucidar el mecanismo a través del cual los AINE's (en especial, aspirina y piroxicam) evitan el decaimiento de la poza de glutatión en hepatocitos tratados con etanol.

Hipótesis.

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) evitan parcialmente el descenso de GSH total causado por etanol, mediante un aumento en la síntesis de glutatión, o a través de una alteración en el eflujo del glutatión.

Objetivo general

Obtener información para entender mejor el mecanismo a través del cual los AINE's (aspirina y piroxicam) evitan el decaimiento de la poza del glutatión en hepatocitos tratados con etanol.

Objetivos particulares

Determinar si la disponibilidad de sustratos oxidables y de aminoácidos influye sobre los niveles del glutatión e investigar si el etanol y los AINE's modifican este efecto.

Determinar la actividad de la glutamato cisteína ligasa en presencia de etanol y/o AINE's.

Estudiar el efecto del etanol sobre la salida del glutatión hepático y determinar si los AINE's pueden modificarlo.

Materiales y Métodos.

Reactivos.

En este trabajo se emplearon los siguientes reactivos, todos ellos de grado analítico: éter de etilo anhídrido (*EMD Chemicals Inc.*), alcohol etílico absoluto anhidro, dextrosa anhidra, $MgCl_2$, $MgSO_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , *EDTA*, ácido clorhídrico (*J.T.Baker*), L-serina, Perhidrol 30% H_2O_2 . NaCl (*MERCK*), azul brillante de Coomassi, ácido ortofosfórico, collagenasa Tipo IV de *Clostridium hystoliticum*, DL-metionina, L-glutamina, glicina, DL-Buthionine-[S,R]-sulfoximina (*BSO*), ácido acetilsalicílico (aspirina), 4-Hydroxy-2-methyl-3-(parid-2-yl-carbamoyl)-2H-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide (piroxicam), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (*NADPH*), 5, 5'-dithi-bis ácido 2-nitrobenzoico (*DTNB*), L-glutación oxidado, ácido-L-glutámico, L- α -aminobutírico, adenosin-5'-trifosfato (*ATP*), Tris[hidroximetil]aminometano, ácido-N-tris-(hidroximetil)-2-amino etano sulfónico (*TES*), molibdato de sodio, citrato de sodio, $NaHCO_3$, KCl, acetaldehído (*SIGMA Chemical Company*), ácido perclórico ($HClO_4$) (*Mallickrodt Baker*), glutatión reductasa (*ROCHE*).

Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 220 g de peso corporal. Se mantuvieron dos animales por jaula con cama de pino (Harlan Sani-Chips) estéril, las ratas estuvieron aisladas y la temperatura se mantuvo en un rango de 22 a 26°C con acceso libre al alimento (Harlan con 18% de proteína) y consumieron agua *ad libitum*.

Aislamiento de hepatocitos.

Los hepatocitos se aislaron por el método de Berry y Friend (1969), con las modificaciones descritas por Guinzberg *et al*, (1987). Las ratas alimentadas y con ayuno de 48 h fueron anestesiadas con éter de etilo anhídrido; se canalizó la vena porta y se perfundió *in situ* con una solución de Ringer-Krebs-bicarbonato sin glucosa, a un pH de 7.4, con 0.1% de collagenasa Tipo IV, y previamente saturada

con 95% de O₂ y 5% de CO₂. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión con azul de tripán, y por la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (*LDH*) de acuerdo al método de Bergmeyer *et al*, (1965). Los experimentos se realizaron sólo cuando la viabilidad de los hepatocitos fue superior al 85%.

Experimentos con hepatocitos.

Se incubaron hepatocitos (2×10^6 células en 1 ml de Ringer-Krebs-Henseleit (*RKH*), 1932) provenientes de ratas alimentadas y de ratas con 48 h de ayuno. Esto se realizó con el fin de conocer los niveles de glutatión total en ambos grupos de ratas a diferentes tiempos (0', 15', 30', 60') de incubación. Posteriormente para estimular la síntesis de glutatión, en los hepatocitos provenientes de ratas con ayuno, se incubaron en presencia de aminoácidos precursores de la síntesis del glutatión: L-glutamina [5mM], glicina [2mM], L-serina [1mM] y metionina [0.2mM] (Estrela *et al*, 1988). Así mismo, se incubó en ausencia/presencia de los siguientes compuestos: glucosa [10mM], etanol [50mM], BSO (Buthionina-[S,R]-sulfoximina) ([0.05mM], [0.1mM], [0.5mM]), aspirina [1×10^{-6} M] y piroxicam [1×10^{-6} M], y se tomaron muestras a diferentes tiempos (0', 15', 30', 60') de incubación, para medir el contenido de glutatión total.

Determinación de Glutatión total

Al finalizar el periodo de incubación la suspensión celular se centrifugó a 90 x g durante un minuto a 4°C, de inmediato se eliminó el sobrenadante y al precipitado (las células), se le agregaron 100µl de HClO₄ [2M] frío. Después se centrifugó a 9,000 x g durante 5 minutos a 4°C, del sobrenadante se tomó una alícuota y se determinó glutatión total de acuerdo al método de Akerboom y Sies (1981). En una cubeta de cuarzo se agregaron 0.89ml de buffer de fosfatos [0.1M] a un pH 7, más 0.01ml de la muestra, se agitó y se agregó 0.05ml *NADPH* (β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) diluido en una solución de bicarbonato (2 mg/0.5ml NaHCO₃ al 0.5%), se agitó y se agregó 0.02ml de *DTNB* (5, 5'-dithi-bis ácido 2-nitrobenzoico) diluido en una solución de bicarbonato (1.5mg/ml NaHCO₃

al 0.5%), se agitó y se agregó 0.03ml de la enzima glutatión reductasa (*ROCHE*) (10 μ l/90 μ l buffer), se agitó y se leyó a 412nm en un espectrofotómetro Beckman DU640, los cálculos se realizaron tomando como referencia una curva estándar de GSSG de *SIGMA*.

Actividad de la glutamato cisteína ligasa.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-220g de peso corporal. Los animales fueron sometidos a un periodo de pre-acondicionamiento por una semana con disposición de alimento y agua *ad libitum*. Para medir la actividad de la glutamato cisteína ligasa se uso una modificación del método de Sekura y Meister (1977). Los animales fueron decapitados y desangrados e inmediatamente se extrajo 1g de hígado y se agregaron 5 ml de buffer Tris-HCl [150mM] a pH 8.2, enseguida se homogeneizó vigorosamente y se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 15 min, se recuperó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 105,000 x g a 4°C durante 60 min nuevamente se recuperó el sobrenadante y esta fracción citosólica fue usada para medir la actividad de la enzima en presencia de L-glutamato, L- α -aminobutírico (un sustrato alternativo para la cisteína), y *ATP*, en presencia/ausencia de etanol, aspirina, piroxicam, acetaldehído y H₂O₂.

Procedimiento: En tubos de vidrio de 5ml se agregaron: 50 μ l de la fracción citosólica con una concentración fija de MgCl₂ 5mM, y concentraciones variables de cada uno de los sustratos antes mencionados y concentraciones fijas de los sustrato restantes, para la caracterización cinética de la *GCL* (Sekura y Meister, 1977), posteriormente los sustratos se usaron a las siguientes concentraciones ATP-MgCl₂ 7.5mM, glutamato 20mM, L- α -aminobutírico 15mM, etanol 10-100mM, aspirina 10nM-10mM, piroxicam 10nM-10mM, acetaldehído 0.001-1mM, y el H₂O₂ 1-100 μ M, en un volumen final de 1ml con buffer Tris-HCl [150mM] a pH 8.2, en seguida se incubó a 37°C (excepto el acetaldehído a 25°C), durante 30 min, terminado el periodo de incubación se tomaron 200 μ l y se agregó 1.6ml de la mezcla de reacción (2:1 molibdato de amonio 4.2% / verde de malaquita

hidrocloruro 0.045%), inmediatamente se agregaron 200 μ l de citrato de sodio 34% y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, pasado este tiempo se leyó a 660nm en un espectrofotómetro Beckman DU640.

La actividad fue calculada determinando la cantidad de fosfato liberado de acuerdo al método de Lanzetta *et al*, (1979), tomando en cuenta que para que se forme el dipéptido γ -glutamilcisteína se requiere la energía liberada de la hidrólisis de una molécula de *ATP* y, como resultado, de esta se libera fosfato en una estequiometría de 1:1 con el dipéptido γ -glutamilcisteína o γ -glutamilaminobutírico.

Puesto que la determinación de la actividad de la *GCL* se efectuó en un extracto citosólico y no con la enzima purificada, se midió la actividad inespecífica de *ATPasa* en los extractos (Figura 1), así como también se realizaron ensayos en presencia y ausencia de *BSO* [0.5mM], que es un inhibidor específico para la enzima glutamato cisteína ligasa (Griffith and Meister, 1979.; Estrela *et al*, 1988). Para ello, la fracción citosólica se preincubó a 37° C durante 30 min en presencia y ausencia de *BSO* [0.5mM]. Posteriormente, la reacción se inició por la adición de los sustratos indicados (*ATP* [7.5mM], L-glutamato [20mM] y L- α -aminobutírico [15mM]), y se determinó la cantidad de fósforo liberado al final del ensayo. Como puede observarse en la Figura 1, la actividad inespecífica de *ATPasa* en el extracto corresponde a menos del 20% del fosfato liberado (Fig. 1, columna 2) y el *BSO* inhibe casi un 80% la cantidad de fósforo liberado por el extracto después de 30 minutos de incubación (Figura 1, columna 5), lo que corrobora que en nuestras condiciones de ensayo, la mayoría del fósforo liberado durante los ensayos es resultado de la actividad específica de la *GCL*.

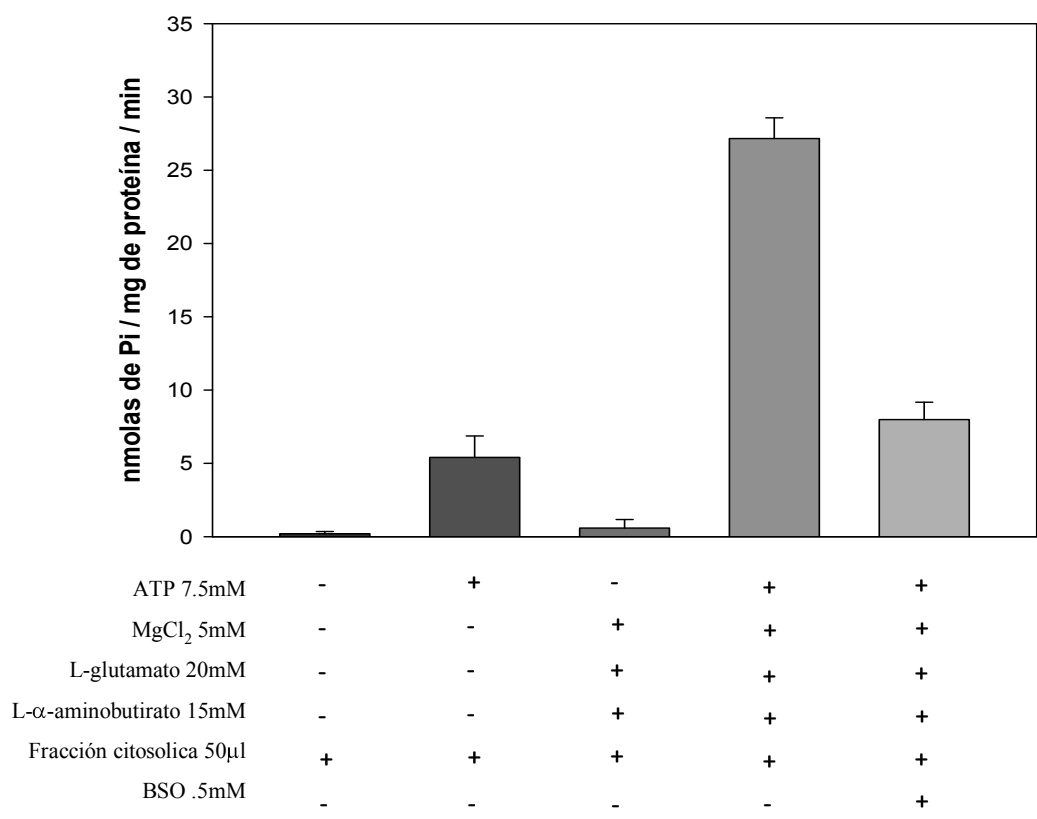


Figura 1. Ensayo de la actividad de la enzima *GCL* en presencia (+) o ausencia (-) de los metabolitos indicados. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n = 3)

Determinación de proteína.

Para la determinación de proteína se tomaron 100μl de la fracción citosólica, posteriormente se les agregó 5ml de solución Bradford (azul brillante de Coomassi 0.01%, etanol 4.7%, y ácido ortofosfórico 8.5%). Los cálculos se realizaron tomando como referencia una curva estándar de albumina sérica bovina (Bradford, 1976).

Experimentos de Perfusión.

Se realizó a partir de hígados provenientes de ratas alimentadas, perfundidos a través de la vena porta (perfusión cerrada), con una solución de Ringer-Krebs-fosfato, a la que se adicionaron los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican (en un volumen final de 20mL): glucosa [10mM], albúmina al 1%,

calcio [1.2mM] y en ausencia ó presencia de etanol [50mM] y aspirina [1μM]. Durante la perfusión se muestrearon 200μl cada 2 min durante 14 min, se agregó un volumen equivalente de HClO₄ [4M] con EDTA [0.8mM] en frio, inmediatamente, se determinó glutatión total de acuerdo al método de Akerboom y Sies (1981).

Eflujo de glutatión total *in vivo*.

Se utilizaron ratas Wistar en las condiciones previamente señaladas, se separaron en cuatro tratamientos y se les administró, por vía orogastrica: a) glucosa 9.3g/kg (equivalente al aporte isocalórico del etanol), b) etanol 5g/kg, c) etanol 5g/kg + piroxicam 10mg/kg, d) etanol 5g/kg + glibenclamida 30mg/kg. Cuatro horas después de la administración (que es tiempo en el que se presenta un mayor efecto del etanol 4-5g/kg, sobre el eflujo del glutatión hepático (Speisky, *et al*, 1985; Choi, *et al*, 2000)), las ratas fueron anestesiadas con éter etílico anhidrido; se realizó una incisión de la piel y el músculo en la línea media ventral del abdomen, se tomaron 200μL de la muestra de sangre de la vena cava inferior, tanto por debajo (prehepática), como por encima del punto de confluencia con la vena hepática (posthepática), considerando que el punto por debajo de la vena hepática fue superior a la de la vena renal. Se agregó un volumen equivalente de HClO₄ [4M] con EDTA [0.8mM], y al mismo tiempo se tomó una muestra de 200mg de tejido hepático, se agregaron cuatro volúmenes equivalentes de HClO₄ [2M] con EDTA [0.8mM]. Ambas muestras se homogenizaron y centrifugaron a 9,000 x g durante 5 minutos a 4°C y del sobrenadante se determinó el contenido de glutatión total de acuerdo al método de Akerboom y Sies (1981).

Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron usando pruebas estadísticas paramétricas, para lo cual se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), o bien la prueba de *t* de Student (Jandel Scientific, 1994). El ajuste de los parámetros de cinética enzimática se realizó por medio de regresiones no lineales.

Resultados.

El ayuno en ratas disminuye el contenido de glutatión total en hepatocitos.

En la primera serie de experimentos se observó que los niveles de glutatión total se encontraron disminuidos en hepatocitos de ratas ayunadas comparados con los de ratas alimentadas (Figura 1), esto concuerda con lo reportado en la literatura (Videla *et al*, 1980; Viña, 1986; Lu, 1999; Matuz, 2005). De tal manera que la alimentación es una variable de la cual depende directamente la poza de glutatión hepático. En los experimentos con hepatocitos tanto de ratas alimentadas como de ayunadas, el contenido de glutatión total disminuyó hasta en un 40% a partir de los primeros 15 minutos de incubación. Esta disminución se explica en parte porque el medio de incubación carece de nutrientes esenciales para el funcionamiento correcto de la célula (Lu, 1999), lo que obliga a las células a consumir sus reservas energéticas de proteínas.

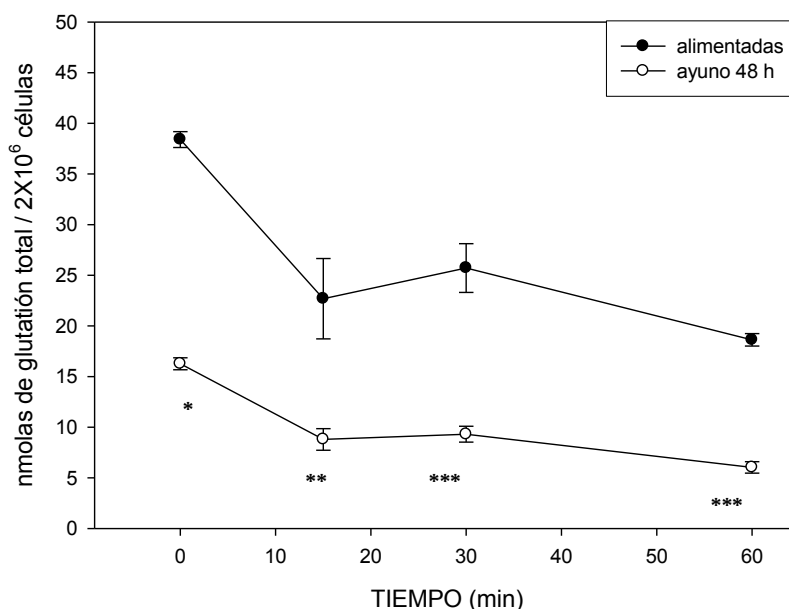


Figura 1. Contenido de GT en hepatocitos aislados e incubados con RKH en ausencia de sustratos. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=4-6). *t test Student*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

La presencia de aminoácidos mantiene la poza de glutatión en hepatocitos aislados e incubados en solución Ringer-Krebs-Henseleit.

En vista de los resultados anteriores y tomando en cuenta que algunos autores han sugerido que el etanol afecta la síntesis de glutatión (Lauterburg *et al*, 1984; Speisky *et al*, 1985; González *et al*, 1988; Choi *et al*, 2000), nos enfocamos en este trabajo a usar como modelo experimental a hepatocitos provenientes de ratas con 48 h de ayuno, para así promover la síntesis de glutatión al incubarlos con los aminoácidos precursores: L-glutamina [5mM], glicina [2mM], L-serina [1mM] y metionina [0.2mM] (Estrela *et al*, 1988). En estudios previos al incubar hepatocitos provenientes de ratas alimentadas en presencia de estos aminoácidos, no se observó ningún estímulo sobre la síntesis de glutatión (Matuz, 2005).

Al incubar con aminoácidos a los hepatocitos aislados, se observó que conforme transcurre el tiempo de incubación, los niveles de glutatión total no se modificaron, posiblemente debido a que los aminoácidos precursores promueven la síntesis de *GSH*, manteniendo su concentración constante durante el periodo de incubación (Figura 2). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado *in vivo*, ya que al alimentar nuevamente a animales sometidos a 48 h de ayuno, se observa como los niveles de glutatión se restablecen (Tateishi y Sakamoto, 1983).

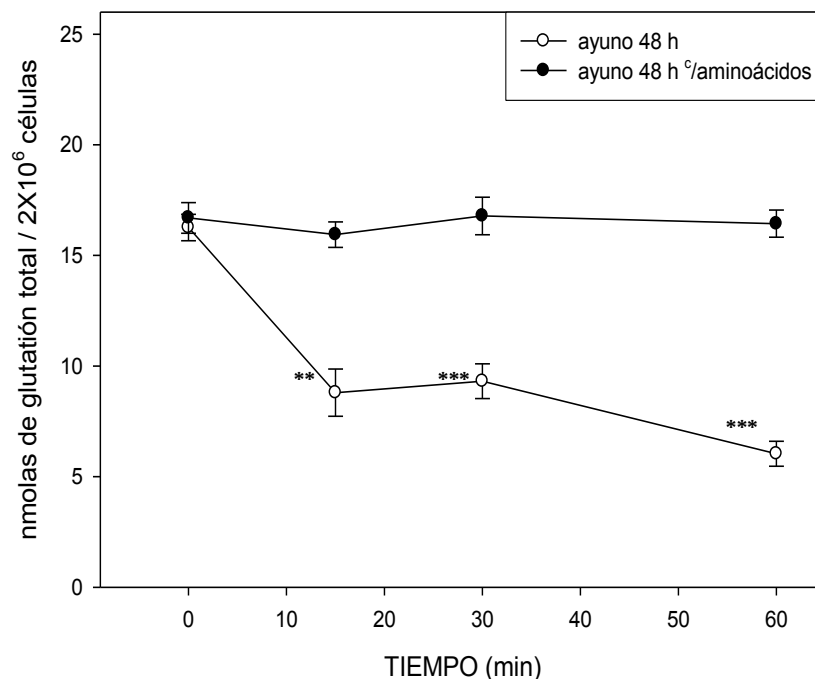


Figura 2. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con ayuno e incubados en RKH con aminoácidos (L-glutamina 5mM, glicina 2mM, L-serina 1mM y metionina 0.2mM). Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=5-6). *t test Student*. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Posteriormente, se estudio el efecto de concentraciones crecientes de DL-Buthionine-[S,R]-sulfoximina (BSO), sobre los hepatocitos aislados de rata en presencia de aminoácidos. El BSO es un inhibidor específico e irreversible para la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), que es la enzima limitante en la síntesis de glutatión (Griffith y Meister, 1979; Griffeth, 1982; Estrela *et al*, 1988); el BSO es un inhibidor de tipo competitivo y tiene múltiples ventajas sobre otros inhibidores previamente reportados (Griffeth, 1982).

En la Figura 3 se puede observar una disminución significativa en el contenido total de GSH cuya magnitud es mayor a concentraciones crecientes de BSO en hepatocitos aislados. Puesto que al bloquear la síntesis de glutatión con el BSO, el contenido de glutatión vuelve a decaer conforme transcurre el tiempo de incubación de los hepatocitos, aún en presencia de aminoácidos. Esto sugiere fuertemente que la adición de los aminoácidos al medio de incubación, estimula la síntesis de glutatión en hepatocitos, lo que explica por qué en ausencia de

inhibidor, el contenido de glutatión se mantiene constante durante todo el tiempo de incubación (Figura 2)

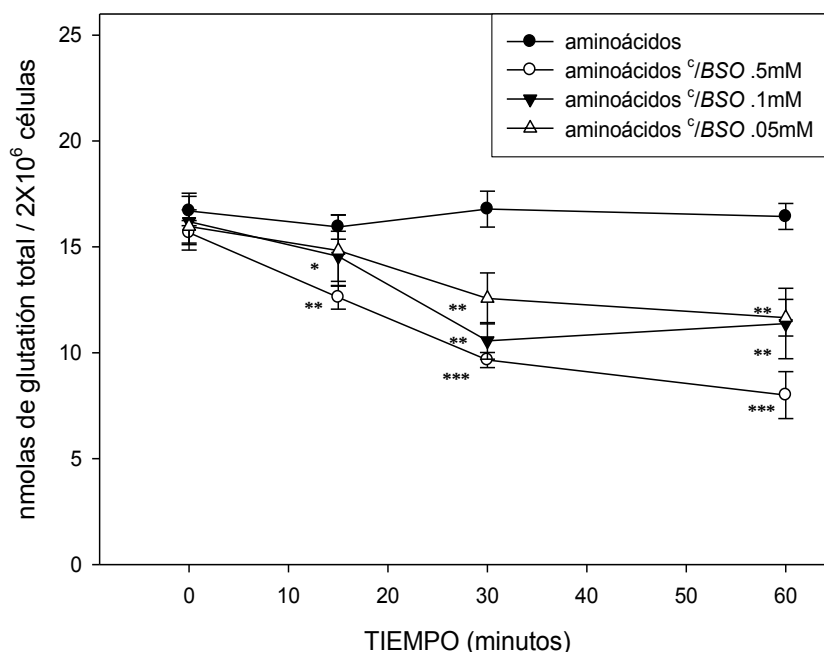


Figura 3. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con ayuno e incubados en RKH con BSO y aminoácidos tal y como se señala en la Fig 1. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=4-5). one-way-ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Aminoácidos vs Aminoácidos ^c/BSO.

El etanol disminuye el contenido de glutatión total en hepatocitos aislados.

Para estudiar el efecto del etanol sobre el contenido de glutatión, se utilizó una concentración de etanol [50mM], porque existen datos en la literatura que demuestran que en hepatocitos aislados, dicha concentración aumenta el contenido de triacilgliceridos y sustancias reactivas al ácido tiobarbúrico, que son indicadores de estrés oxidativo (Saldaña-Balmori *et al*, 1996).

Cuando se incubaron hepatocitos de rata con 48 h de ayuno en presencia de etanol [50mM] (Figura 4), se observó también un decaimiento muy notable en la poza de glutatión, coincidiendo con lo reportado previamente en el animal integro (Videla *et al*, 1980) o *in vitro* (Matuz, 2005 y Hernández, 2006).

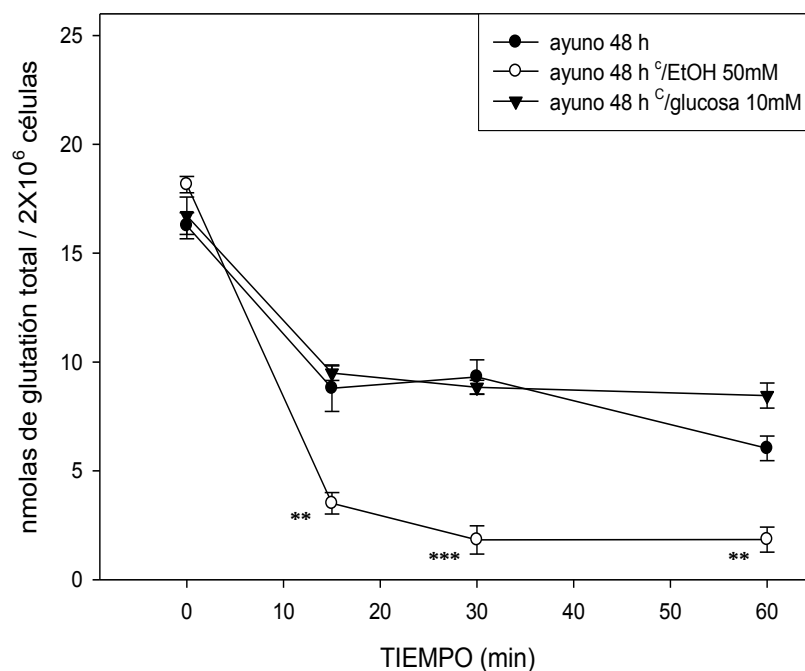


Figura 4. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con ayuno e incubados en *RKH*. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=4-6). *t test Student*. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ etanol [50mM] vs glucosa [10mM].

Es interesante observar también que la presencia de glucosa [10mM] en el medio de incubación, no impidió la disminución en la poza de glutatión, lo que indica que la ausencia de un sustrato oxidable, no es el factor determinante en la disminución de glutatión total.

Cuando los hepatocitos se incubaron con aminoácidos, la disminución sobre los niveles de glutatión provocada por la exposición al etanol aún se siguió observando, aunque con una menor magnitud (Figura 5). De igual forma, la presencia simultánea de aminoácidos y glucosa, no modificó la concentración de glutatión total en los hepatocitos aislados.

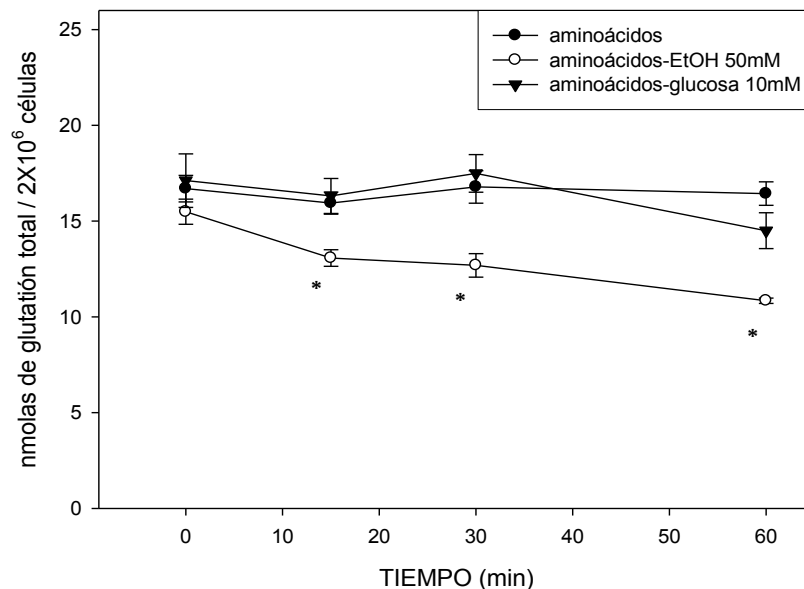


Figura 5. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con ayuno e incubados en RKH con etanol [50 mM] o glucosa [10 mM] y aminoácidos. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3-5). *t test Student*. * $p < 0.05$. etanol [50mM] vs glucosa [10mM].

Los AINE's revierten la disminución en el contenido de glutatión total provocada por el etanol.

En estudios con animales íntegros se ha demostrado que los anti-inflamatorios no esteroideos, pueden prevenir modificaciones de algunos indicadores de estrés oxidativo, como la lipoperoxidación y el contenido del glutatión hepático (Zentella de Piña *et al*, 1993; Zentella de Piña *et al*, 1994), por esta razón decidimos emplearlos en un modelo *in vitro*.

Cuando los hepatocitos se incubaron tanto en presencia de aminoácidos, como de etanol [50mM] y de los AINE's: aspirina [1×10^{-6} M] o piroxicam [1×10^{-6} M] (Figuras 6 y 7), no se observaron diferencias estadísticas en los primeros minutos de incubación. Sin embargo, se observó que a los 60 minutos de incubación la disminución en los niveles de glutatión total por acción del etanol no se presentó en presencia de los AINE's.

Existen tres posibilidades a demostrar, para explicar el efecto de los AINE's. Ya sea estimulando la síntesis del glutatión, favoreciendo su menor consumo o disminuyendo su eflujo desde los hepatocitos.

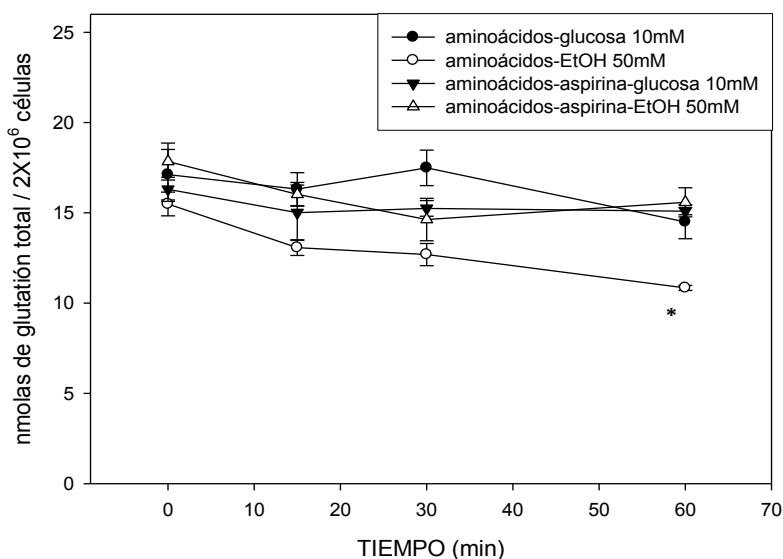


Figura 6. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con ayuno e incubados en RKH con aminoácidos, etanol [50mM], glucosa [10mM] y aspirina [1×10^{-6} M]. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3-4). *t test Student*. * $p < 0.05$. etanol [50mM] vs etanol [50mM] $\pm$ aspirina [1×10^{-6} M].

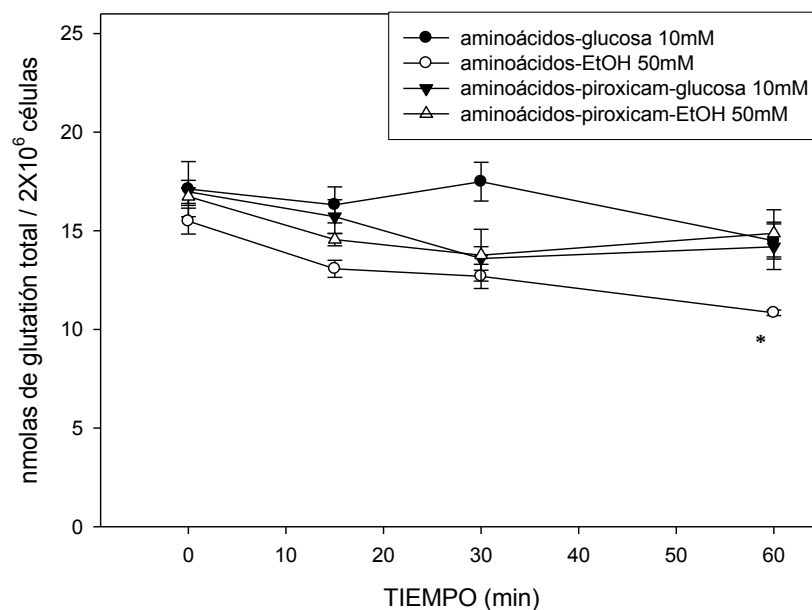


Figura 7. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con ayuno e incubados en RKH con aminoácidos y piroxicam [1×10^{-6} M]. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3-4). *t test Student*. * $p < 0.05$. etanol [50mM] vs etanol [50mM] $\pm$ piroxicam [1×10^{-6} M].

Caracterización enzimática de la GCL.

En la segunda parte de este trabajo nos enfocamos a investigar si el etanol y los AINE's pueden modificar la actividad de la GCL, que es la enzima limitante en la síntesis del glutatión. Aquí es importante considerar tal y como se mencionó en la sección de antecedentes, que existen trabajos que sugieren que el etanol *in vivo* puede afectar la síntesis de glutatión, disminuyendo aproximadamente un 30% la actividad de esta enzima (Lauterburg *et al*, 1984; Speisky *et al*, 1985; González *et al*, 1988; Choi *et al*, 2000).

Con la fracción citosólica obtenida de hígados de ratas alimentadas, previamente se realizaron experimentos de cinética enzimática para cada uno de los sustratos de la GCL. En la figura 8 se muestra la actividad específica de la GCL en función de la concentración de ATP, reportando las constantes cinéticas (V_{max} y K_m); cabe señalar que en resultados no mostrados, encontramos que a concentraciones superiores a 10mM de ATP, se presenta una inhibición por sustrato.

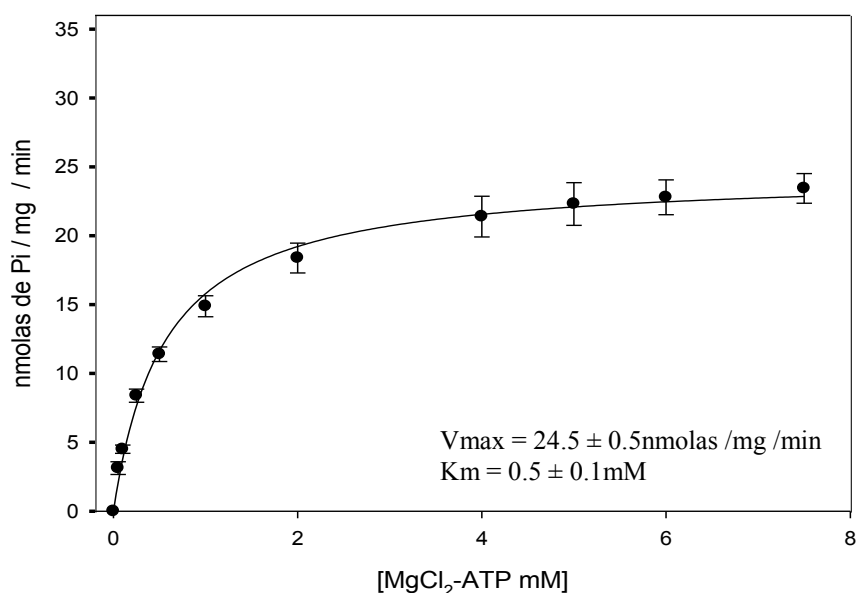


Figura 8. Actividad de la enzima GCL con concentraciones crecientes de ATP y concentraciones fijas de L-glutamato [20mM], L- α -aminobutírico [15mM]. Cada punto representa la media $\pm$ E. E. (n=3).

En la figura 9 se muestran las constantes cinéticas de la *GCL*, utilizando ahora como sustrato variable el L-glutamato; En la figura 10 se muestran para el L- α -aminobutírico, el cual se utilizó como un homólogo de la cisteína para evitar las complicaciones asociadas a la auto-oxidación de la cisteína. Tanto para glutamato como para L- α -aminobutírico, a concentraciones superiores a 20mM se observó inhibición por sustrato. De igual forma la afinidad de la *GCL* para estos dos sustratos es mucho mayor en comparación con la reportada para la *GCL* de riñón de rata (Seeling y Meister, 1985).

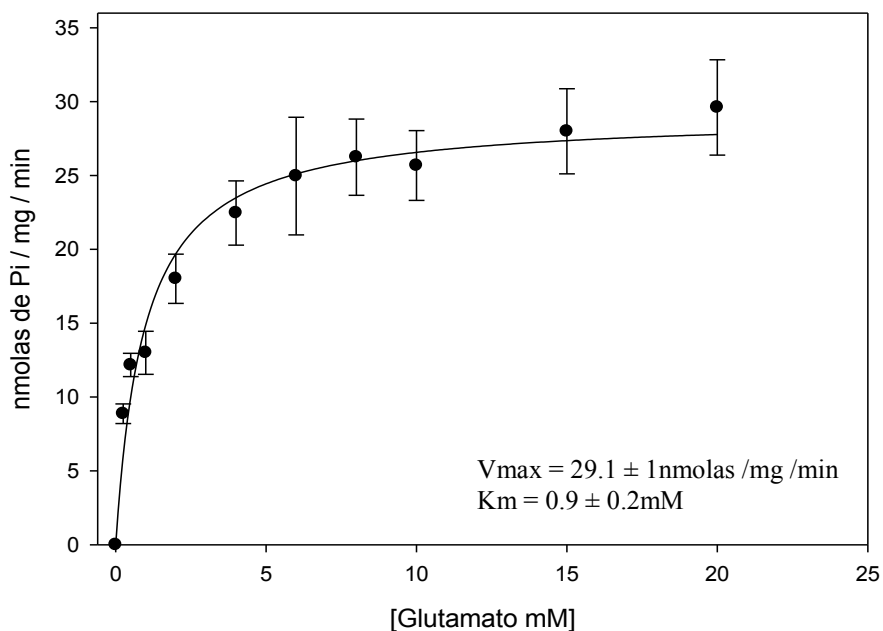


Figura 9. Actividad de la enzima *GCL* con concentraciones crecientes de L-glutamato y concentraciones fijas de *ATP* [7.5mM], L- α -aminobutírico [15mM]. Cada punto representa la media $\pm$ E.E. (n=3).

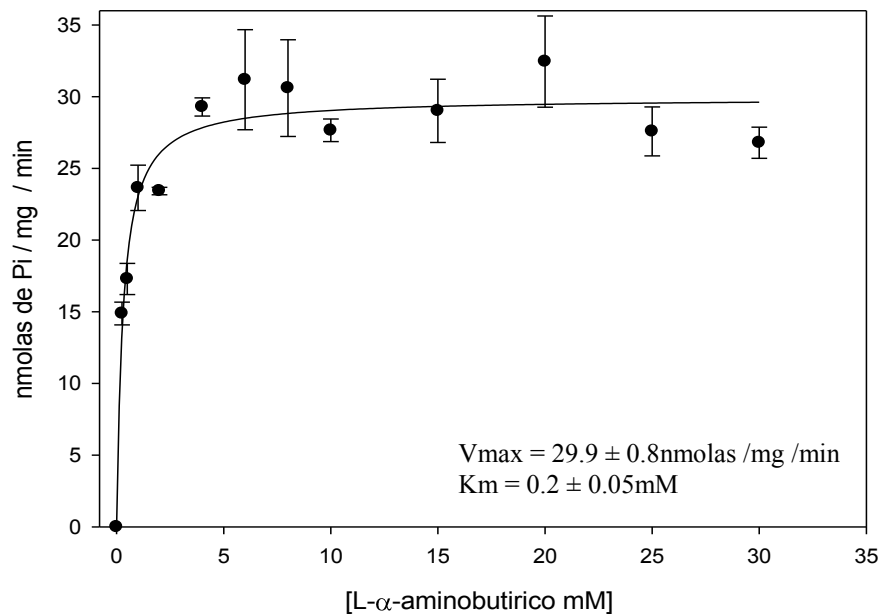


Figura 10. Actividad de la enzima GCL con diferentes concentraciones de L-α-aminobutírico y concentraciones fijas de ATP [7.5mM], y L-glutamato [20mM]. Cada punto representa la media ± E.E. (n=3).

El etanol *in vitro* no modifica la actividad de la GCL.

Se realizaron experimentos con concentraciones crecientes de etanol, en donde los extractos citosólicos se incubaron en presencia/ausencia de etanol durante 30 minutos a 37°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11 en la cual podemos observar que el etanol no causó ningún efecto en la actividad específica de la GCL.

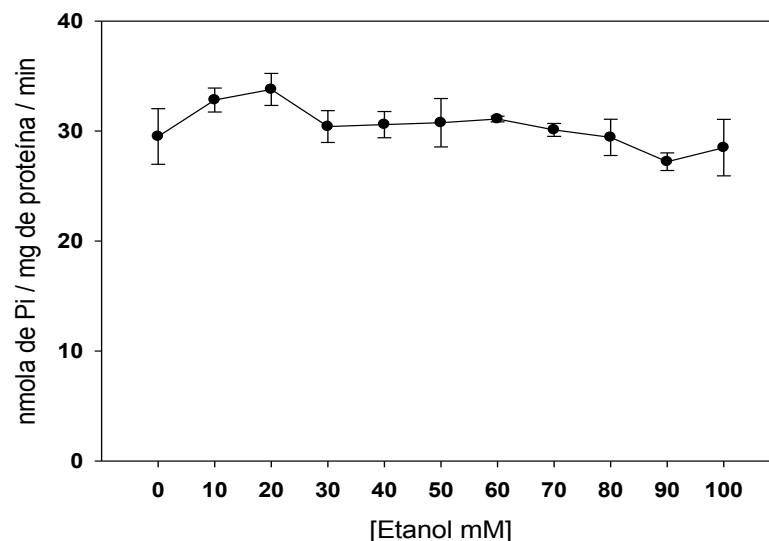


Figura 11. Efecto de concentraciones crecientes de etanol sobre la actividad específica de la *GCL*. La fracción citosólica se incubó durante 30 min a 37°C. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=4).

Los AINE's no modifican la actividad de la enzima *GCL*.

En las Figuras 12 y 13 se puede observar que tanto la aspirina como el piroxicam, en un amplio rango de concentraciones [10^{-8} – 10^{-4} M] no afectó la actividad específica de la *GCL*.

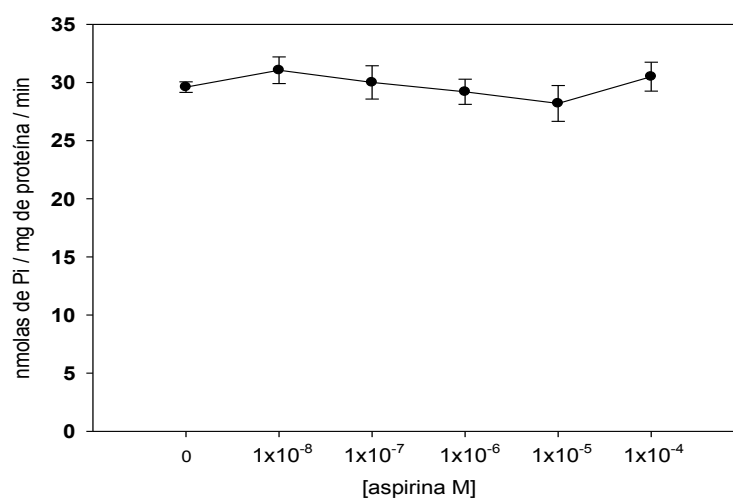


Figura 12. Efecto de concentraciones crecientes de aspirina sobre la actividad específica de la *GCL*. La fracción citosólica se incubó durante 30 min a 37°C. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=4).

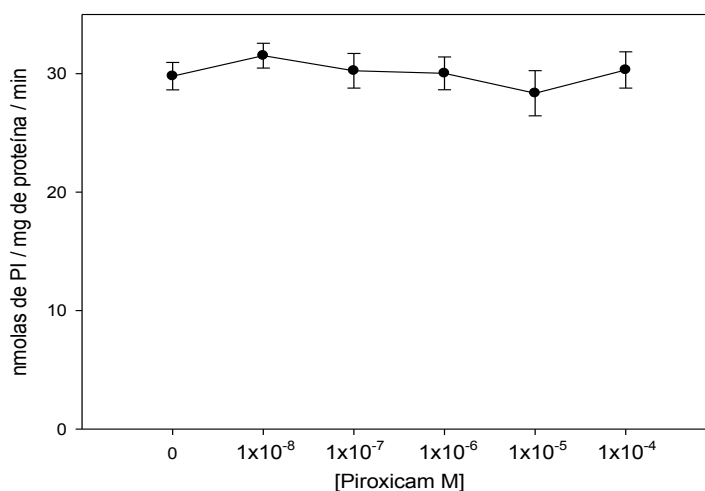


Figura 13. Efecto de concentraciones crecientes de piroxicam sobre la actividad específica de la GCL. La fracción citosólica se incubó durante 30 min a 37°C. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=5).

Tomando en cuenta los resultados anteriores podemos concluir que tanto el etanol como la aspirina y el piroxicam no afectan de manera directa la actividad de la glutamato cisteína ligasa en el modelo experimental empleado.

Efecto del acetaldehído sobre la actividad de la GCL.

Considerando que en el animal integro, se ha reportado que el etanol puede afectar la síntesis de glutatión causada por una disminución del 30% aproximadamente en la actividad de la GCL (Lauterburg *et al*, 1984; Speisky *et al*, 1985; González *et al*, 1988; Choi *et al*, 2000), cabe la posibilidad de que esta disminución sea ocasionada por alguno de los metabolitos generados durante el metabolismo del etanol. En este caso, el acetaldehído es el candidato mas probable, puesto que es el metabolito al cual se le responsabiliza como el causante del decaimiento en la poza de glutatión reducido (Viña *et al*, 1980).

Por este motivo se investigó si el acetaldehído modifica la actividad de la GCL, sin embargo, puesto que el punto de ebullición del acetaldehído es muy bajo, los extractos citosólicos se incubaron a 25°C en lugar de 37°C durante 30 min en

presencia de acetaldehído a concentraciones crecientes (Viña *et al*, 1980). Tal y como se esperaba en la figura 14 podemos observar que al incubar a 25°C la actividad de la enzima disminuyó significativamente al compararla con la incubada a 37°C esta disminución representa aproximadamente el 60% de la actividad total.

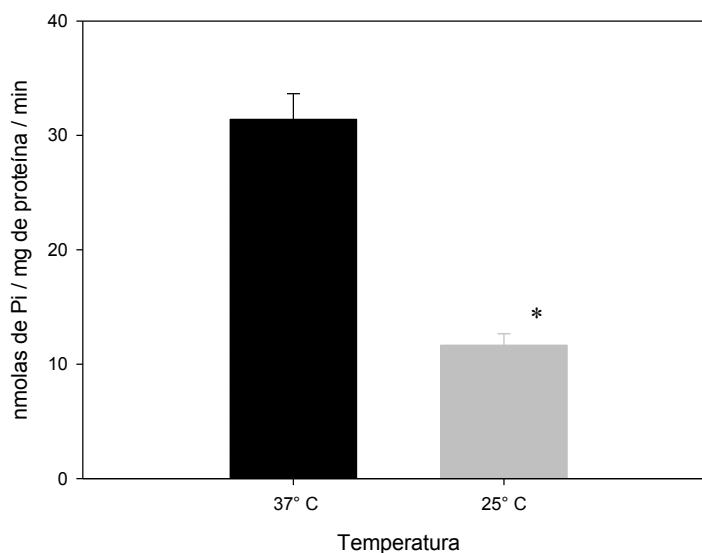


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la actividad específica de la GCL. La fracción citosólica se incubó en presencia de los sustratos (L-glutamato [20mM], L- α -aminobutírico [15mM] y ATP [7.5mM]) durante 30 min a 25°C. Cada punto representa la media $\pm$ E.E. (n=4-5). *t student* $p < 0.0001^*$.

En la Figura 15 se muestra como al incubar en presencia del acetaldehído no se presentó ningún efecto inhibitorio. Sin embargo, el acetaldehído es un compuesto sumamente volátil y su punto de ebullición es de 20.2°C por este motivo decidimos analizar que proporción de acetaldehído alcanza a evaporarse en nuestras condiciones experimentales y de esta forma realmente constatar el efecto que tiene el acetaldehído, o simplemente descartarlo porque se evapora rápidamente en las condiciones de este ensayo. Para la detección del acetaldehído se consideró su coeficiente de extinción, que se detectó a 278nm, debido a que tiene un grupo carbonilo que absorbe a esta longitud de onda (Gruen y McTigue, 1965). En la Figura 16 se muestra el espectro de absorción del acetaldehído [0.1M] el cual se monitoreo a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 min y 24 h), claramente podemos observar que la proporción de acetaldehído se mantuvo constante después de ser incubado durante 1 h a 25°C, que es el doble del tiempo

en que realizó este experimento. Por tal motivo tenemos certeza de que el acetaldehído no tiene tiempo a evaporarse significativamente durante la incubación, y que por tanto, como primer metabolito en la oxidación del etanol, no es capaz de modificar la actividad de la *GCL* en el rango de [1 μ M] a [1mM].

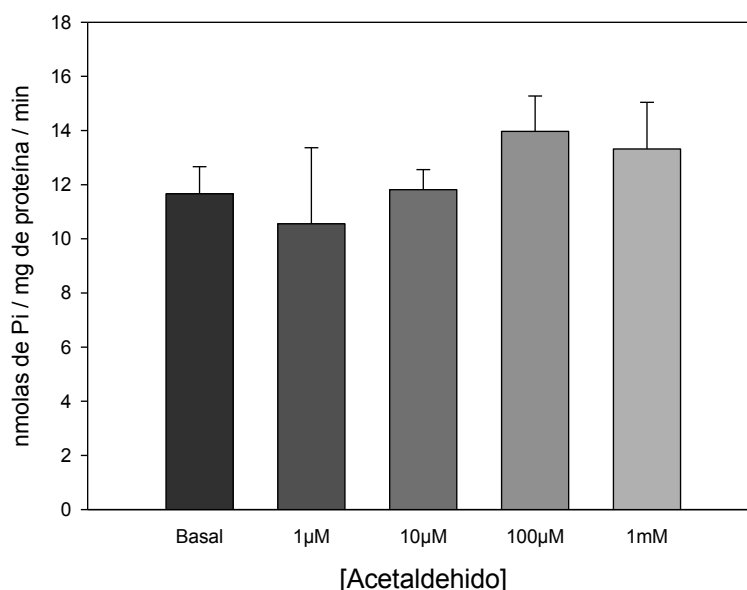


Figura 15. Efecto de concentraciones crecientes de acetaldehído sobre la actividad específica de la *GCL*. La fracción citosólica se incubó durante 30 min a 25°C. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3-5).

Estos últimos resultados contrastan con los hallazgos de Viña en 1980, quien publicó las primeras evidencias, en que se responsabiliza al acetaldehído, como el responsable de la disminución en el contenido de *GSH in vitro*. Sin embargo, por los resultados obtenidos en el presente trabajo, es claro que el acetaldehído no modifica el contenido de *GSH* hepático por medio de una inhibición en la síntesis de *GSH*, por lo que es probable que la disminución este determinada por una reacción directa entre el *GSH* y el acetaldehído. Esto ha sido sugerido por algunos otros autores, que observaron que el acetaldehído puede reaccionar tanto con el glutatión (0.475nmolas/min/ml) aumentando su consumo, como con la cisteína (2.64nmolas/min/ml), dando como resultado una disminución en el contenido hepático de glutatión (Speisky *et al*, 1988).

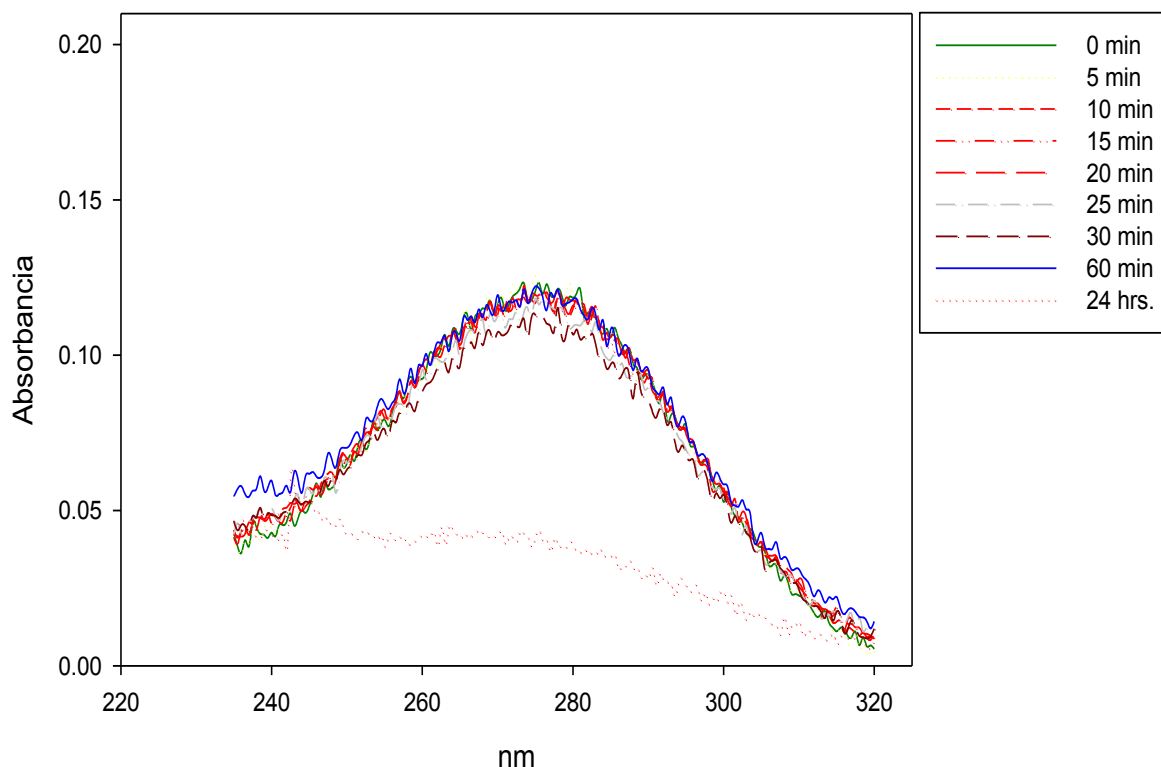


Figura 16. Espectro de absorción del Acetaldehído [0.1M] incubado 1 h a 25°C.

Efecto del H_2O_2 sobre la actividad de la GCL.

Como otro subproducto del metabolismo del etanol esta el H_2O_2 , se realizaron experimentos con esta molécula que es ampliamente considerada como un agente citotóxico, o incluso como una *ERO*, que aunque no es un radical libre *per se*, si puede generar algunos radicales como el radical $HO^\cdot$.

Hay reportes en la literatura que indican que durante el metabolismo del etanol se produce H_2O_2 y una gran cantidad de *ERO* (Cederbaum, 1987; Wu y Cederbaum, 2003; Cederbaum *et al*, 2009).). Cuando se determinó la actividad específica de la GCL en presencia del H_2O_2 a diferentes concentraciones [1-100 μ M] no encontramos diferencias significativas con ninguna de las concentraciones empleadas en comparación con el control (Figura 17).

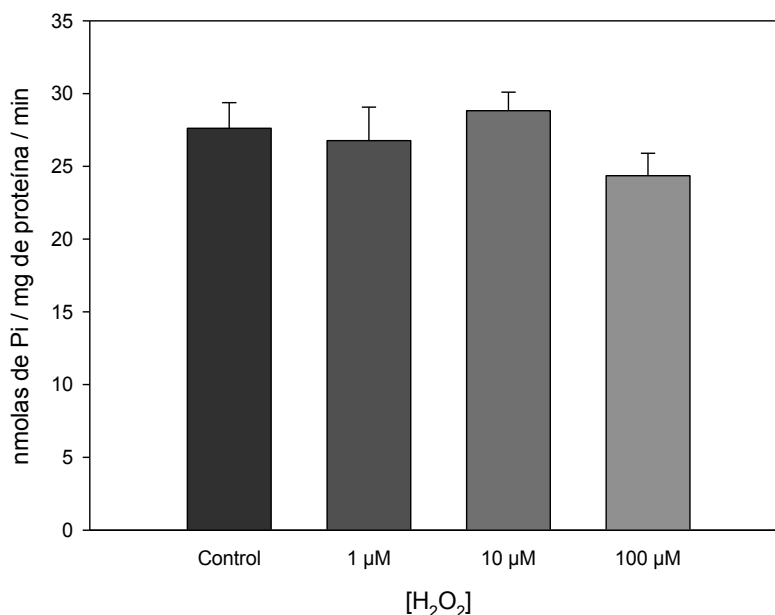


Figura 17. Efecto de concentraciones crecientes de H_2O_2 sobre la actividad específica de la GCL. La fracción citosólica se incubó durante 30 min a 37°C . Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=8).

En el hígado, existe una importante actividad de catalasa que se encuentra en los peroxisomas de las células hepáticas. La catalasa actúa descomponiendo H_2O_2 , e incluso participa en el proceso de oxidación del etanol (Lieber, 1994; Riveros-Rosas *et al*, 1997). Puesto que los extractos citosólicos en donde se ensayó la actividad de la GCL, pudieran tener una importante actividad de catalasa, que descompondría al H_2O_2 antes de que este interaccione con la GCL, se decidió inhibir a la catalasa con aminotriazol, para garantizar que el H_2O_2 no fuese descompuesto durante el ensayo.

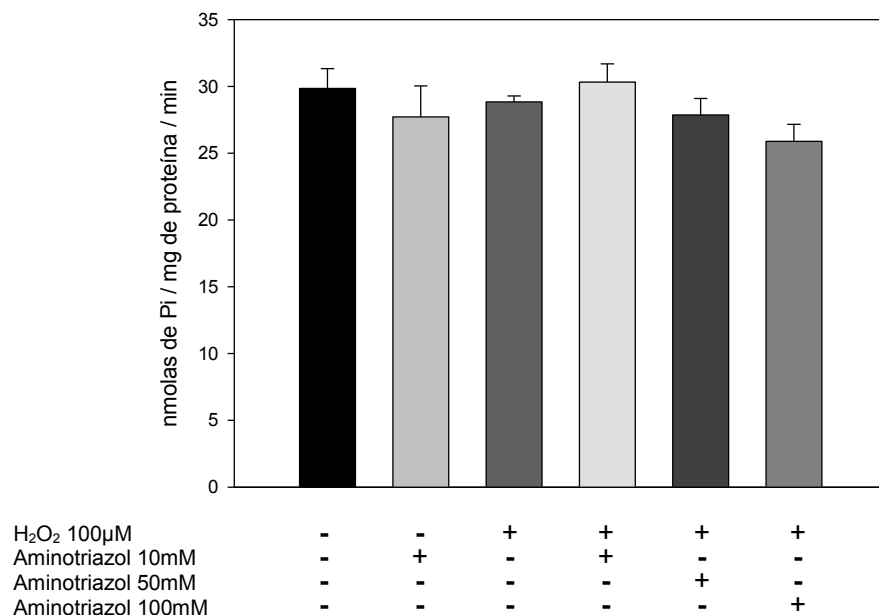


Figura 18. Efecto de H₂O₂ 100µM inhibiendo a la catalasa (con concentraciones crecientes de Aminotriazol), sobre la actividad específica de la GCL. La fracción citosólica se incubó durante 30 min a 37°C. Cada valor representa la media ± E.E. n = 8.

En la Figura 18 se observa como al inhibir al sistema de la catalasa con concentraciones crecientes de aminotriazol [10-100mM] y en presencia de H₂O₂ [100µM] que es considerada con una concentración citotóxica (Halliwell *et al*, 2000), no se presentó ningún efecto sobre la actividad de la enzima GCL.

Efecto del etanol y la aspirina sobre el flujo de glutatión en hígado perfundido *in situ*.

Uno de los mecanismos involucrados en el decaimiento de la poza de glutatión hepático, causado por una intoxicación aguda con etanol es un aumento en la salida de glutatión (Speisky *et al*, 1985; González *et al*, 1988; Choi *et al*, 2000).

En la tercera etapa de este trabajo, nos enfocamos a investigar si el AINE aspirina, puede modificar el flujo de glutatión hepático, usando como modelo experimental el hígado perfundido, En la Figura 19 se observa un aumento gradual del contenido de glutatión en el líquido perfundido, producto de la salida de glutatión

desde las células hepáticas. Sin embargo, la incertidumbre asociada a la determinación, no permitió distinguir si en presencia de etanol o aspirina se modificó significativamente el eflujo de glutatión.

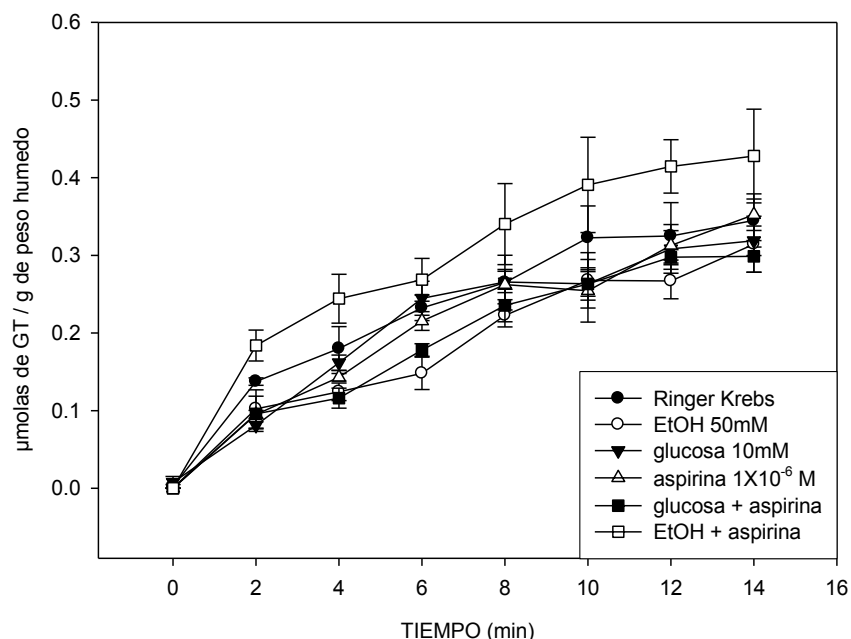


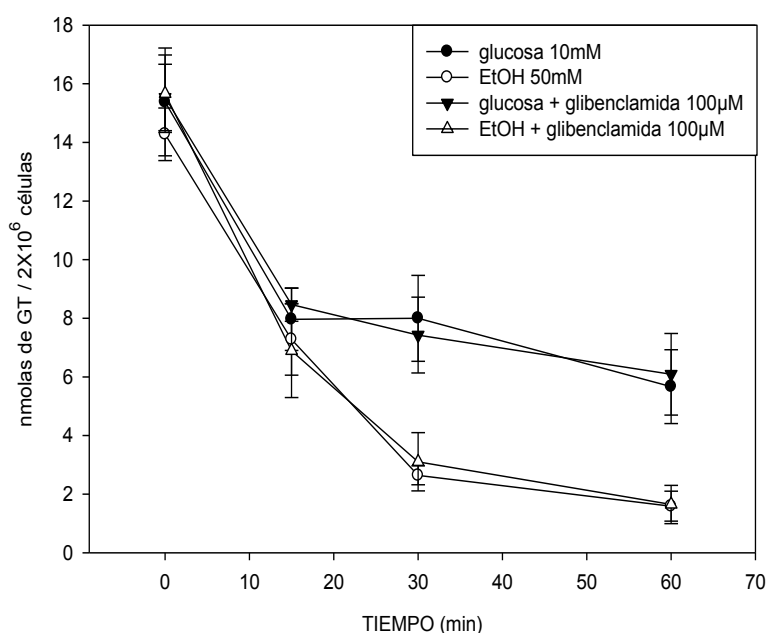
Figura 19. Efecto del etanol [50mM] y la aspirina [1x10⁻⁶M] en hígado perfundido *in situ*, a través de la vena porta (perfusión cerrada), con una solución de Ringer-Krebs-fosfato, en un volumen final de 20ml. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3).

Efecto del etanol y la glibenclamida sobre el eflujo de glutatión en hepatocitos aislados.

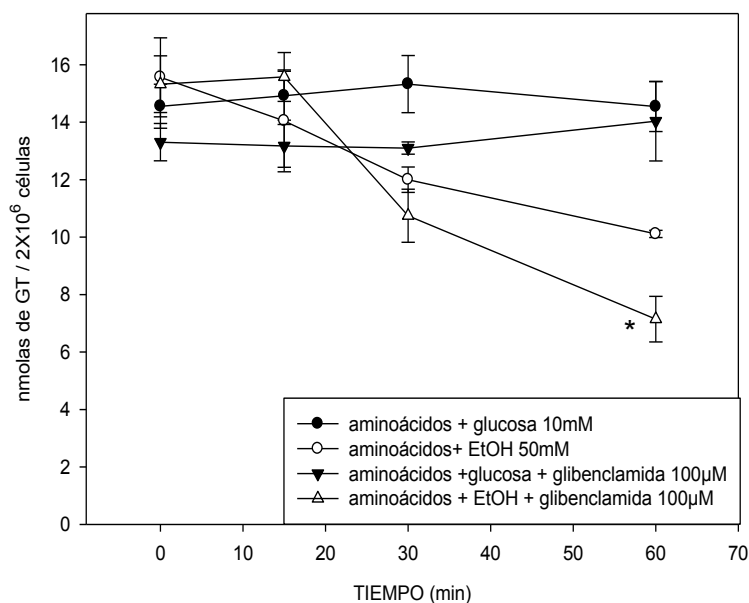
En los resultados previos, claramente se observó que el modelo de hígado perfundido no es el más adecuado para evidenciar los efectos del etanol en el eflujo del glutatión, por tal motivo decimos emplear hepatocitos aislados, ya que durante la primera serie de experimentos los efectos del etanol fueron evidentes tanto en presencia como en ausencia de los aminoácidos precursores de la síntesis de glutatión (Figuras 2 y 5). En este caso, decidimos utilizar glibenclamida porque trabajos previos reportaron que a una concentración de 100 μ M, este

fármaco es capaz de inhibir el eflujo de glutatión en células aisladas de epitelio pulmonar (Gao *et al*, 2001).

En la Figura 20 podemos observar que la presencia de glibenclamida no tuvo ningún efecto en el contenido de glutatión total en hepatocitos aislados de ratas con 48 h de ayuno, e incubadas con glucosa [10mM] o etanol [50mM]. Por otro lado, al repetir el experimento en presencia de los aminoácidos precursores de la síntesis de glutatión, la glibenclamida no tuvo efecto alguno en los hepatocitos incubados con glucosa, pero paradójicamente, disminuyó el contenido de glutatión en los hepatocitos incubados con etanol (Figura 21).



Grafica 20. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con 48 h de ayuno e incubados en RKH. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3). *t test Student*. etanol [50mM] vs etanol + glibenclmida [100µM].



Grafica 21. Contenido de GT en hepatocitos aislados de ratas con 48 h de ayuno e incubados en RKH con aminoácidos. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3). *t test Student*. * $p < 0.05$, aminoácidos + etanol [50mM] vs aminoácidos + etanol + glibenclamida [100µM].

Efecto del etanol y piroxicam sobre el eflujo de glutatión *in vivo*.

Puesto que los datos que existen en la literatura, sobre el efecto que tiene el etanol en el eflujo de glutatión están reportados en el animal integro (Speisky *et al*, 1985; Choi *et al*, 2000), y dado que los resultados en hepatocitos aislados no son sencillos de interpretar, se decidió analizar el efecto de los AINE's sobre el eflujo de glutatión estimulado por etanol *in vivo*. Para ello, se les administró por vía orogástrica: a) glucosa 9.3g/kg (equivalente al aporte isocalórico del etanol), b) etanol 5g/kg, c) etanol 5g/kg + piroxicam 10mg/kg, d) etanol 5g/kg + glibenclamida 30mg/kg, 4 h después de la administración se muestrearon 200µl de sangre de la vena cava inferior, tanto por debajo (prehepática), como por encima del punto de confluencia con la vena hepática (posthepática).

En la Figura 22 se muestran los valores de las diferencias entre el contenido de glutatión en sangre prehepática (tomado por debajo de la vena cava inferior) y posthepática (tomado por encima del punto de confluencia con la vena hepática).

Puede observarse en primer lugar que el etanol aumentó significativamente el eflujo del glutatión. Sin embargo, cuando el etanol se administró simultáneamente con piroxicam o glibenclamida, la salida de glutatión estimulada por el etanol se inhibió completamente, lo que demuestra por un lado, que la salida de glutatión es dependiente de la secreción de cloruros (inhibida por la glibenclamida), y que el piroxicam es capaz de inhibir también la salida de glutatión hepático hacia el torrente sanguíneo.

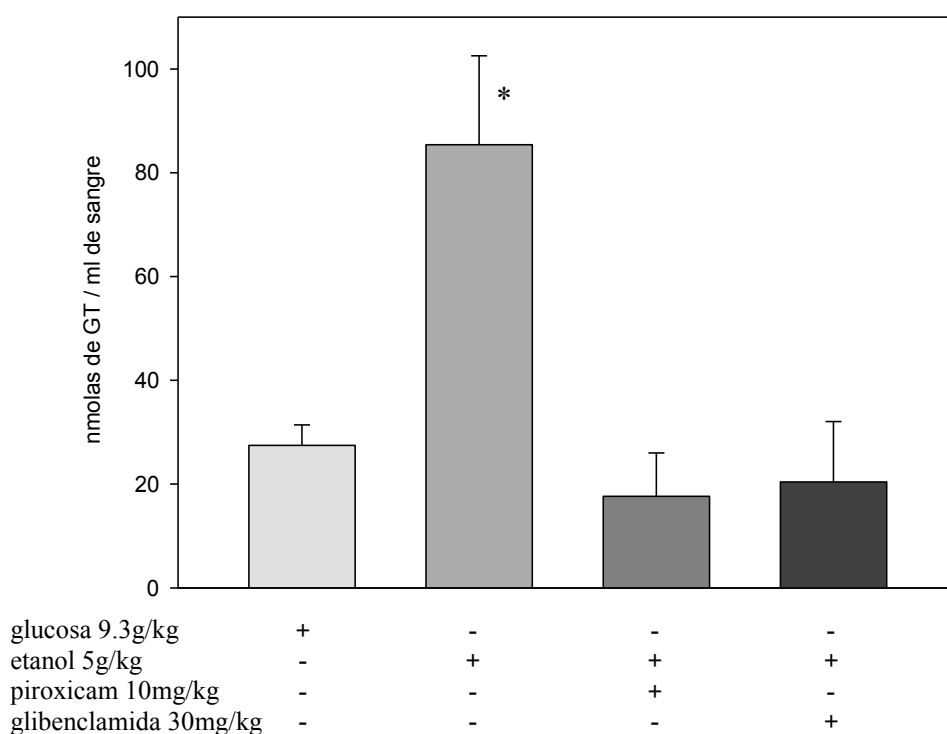


Figura 22. Diferencia entre el eflujo de glutatión total hepático en ratas con 16 h de ayuno e intoxicadas durante 4 horas con glucosa, etanol, piroxicam y glibenclamida. El eflujo se calculo restando el glutatión prehepático al contenido de glutatión posthepático. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=3-4). *t test Student*. * $p < 0.05$. glucosa vs etanol.

Finalmente, para determinar si la disminución en el eflujo de glutatión provocado por el piroxicam, tiene un efecto sobre el contenido de glutatión en hígado, se midió en esos animales el contenido de glutatión hepático. En la Figura 23 se observa el contenido de glutatión hepático después de 4 h de la ingestión de

etanol 5g/kg (tiempo en que se alcanza la concentración mas alta de etanol en sangre, después de una dosis de 5g/kg (Zentella *et al*, 1992)), piroxicam y glibenclamida. Tal y como se esperaba, el tratamiento con etanol disminuyó significativamente la poza de glutatión total; sin embargo, cuando se administró, simultáneamente piroxicam, la disminución en el contenido de glutatión hepático se revirtió, al igual que con la glibenclamida.

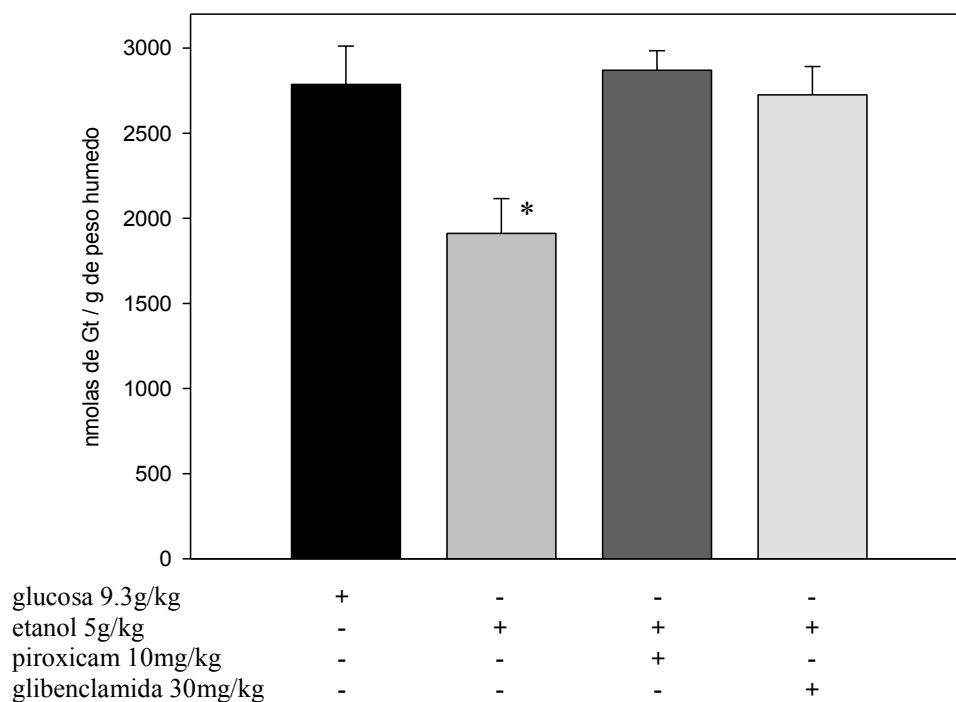


Figura 23. Contenido de GT en hígado de ratas con 16 h de ayuno e intoxicadas durante 4 h con etanol, administrado en presencia o ausencia de piroxicam y glibenclamida. A los animales controles se les administró una dosis isocalórica de glucosa. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. (n=4). *t test Student*. * $p < 0.05$. glucosa vs etanol.

Discusión.

Se ha establecido que una administración aguda de etanol disminuye la concentración de glutatión hepático en animales (MacDonald *et al*, 1977; Videla *et al*, 1980; Videla and Valenzuela, 1982; Zentella de Piña *et al*, 1994^a; Choi *et al*, 2000). Diferentes mecanismos han sido postulados para explicar la disminución de los niveles de glutatión hepático por etanol. La disminución en los niveles de glutatión hepático ha sido atribuida, por largo tiempo, a un incremento en el consumo de glutatión asociado con el metabolismo del etanol y el acetaldehído (Viña *et al*, 1980), a una disminución de su síntesis (Lauterburg *et al*, 1984; Gonzalez *et al*, 1988; Choi *et al*, 2000) o incluso, a una salida o eflujo del hígado (Speisky *et al*, 1985; Choi *et al*, 2000).

En mamíferos, el etanol es primero metabolizado a acetaldehído, el cual puede reaccionar directamente con el glutatión u otros grupos sulfidrilo. Por ello, se ha sugerido que el acetaldehído es el responsable de la disminución de los niveles de glutatión, inducida por etanol en hepatocitos aislados de rata. De hecho, al impedir el paso en la oxidación de etanol a acetaldehído este decaimiento no se presenta (Viña *et al*, 1980).

La generación de acetaldehído y la lipoperoxidación del hígado han mostrado una buena correlación en ratas (Videla *et al*, 1982). La generación de *ERO* durante el metabolismo del etanol y el acetaldehído puede ser detoxificada a expensas del glutatión (Videla y Valenzuela, 1982). Por lo tanto, el metabolismo del etanol estaría acompañado por una disminución del glutatión reducido y/o por un incremento en glutatión disulfuro, modificando así la relación *GSH/GSSG*. Sin embargo algunos autores reportan que esta relación *GSH/GSSG* no se modifica significativamente (Speisky *et al*, 1985; Choi *et al*, 2000), lo que sugiere que otros mecanismos deben también estar involucrados.

Los AINE's pueden prevenir el decaimiento de glutatión tanto *in vivo* (Zentella de Piña *et al*, 1994^b), como *in vitro* (Hernández, 2006). Sin embargo, hasta antes de este trabajo, no se conocía el mecanismo a través del cual actúan para mantener la poza de glutatión. Inicialmente se propuso que pueden actuar como atrapadores de radicales libres (Zentella de Piña, 1994; Castrejón *et al*, 1996; Castrejón *et al*, 1997; Van Antwerpen y Nève, 2004). Sin embargo, disponemos ahora de información adicional que nos permite descartar la capacidad de los AINE's como atrapadores de radicales libres, para ser el mecanismo a través del cual estos últimos conservan la poza de glutatión hepático en animales intoxicados con etanol. En primer lugar, la concentración empleada de los AINE's es 1 μ M y la concentración del glutatión intracelular que se ha reportado que puede ser hasta de 11mM (Martensson *et al*, 1990), esto es, dentro de la célula, el glutatión esta 10,000 veces más concentrado que los AINE's administrados. En segundo lugar, en condiciones de pH fisiológico, el glutatión reacciona 10,000 veces más rápido con los *RL*, que el piroxicam (Van Antwerpen y Nève, 2004). Por lo tanto, tenemos que en las condiciones en que se desarrollaron los ensayos, el glutatión tiene una probabilidad de reaccionar con los *RL* 8 órdenes de magnitud mayor en comparación con los AINE's. Por ello, éste último mecanismo no explicaría la capacidad de los AINE's para revertir el decaimiento de glutatión. De hecho, en presencia de H₂O₂ 200 μ M y glutatión peroxidasa, los AINE's en concentraciones hasta 4mM, son incapaces de competir con el glutatión por el H₂O₂ (Van Antwerpen y Nève, 2004).

Otro mecanismo que explicaría como los AINE's pueden prevenir el decaimiento de la poza de glutatión, es a través de una estimulación en la síntesis del glutatión. Otros autores han reportado en animales intoxicados en forma aguda con etanol, una disminución en la síntesis de *GSH*, ya que reportan una disminución aproximadamente del 30% en la actividad de la *GCL*, que es la enzima limitante en la síntesis de *GSH* (Lauterburg *et al*, 1984; Speisky *et al*, 1985; González *et al*, 1988; Choi *et al*, 2000).

Nosotros encontramos que las condiciones de ayuno están estrechamente relacionadas con el contenido de glutatión (Lu, 1999; Videla *et al*, 1980), y que la administración de aminoácidos (L-glutamina [5mM], glicina [2mM], L-serina [1mM] y metionina [0.2mM]) al medio de incubación de los hepatocitos de ratas ayunadas, estimula la síntesis de glutatión, lo cual concuerda con el hecho de que dichos aminoácidos son precursores de la síntesis de glutatión (Estrela *et al*, 1988). En ausencia de aminoácidos, el contenido de glutatión total de los hepatocitos, disminuye durante el transcurso de la incubación, de $14.5 \pm 0.9\text{nmolas}/2 \times 10^6$ células al inicio de la incubación a $8.4 \pm 0.5\text{nmolas}/2 \times 10^6$ células al final de la incubación en los hepatocitos con glucosa [10mM], y hasta $1.8\text{nmolas}/2 \times 10^6$ células en los hepatocitos tratados con etanol [50mM] (Figura 4 de la sección de resultados). Ahora bien, cuando se administraron los aminoácidos, los niveles de glutatión total se mantuvieron constantes en los hepatocitos con glucosa como sustrato ($14.5 \pm 0.9\text{nmolas}/2 \times 10^6$ células), pero al administrar etanol [50mM] el contenido de glutatión total disminuyó a $10.8 \pm 0.1\text{nmolas}/2 \times 10^6$ células (Figura 5 de la sección de resultados). Así, tenemos que tanto en presencia como ausencia de aminoácidos, los hepatocitos tratados con etanol muestran una reducción similar en el contenido de glutatión del orden de $4\text{nmolas}/2 \times 10^6$ células en comparación con los hepatocitos que utilizaron glucosa [10mM]. Por otro lado, al comparar el contenido de glutatión entre los hepatocitos con y sin aminoácidos, se obtuvo un incremento del orden de $6\text{nmolas}/2 \times 10^6$ células en los hepatocitos incubados con aminoácidos, independientemente de si el sustrato oxidable que se les proporcionó fue glucosa o etanol.

Esto último muestra que el incremento en la síntesis de glutatión inducido por los aminoácidos, fue el mismo tanto en presencia de glucosa como de etanol, y sugiere de manera indirecta, que el etanol no modifica la síntesis de glutatión, puesto que de otra manera, no se hubieran obtenido incrementos similares en el contenido de glutatión.

Para descartar si el etanol pudiera tener algún efecto sobre la síntesis de glutatión, se estudio también si el etanol o alguno de los productos de su metabolismo, como son el acetaldehído y H_2O_2 , pudieran estar afectando de manera directa a la actividad de la *GCL* y que los AINE's pudieran antagonizar este mecanismo. Los resultados obtenidos al respecto son muy claros y ninguno de los compuestos mencionados tuvo efecto sobre la actividad de la *GCL*; esto nos sugiere que éste no es el mecanismo por el cual el etanol o los anti-inflamatorios no esteroides (aspirina y piroxicam) pudieran afectar la síntesis de glutatión.

Ahora bien, considerando la reactividad del acetaldehído, es posible que si en el ensayo de actividad de la *GCL* se utilizará cisteína como sustrato, en lugar del sustrato alternativo L- α -aminobutírico, es probable que hubiéramos observado un efecto inhibitorio por la presencia del acetaldehído en la determinación de la actividad de la enzima, aunque no tanto por una interacción directa entre el acetaldehído y la enzima, sino más bien por una reacción entre el sustrato cisteína y el acetaldehído, ya que la cisteína se oxida con gran facilidad (Seeling y Meister, 1985), y puede reaccionar no enzimáticamente con el acetaldehído (Speisky *et al*, 1985). Esto podría explicar las diferencias en los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*.

Estos resultados deben ser tomados con cautela, ya que hay reportes de que ambas subunidades de la *GCL* son reguladas a nivel transcripcional por el estrés oxidativo (Lu, 1999), y numerosos agentes como el H_2O_2 , elevan la actividad de la *GCL*, así como la transcripción de la subunidad catalítica de la enzima, en cultivos de hepatocitos (Cai *et al*, 1997; Lu, 1999). Sin embargo, no podemos comparar estos resultados, ya que en nuestro modelo experimental se determinó la actividad a partir de un extracto citosólico.

Así, quedan algunos aspectos por resolver, por lo que no se puede descartar totalmente que *in vivo*, los AINE's pudieran tener algún efecto sobre la actividad

de la *GCL*, y más considerando que el efecto del etanol sobre la *GCL* solo se ha reportado *in vivo*.

Aquí, es importante considerar que entre las múltiples funciones que tienen los AINE's, estos pueden antagonizar respuestas metabólicas inducidas por algunas hormonas como la epinefrina (Riveros-Rosas *et al*, 1999), o la insulina (Zentella de Piña *et al*, 2007). Por otra parte, se sabe que las subunidades de la *GCL* están reguladas por múltiples factores como son: la disponibilidad de L-cisteína (Tateishi *et al*, 1974), a nivel transcripcional por el estrés oxidativo (Lu, 1999), y numerosos agentes que inducen estrés oxidativo como el H_2O_2 , las quinonas, las radiaciones ionizantes, el *TNF- α* , *SP-1*, proteína activadora-1 (*AP-1*), proteína activadora-2(*AP-2*)o el 4 hidrox-2-nonenal, elevan la actividad de la *GCL* así como la transcripción de la subunidad catalítica de la enzima (Cai *et al*, 1997; Lu, 1999). A su vez, hormonas como la epinefrina y el glucagón, o incluso, el dibutiril *AMPC* inhiben la actividad de la *GCL*, lo que hace disminuir la síntesis de glutatión y conlleva la disminución de glutatión en hepatocitos de rata (Estrela *et al*, 1988; Lu *et al*, 1991). La pérdida de la actividad de la *GCL* inducida por estas hormonas de estrés está mediada por la fosforilación de la subunidad catalítica debida a la activación de la proteína cinasa A y la proteína cinasa C (Sun *et al*, 1996). Así, tomando en cuenta estos últimos antecedentes en que interviene la regulación de la *GCL*, en la síntesis del glutatión, será muy importante analizar en el futuro, en cual de estos mecanismos podrían participar los AINE's.

Finalmente, también se ha postulado que el eflujo de glutatión puede explicar el decaimiento de los niveles de glutatión hepático en animales tratados con etanol, ya que en esta condición el eflujo de glutatión hepático aumenta significativamente, en comparación con las ratas control (Lauterburg *et al*, 1984; Choi *et al*, 2000).

Existen reportes en la literatura internacional que señalan a tres familias de transportadores presentes en mamíferos que están implicadas en el transporte y

movilización de glutatión y son: la familia de proteínas asociadas a la resistencia a múltiples drogas (*MRP*), la familia del regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR*) y la familia de péptidos transportadores de aniones orgánicos (*OATP*) (Rius *et al*, 2003; Ballatori *et al*, 2005). La glibenclamida ha sido reportada como un inhibidor del transporte del glutatión a través de los canales *CFTR* (Gao *et al*, 2001).

En este trabajo encontramos, en los experimentos *in vivo*, que el eflujo del glutatión total en las ratas control es un tercio del eflujo de las ratas tratadas con etanol, esto evidencia claramente el efecto que tiene el etanol sobre el eflujo del glutatión. Sin embargo, cuando además administramos glibenclamida simultáneamente, el eflujo no se modificó, lo que demuestra por un lado, que la salida de glutatión es dependiente de la secreción de cloruros a través de los canales *CFTR* (inhibida por la glibenclamida) y que el efecto del etanol sobre el eflujo de glutatión es a través de estos transportadores.

Cuando se administró el AINE piroxicam, en presencia del etanol, el eflujo no se modificó, ya que el piroxicam es capaz de inhibir también la salida de glutatión hepático hacia el torrente sanguíneo.

En los experimentos realizados con hepatocitos aislados provenientes de ratas con ayuno, el inhibidor del transportador de glutatión no mostró ningún efecto; sin embargo, cuando se administraron simultáneamente aminoácidos precursores de la síntesis del tripéptido, el decremento en los niveles de glutatión total fue mayor, en comparación con el tratamiento de etanol. Este último resultado es inesperado, considerando que la glibenclamida al evitar la salida de glutatión en los hepatocitos, debe contribuir a mantener el contenido de glutatión dentro de los hepatocitos, o cuando mucho, mantenerlo sin cambio en caso de no existir un eflujo de glutatión o un transporte no inhibido por glibenclamida. Sin embargo, es importante considerar que la glibenclamida no es un inhibidor específico del transporte de glutatión y puede afectar otros sistemas de transporte, tales como

los canales de potasio dependientes de *ATP* o el regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR*) (Gao *et al*, 2001), por lo que es probable que además de inhibir el transporte de glutatión, también afecte el transporte de los aminoácidos precursores necesarios para la síntesis de glutatión, lo cual complicaría la interpretación de los resultados.

De cualquier manera, por los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo*, es claro que uno de los mecanismos a través de los cuales el piroxicam mantiene la poza de glutatión en los animales intoxicados con etanol, es inhibiendo la salida de glutatión hacia torrente sanguíneo, salida que es promovida por el etanol.

Conclusiones.

El estado nutricional de los animales es determinante para establecer el contenido de glutatión. A tal grado que en condiciones de ayuno, el contenido de glutatión total en hepatocitos disminuye significativamente, aún en presencia de glucosa como sustrato oxidable, y por lo tanto no depende de la disponibilidad de energía. Sin embargo, cuando se administró etanol equivalente a una dosis aguda [50mM], en las condiciones ya mencionadas, el contenido de glutatión disminuye drásticamente abatiendo la poza de glutatión.

Al incubar a hepatocitos aislados de ratas con 48 h de ayuno, en presencia de aminoácidos precursores de la síntesis del glutatión, la poza de glutatión total se mantiene constante durante la hora de incubación, muy probablemente a través de un aumento en la síntesis de glutatión. El efecto de los aminoácidos es muy notable al utilizar glucosa [10mM] como sustrato, y se presenta de manera muy importante también en presencia de etanol [50mM], ya que en comparación con los hepatocitos incubados en ausencia de aminoácidos, la disminución no es tan severa.

Al determinar la actividad de la glutamato cisteína ligasa en la fracción citosólica, en presencia de etanol [10-100mM], aspirina y piroxicam [10nM] a [10mM], acetaldehído [0.001-1mM], peróxido de hidrógeno [1-100μM], no se modificó, sin embargo, debe considerarse la posibilidad de investigar a futuro los efectos de estos compuestos sobre la actividad de la *GCL in vivo*.

Por otra parte, en ratas intoxicadas con una dosis aguda de etanol (5 g/kg peso), se observó que el eflujo del glutatión desde el hígado hacia el torrente sanguíneo, aumenta dos veces con respecto a los animales control, y que la administración simultánea de glibenclamida 30mg/kg (inhibidor de los canales *CFTR*) o piroxicam 10mg/kg inhibe completamente la salida del glutatión hepático.

Estos resultados muestran que el mecanismo por el cual los AINE's evitan la disminución del glutatión hepático en animales intoxicados por etanol, se debe principalmente a una disminución en el eflujo de glutatión hepático

Bibliografía

- Abramson, S. B. and Weissmann, G. (1989). The mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 32:1-9.
- Agarwal, D. F. and Goedde, H. W. (1989). Enzymology of alcohol degradation. In: Goedde, H. W. Agarwal, D. F. Editors. *Alcoholism: Biomedical and Genetic Aspects*. Pergamon Press. p.3.
- Ago, T.; Nunoi, H.; Ito, T. and Sumimoto, H. (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the sh3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem.* 274:33644-33653.
- Akerboom, T. P. M. and Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzimol.* 77:373-382.
- Alarcón, N. M. (2001). Influencia de los lípidos de la dieta sobre la defensa antioxidante en el hepatocito aislado de rata. Tesis de Licenciatura. UNAM. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. p.7-30. México, D. F.
- Aleman, V. and Handler, P. (1967). "Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties." *J Biol Chem.* 242(18):4087-96.
- Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." *Science.* 221: 1256-1264.
- Ames, B. N.; Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993). "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7915-7922.
- Aragón, C.; Miguel, M.; Correa, M. and Sánchez-Segura, C. (2002). Alcohol y metabolismo humano. *Monografía Alcohol (Adicciones)*. Editor: Antoni Gual. 14(1):23-44.
- Arbiser, J. L.; Petros, J.; Klafter, R.; Govindajaran, B.; McLaughlin, E. R. Brown, L. F.; Cohen, C.; Moses, M.; Kilroy, S.; Arnold, R. S. and Lambeth, J.

-
- D. (2002). Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 99:715-720.
- Arnon, R.; Degli-Esposti, S. and Zern, M. A. (1995). Molecular biological aspects of alcohol-induced liver disease. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* 19:247-256.
 - Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1825-1835.
 - Aruoma, O. I. and Halliwell, B. (1989). "Inactivation of alpha 1-antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid." *FEBS Lett.* 244(1):76-80.
 - Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardo, F. V.; Garcia de la Asuncion, J.; Estrela, J. M. and Vina, J. (1994). "A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples." *Anal Biochem.* 217(2):323-328.
 - Aust, S. D.; Chignell, C. F.; Bray, T. M.; Kalyanaraman, B. and Mason, R. P. (1993). "Free radicals in toxicology." *Toxicol Appl Pharmacol.* 120(2):168-78.
 - Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." *N. Engl. J. Med.* 298:659-668.
 - Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood.* 93:1464-1476.
 - Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 16:42-47.
 - Badawy, A. B. (1978). The metabolism of alcohol. *Clin Endocrinol Metab.* 7:247-71.
 - Baeuerle, P. A. and Henkel, T. (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." *Annu Rev Immunol.* 12:141-79.
 - Ballatori, N. and Dutczak, W. J. (1994). Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem.* 269(31):19731-7.
 - Bannai, S. (1984). "Transport of cystine and cysteine in mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 779(3): 289-306.
 - Bannai, S.; Ishii, T.; Takada, A. and Noriko, T. (1989). Regulation of glutathione level by amino acid transport. *Glutathione centennial.* Taniguchi, N.; Higashi, T., Sakamoto, Y. and Meister, A. San Diego, Academic Press:407-421.

-
- Barahona, E.; Julkunen, R.; Tannenbaum, L. and Lieber, C. S. (1986). Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats. *Gastroenterology*. 90:130.
 - Batot, G.; Martel, C.; Capdeville, N.; Wientjes, F. and Morel, F. (1995). Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem*. 234:208-215.
 - Batt, R. D. (1989). Absorption, distribution, and elimination of alcohol. In: Crow KE, Batt RD, editors. *Human Metabolism of Alcohol*. Vol. I: Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects, and General Interest. CRC Press. Boca Raton, FL. p. 3.
 - Becker, B. F. (1993). "Towards the physiological function of uric acid." *Free Radic Biol Med* 14(6):615-31.
 - Bedard, K. and Krause, K. H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 87:245–313.
 - Bellomo, C.; Jewel, S. A.; Thor, H. and Orrenius, S. (1982). "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:6842-6846.
 - Bellomo, G.; Vairetti, M.; Stivala, L.; Mirabelli, F.; Richelmi, P. and Orrenius, S. (1992). "Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci. USA*. 89(10):4412-6.
 - Bendich, A.; Machlin, L. J.; Scandurra, O.; Burton, G. W. and Wayner, D. D. M. (1986). "The antioxidant role of vitamina C." *Free Radic. Biol. Med*. 2:419-444.
 - Benzi, G. and Moretti, A. (1995). "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Radic. Biol. Med*. 19(1):77-101.
 - Berkaloff, A.; Bourguet, J.; Favard, P. and Lacroix, J. (1988). Biología y fisiología celular: Cloroplastos, peroxisomas, división celular. Ed. Omega. Barcelona.
 - Beutler, E. and Dale, G. (1989). Erythrocyte glutathione: function and metabolism, in: Dolphin, D. Poulson, R. and Avramovic O. (Eds.), Coenzymes

-
- and Cofactors, Glutathione Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Part B, John Wiley & Sons, New York. 291–317.
- Bogen, E. (1932). The human toxicology of alcohol. *Chapter IV in Alcohol and Man*. Emerson, H. (Ed.). The Macmillan Company. New. York.
 - Boleda, M. D.; Julia, P.; Moreno, A. Y. and Pares, X. (1989). Role of extrahepatic alcohol deshydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 273:1101-1105.
 - Bondy, S. C. (1992). "Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage." *Neurotoxicology*. 13(1): 87-100.
 - Boveris, A.; Oshino, N. and Chance, B. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxyde." *Biochem J.* 128:617-630.
 - Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72:248-254.
 - Brogden, R. N.; Heel, R. C.; Speight, T. M. and Avery, S. (1984). Piroxicam. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs*. 28:292-323.
 - Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan and A. O. M. Stoppani. (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and unbiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Arch. Biochem. Biophys.* 180:248-257.
 - Cai, J.; Huang, Z. Z. and Lu, S. C. (1997). "Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression." *Biochem J.* 326(1):167-72.
 - Cederbaum, A. I. and Dicker, E. (1983). Inhibition of microsomal oxidation of alcohols and of hydroxyl-radical-scavenging agents by the iron-chelating agent desferrioxamine. *Biochem J.* 210:107.
 - Cederbaum, A. I. (1987). Microsomal generation of hydroxyl radicals: Its role in microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) activity and requirement for iron. *Ann NY Acad Sci.* 492:35
 - Cederbaum, A. I.; Lu, Y. and Wu, D. (2009). Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol.* 83(6):519-48

-
- Cejas, J. R.; Almansa, E.; Jérez, S.; Bolaños, A.; Samper, M. and Lorenzo, A. (2004). Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 138(1):91-102.
 - Capdevila, J.; Chacos, N.; Werringloer, J.; Prough R. A. and Estabrook, R. W. (1981). "Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid." *Proc Natl Acad Sci. USA*. 78(9):5362-6.
 - Chance, B.; Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 59:527-605.
 - Chakravarthi, S. and Bulleid, N. J. (2004). Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway. *J Biol Chem*. 279(38):39872-9.
 - Cheng, G.; Cao, Z.; Xu, X.; van Meir, E. G. and Lambeth, J. D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox 3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 269:131-140.
 - Chihuailaf, R. H.; Contreras, P. A. and Wittwer, F. G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*. 33(3):265-283.
 - Chaudière, J. and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem Toxicol*. 37:949-062.
 - 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.
 - Coffman, R. L.; Seymour, B. W. P.; Hudak, S.; Jackson, J. and Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*. 245:308-310.
 - Conde de la Rosa, L.; Moshage, H. and Nieto, N. (2008). [Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease] *Rev Esp Enferm Dig*. 100(3):156-63.
 - Cooke, A. R. and Birchall, A. (1969). Absorption of ethanol from the stomach. *Gastroenterology*. 57:269.

-
- Cutler, R. G. (1984). "Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species." *Arch Gerontol Geriatr.* 3(4):321-48.
 - Danielsson, O.; Atrain, S.; Luque, T.; Hjelmqvist, L.; González-Duarte, R. and Jörnvall, H. (1994). Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenases classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4980-4984.
 - Davies, K. J.; Sevanian, A.; Muakkassah-Kelly, S. F. and Hochstein, P. (1986). "Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid." *Biochem J.* 235(3):747-54.
 - Dass, P. D.; Bermes, E. W. and Holmes, E. W. (1992). Renal and hepatic output of glutathione in plasma and whole blood, *Biochim Biophys Acta.* 1156:99–102.
 - De Capoa, A.; Ferraro, M.; Lavia, P.; Pelliccia, F. and Finazzi-Agro, A. (1982). "Silver staining of the nucleolus organizer regions (NOR) requires clusters of sulfhydryl groups." *J Histochem Cytochem.* 30(9):908-11.
 - Deitrich, R. A. (1976). Biochemical aspects of alcoholism. *Psychoneuroendocrinology.* 1:325-246.
 - De La Asuncion, J. G.; del Olmo, M. L.; Sastre, J.; Millan, A.; Pellin, A.; Pallardo, F. V. and Vina, J. (1998). "AZT treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria. Prevention by antioxidant vitamins." *J Clin Invest.* 102(1):4-9.
 - DeLeve, L. and Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacolo Therapeutics.* 52:287-305.
 - Del Maestro, R.; Thaw, H. H.; Bjork, J.; Planker, M. and Arfors, K. E. (1980). "Free radicals as mediators of tissue injury." *Acta Physiol Scand Suppl.* 492:43-57.
 - DeRey-Pailhade, J. (1888). "Sur un corps d'origine organique hydrogenant le soufre a froid." *CR Acad Sci.* 106:1683-1684.
 - Dicker, E. and Cederbaum, A. I. (1990). Generation of reactive oxygen species and reduction of ferric chelates by microsomes in the presence of a

reconstituted system containing ethanol, NAD⁺ and alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res.* 14:238.

- 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.
- Di Luzio, N. R. (1966). A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. *Lab Invest.* 15:50-62.
- Dolphin, D. (1988). The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. *Oxygen radicals in biology and medicine.* M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press.:491-500.
- Doroshow, J. H. and Davies, K. J. (1983). "Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-manisidide, and neocarzinostatin." *Biochem Pharmacol.* 32(19):2935-9.
- Droge, W.; Schulze-Osthoff, K.; Mihm, S.; Galter, D.; Schenk, H.; Eck, H. P.; Roth, S. and Gmünder, H. (1994). Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 8(14):1131-8.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev.* 82(1): 47-95.
- Eklund, H.; Nordström, B.; Zeppezauer, E.; Söderberg, G.; Ohlsson, I.; Boiwe, T.; Söderberg, B.-O.; Tapia, A.; Brändén, C.-I. and Åkeson, Å. (1976). Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 102:27-59.
- Eriksson, C. J. P. (1977). The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation-II. Regulation of the hepatic acetaldehyde level. *Biochem Pharmacol.* 26:249-252.
- Escarabajal, M. D. (2000). Mecanismos implicados en las conductas inducidas por el alcohol: El papel de las enzimas cerebrales responsables del metabolismo del acetaldehído. Tesis de Doctorado. Universidad de Jaén. Facultad de Psicología Básica, Clínica y Psicobiología. España, Andalucía.

-
- Esteve, J. M.; Mompo, J.; Garcia de la Asuncion, J.; Sastre, J.; Asensi, M.; Boix, J.; Vina, J. R.; Vina, J. and Pallardo, F. V. (1999). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro." *FASEB J.* 13(9):1055-64.
 - Estrela, J. M.; Gil, F.; Vila, J. M. and Viña, J. (1988). "Alpha-adrenergic modulation of glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes." *Am J Physiol* 255(6 Pt 1): E801-5.
 - Fahey, R. C. and Sundquist, A. R. (1991). Evolution of glutathione metabolism. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 64:1-53.
 - Fang, Y. Z.; Yang, S. and Wu G. (2004). [Free radical homeostasis]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. Review. Chinese. 35(3):199-204.
 - Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J. Chem. Soc. Trans.* 65:899-910.
 - Fernandez-Checa, J. C.; Garcia-Ruiz, C.; Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1991). "Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress." *J Clin Invest* 87(2):397-405.
 - Fernández-Checa, J. C.; Lu, S. C.; Ookhtens, M.; DeLeve, L.; Runnegar, M.; Yoshida, H.; Saoko, H.; Kannan, R.; García-Ruiz, C.; Kuhlenkamp, J. F. and Kaplowitz, N. (1992). The Regulation of Hepatic Glutathione. In Hepatic Anion Transport and Bile Secretion. *Physiol Pathophysiol.* (Tavoloni, N. and Berk, P. D. eds): New York. p. 363-395.
 - Fernandez-Checa, J. C.; Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1993). "Selective induction by phenobarbital of the electrogenic transport of glutathione and organic anions in rat liver canalicular membrane vesicles." *J Biol Chem* 268(15):10836-41.
 - Ferrer, J. V.; Gasco, E.; Sastre, J.; Pallardo, F. V.; Asensi, M. and Vina, J. (1990). "Age-related changes in glutathione synthesis in the eye lens." *Biochem J.* 269(2):531-4.
 - Foster, R. E. and Estabrook, R. W. (1993). "Is oxygen an essential nutrient?" *Annu. Rev. Nutr.* 13:383-403.

-
- Franchi-Gazzola, R.; Gazzola, G. C.; Dall'Asta, V. and Guidotti, G. G. (1982). The transport of alanine, serine, and cysteine in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 257(16):9582-9587.
 - Freeman, B. A. and Crapo, J. (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injury." *Lab Invest.* 47: 412-426.
 - Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.
 - Finkelstein, J. D. (2000). "Homocysteine: a history in progress." *Nutr Rev* 58(7): 193-204.
 - Forstrom, J. W.; Zakowski, J. J. and Tappel, A. L. (1978). "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine." *Biochem.* 17:2639-2644.
 - Fridovich, I. (1974). "Superoxide dismutases." *Adv Enzymol* 41: 35-97.
 - Fridovich, I. (1978). "Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical." *Ciba Found Symp*(65): 77-93.
 - Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters." *J Biol Chem* 272(30): 18515-7.
 - Frolich, J. C. (1997). A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci.* 18:30-34.
 - Garcia-Ruiz, C.; Fernandez-Checa, J. C. and Kaplowitz, N. (1992). "Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced glutathione in intact rat hepatocytes and membrane vesicles." *J Biol Chem* 267(31):22256-64.
 - Garcia-Ruiz, C.; Morales, A.; Colell, A.; Rodes, J.; Yi, J. R.; Kaplowitz, N. and Fernandez-Checa, J. C. (1995). "Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione. Expression studies in *Xenopus laevis* oocytes." *J Biol Chem* 270(27):15946-9.
 - Gipp, J. J., Chang, C. and Mulcahy, R. T. (1992). "Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase." *Biochem Biophys Res Commun* 185(1):29-35.

-
- Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I, Rossi R. (2008). Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. *Blood Cells Mol Dis.* 40(2):174-9.
 - Gonzalez, F. J. (1992). Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 13:346.
 - Gonzalez, J.; Muñoz, M. E.; Martin, M. I.; Collado, P. S.; Feroso, J. and Esteller, A. (1988). Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione metabolism in the rat. *Alcohol.* 5(2):103-6.
 - Goth, L. and Pay, A. (1996). Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis.* 17:1302-1303.
 - Griffith, O. W. and Meister, A. (1979). "Glutathione: inter-organ translocation, turnover, and metabolism." *Proc Natl Acad Sci. USA* 76(11):5606-10.
 - Griffith, O. W. (1982). Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem.* 257(22):13704-12.
 - Griffith, O. W. and Meister, A. (1985). "Origin and turnover of mitochondrial glutathione." *Proc Natl Acad Sci. USA.* 82(14):4668-72.
 - Gutteridge, J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact.* 91(2-3):133-40.
 - Haberle, D.; Wahllander, A. and Sies, H. (1979). "Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats." *FEBS Lett.* 108(2):335- 40.
 - Hagen, T. M.; Brown, L. A. and Jones, D. P. (1986). "Protection against paraquat-induced injury by exogenous GSH in pulmonary alveolar type II cells." *Biochem Pharmacol.* 35(24):4537-42.
 - Hahn, R.; Wendel, A. and Flohe, L. (1978). "The fate of extracellular glutathione in the rat." *Biochim Biophys Acta.* 539(3): 324-37.
 - Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts." *Arch. Biochem. Biophys.* 246:501-514.

-
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91(3C):14S-22S.
 - Halliwell, B. and Auroma, O. I. (1991). "DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems." *FEBS Lett.* 281:9-19.
 - Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med.* 18(1):125-6.
 - Halliwell, B. (1996). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." *Biochem Soc Trans.* 24(4): 1023-1027.
 - Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3 Edition. Oxford University Press. Oxford; New York.
 - Harington, C. R. and Mead, T. H. (1935). Synthesis of glutathione. *Biochem J.* 29(7):1602-1611.
 - Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6:2675-2683.
 - Hassan, H. M. (1989). "Microbial superoxide dismutases." *Adv Genet* 26: 65-97.
 - Hernández Vázquez, A. (2006). Efecto de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) sobre los niveles de glutatión total (GT) extracelular e intracelular, durante la intoxicación aguda con etanol en hepatocitos aislados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
 - Hille, R. and Nishino, T. (1995). "Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase." *FASEB J.* 9(11):995-1003.
 - Hille, R. (1996). "The Mononuclear Molybdenum Enzymes." *Chem Rev.* 96(7):2757-2816.
 - Holben, D. H. and Smith, A. M. (1999). The diverse role of selenium within selenoproteins. *J Am Diet Assoc.* 99:836-845.
 - Holmgren, A. (1979). "Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from Escherichia coli." *J Biol Chem.* 254(9):3664-71.

-
- Holmgren, A. (1984). "Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin." *Methods Enzymol* 107:295-300.
 - Holmgren, A. (1990). Glutaredoxin: structure and function. *Glutathione: metabolism and physiological functions*. J. Viña. Florida, CRC, Boca Raton: 145-154.
 - Hopkins, F. G. and Dixon, M. (1922). On glutathione. II. A thermostable oxidation-reduction system. *J Biol Chem*. 54(3):527-563.
 - Horiuchi, S.; Inoue, M. and Morino, Y. (1978). "Gamma-glutamyl transpeptidase: sidedness of its active site on renal brush-border membrane." *Eur J Biochem*. 87(3):429-37.
 - Horowitz, J. H.; Rypins, E. B.; Henderson, J. M.; Heymsfield, S. B.; Moffitt, S. D.; Bain, R. P.; Chawla, R. K.; Bleier, J. C. and Rudman, D. (1981). "Evidence for impairment of transulfuration pathway in cirrhosis." *Gastroenterology* 81(4): 668-75.
 - Horowitz, M.; Maddox, A.; Bochner, M.; Wishart, J.; Bratasiuk, R.; Collins, P. and Shearman, D. (1989). Relationships between gastric emptying of solid and caloric liquid meals and alcohol absorption. *Am J Physiol*. 257:G291.
 - Huang, C. S.; Anderson, M. E. and Meister, A. (1993). "Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase." *J Biol Chem*. 268(27):20578-83.
 - Huang, Z. A.; Yang, H.; Chen, C.; Zeng, Z. and Lu, S. C. (2000). "Inducers of gamma-glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression." *Biochim Biophys Acta* 1493(1-2):48-55.
 - Huang, Z. Z.; Chen, C.; Zeng, Z.; Yang, H.; Oh, J.; Chen, L. and Lu, S. C. (2001). "Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration." *FASEB J*. 15(1):19-21.
 - Hwang, C.; Sinskey, A. J. and Lodish, H. F. (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." *Science*. 257(5076):1496-502.
 - Ingelman-Sundberg, M. and Johansson, I. (1984). Mechanisms of hydroxyl radical formation and ethanol oxidation by ethanol-inducible and other forms of rabbit liver microsomal cytochromes P-450. *J Biol Chem*. 259:6447.

-
- Ishikawa, T. and Sies, H. (1984). "Cardiac transport of glutathione disulfide and S-conjugate. Studies with isolated perfused rat heart during hydroperoxide metabolism." *J Biol Chem.* 259(6):3838-43.
 - Ishikawa, T.; Kobayashi, K.; Sogame, Y. and Hayashi, K. (1989). "Evidence for leukotriene C4 transport mediated by an ATP-dependent glutathione S-conjugate carrier in rat heart and liver plasma membranes." *FEBS Lett.* 259(1):95-8.
 - Jelokova, J.; Karlsson, C.; Estonius, M.; Jörnvall, H.; Höög, J. O. (1994). Features of structural zinc in mammalian alcohol dehydrogenase. Site-directed mutagenesis of the zinc ligands. *Eur. J. Biochem.* 225:1015-1019.
 - Jocelyn, P. C. and Kamminga, A. (1974). "The non-protein thiol of rat liver mitochondria." *Biochim Biophys Acta.* 343(2):356-62.
 - Jörnvall, H.; Höög, J.; Von Bahr-Lindström, H.; Johansson, J.; Kaiser, R. and Persson, B. (1987). The biochemistry of alcohol and alcoholism. *Biochem Soc Trans.* 625th meeting. London. Vol. 16.223-227.
 - Jörnvall, H.; Petersson, B.; Krook, M. and Hempel, J. (1991). Alcohol and aldehyde dehydrogenases. In T. N. Palmer. (Ed). *The Molecular Pathology of Alcoholism.* Oxford University Press. 130-156.
 - Kalant, H.; Khanna, J. M.; Seymour, F. and Loth, J. (1975). Acute alcoholic fatty liver. Metabolism or stress. *Biochem. Pharmacol.* 24:431-434.
 - Kannan, R.; Kuhlenkamp, J. F.; Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1992). "Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence." *J Pharmacol Exp Ther.* 263(3):964-70.
 - Kannan, R.; Yi, J. R.; Tang, D.; Zlokovic, B. V. and Kaplowitz, N. (1996). "Identification of a novel, sodium-dependent, reduced glutathione transporter in the rat lens epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37(11):2269-75.
 - Kannan, R.; Bao, Y.; Wang, Y.; Sarthy, V. P. and Kaplowitz, N. (1999). "Protection from oxidant injury by sodium-dependent GSH uptake in retinal Muller cells." *Exp Eye Res* 68(5): 609-16.

-
- Kannan, R.; Chakrabarti, R.; Tang, D.; Kim, K. J. and Kaplowitz, N. (2000). "GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺- dependent GSH transport in HCEC." *Brain Res.* 852(2):374-82.
 - Kaplowitz, N.; Eberle, D. E.; Petrini, J.; Touloukian, J.; Corvasce, M. C. and Kuhlenkamp, J. (1983). Factors influencing the efflux of hepatic glutathione into bile in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 224(1):141-7
 - Kaplowitz, N.; Aw, T. Y. and Ookhtens M. (1985). The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:715-44.
 - Ketterer, B. (1986). "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." *Xenobiotica.* 16:957-973.
 - Kilberg, M. S.; Christensen, H. N. and Handlogten, M. E. (1979). "Cysteine as a system-specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes." *Biochem Biophys Res Commun.* 88(2):744- 51.
 - Kinnula, V. L.; Crapo, J. D. and Raivio, K. (1995). "Biology of disease: Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung." *Lab. Invest.* 73(1):3-19.
 - Kondo, T.; Dale, G. L. and Beutler, E. (1981). "Studies on glutathione transport utilizing inside-out vesicles prepared from human erythrocytes." *Biochim Biophys Acta.* 645(1):132-6.
 - Koop, D. R. and Casazza, J. P. (1985). Identification of ethanol-inducible P-450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. *J Biol Chem.* 260:13607
 - Koop, D. R. (1989). Minor pathways of ethanol metabolism. In: Crow, K. E. and Batt, R. D. editors. *Human Metabolism of Alcohol, Vol. II: Regulation, Enzymology and Metabolites of Ethanol.* Boca Raton, FL: CRC Press. p.133.
 - Kosower, N. S. and Kosower, E. M. (1978). "The glutathione status of the cells." *Int. Rev. Cytol.* 54:109-160.
 - Kosower, N. S. and Kosower, E. M. (1983). Glutathione and cell membrane thiol status. *Functions of glutathione.* Larson, A.; Orrenius, S.; Holmgren, A. and Mannervik, B. Nueva York, Editorial Raven.: 307-315.

-
- Kricka, I. J. and Clark, P. M. S. (1979). Biochemistry of alcohol and alcoholism.(Ellis Horwood series in Chemical Science). Halsted Press. p. 1-69.
 - Laguna J. and Piña, E. (2002) Bioquímica. 5^a (Ed). Manual Moderno. México.
 - Lange, L. G. and Bergman, S. R. Sobel, B. E. (1981). Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J Biol Chem.* 256:12968.
 - Lanzetta, P. A.; Alvarez, L. J.; Reinach, P. S. and Candia, O. A. (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem.* 15; 100(1):95-7.
 - Larkins, N. J. (1999). Free radical biology and pathology. *J Equine Vet Sci.* 19:84-89.
 - Lash, L. H. and Jones, D. P. (1984). "Renal glutathione transport. Characteristics of the sodium dependent system in the basal-lateral membrane." *J Biol Chem.* 259(23):14508-14.
 - Lash, L. H.; Hagen, T. M. and Jones, D. P. (1986). "Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury." *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 83(13):4641-5.
 - Lasker, J. M.; Raucy, J.; Kubota, S.; Bloswick, B. P.; Black, M. and Lieber, C. S. (1987). Puridfication an characterization of human liver cytochrome P-450-ALC. *Biochem Biophys Res Commun.* 148:232.
 - Lauterburg, B. H.; Davies, S. and Mitchell. J. R. (1984). Ethanol suppresses hepatic glutathione synthesis in rats in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 230(1):7-11.
 - Lehninger, A. L.; Nelson, D. L and Cox, M. M. (2001) Principios de bioquímica. 3^a (Ed). Omega. España.
 - Lewis, H. D. Jr.; Davis, J. W.; Archibald, D. G.; Steinke, W. E.; Smitherman, T. C.; Doherty, J. E. 3rd.; Schnaper, H. W.; LeWinter, M. M.; Linares, E.; Pouget, J. M.; Sabharwal, S. C.; Chesler, E. and DeMots, H. (1983). Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med.* 18; 309(7):396-403.

-
- Li, N. and Karin, M. (1999). Is NF- κ B the sensor of oxidative stress. *FASEB J.* 13:1137-1143
 - Li, T. K. and Magnes, L. J. (1975). Identification of a distinctive form of alcohol dehydrogenase in human livers with high activity. *Biochem Biophys Res Comm.* 63:202-208.
 - Lieber C. S. and DeCarli L. M. (1968). Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. *Science.* 22;162(856):917-8.
 - Lieber, C. S. (1977). Metabolism of ethanol. En. C. S. Lieber. (ed). *Metabolic Aspects of alcoholism.* Lancaster. MTP Press. p.1-30
 - Lieber, C. S. (1991). Hepatic, metabolic and toxic effects ethanol: update, *Alcohol Clin Exp Res.* 15:573-592.
 - Lieber, C. S. (1994). Hepatic and Metabolic Effects of Ethanol: Pathogenesis and Prevention. *Ann Med.* 26:325-330
 - Lieber, C. S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Act.* 257:59-4.
 - Lieber, C. S. (2003) Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health.* 27:220-231.
 - Linnane, A. W.; Marzuki, S.; Ozawa, T. and Tanaka, M. (1989). "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases." *Lancet.* 1(8639):642-5.
 - Liras, G. and Carballo, F. (1996). "An impaired phagocytic function is associated with leucocyte activation in the early stages of severe acute pancreatitis." *Gut.* 39(1):39-42.
 - Liu, R. M.; Gao, L.; Choi, J. and Forman, H. J. (1998). "gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal." *Am J Physiol.* 275(5 Pt1):L861-9.
 - Lluís, J. M.; Colell, A.; Garcia-Ruiz, C.; Kaplowitz, N. and Fernandez-Checa, J. C. (2003). "Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress." *Gastroenterology.* 124(3):708-24.

-
- Los, M.; Droge, W.; Stricker, K.; Baeuerle, P. A. and Schulze-osthoff, K. (1995). Hydrogen peroxide a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol.* 25:159-165
 - Lu, S. C.; Garcia-Ruiz, C.; Kuhlenkamp, J.; Ookhtens, M.; Salas-Prato, M. and Kaplowitz, N. (1990). "Hormonal regulation of glutathione efflux." *J Biol Chem.* 265(27):16088-95.
 - Lu, S. C.; Kuhlenkamp, J.; Garcia-Ruiz, C. and Kaplowitz, N. (1991). "Hormone-mediated down regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat." *J Clin Invest.* 88(1):260-9.
 - Lu, S. C.; Ge, J. L.; Kuhlenkamp, J. and Kaplowitz, N. (1992). "Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo." *J Clin Invest.* 90(2):524-32.
 - Lu, S. C.; Kuhlenkamp, J.; Ge, J. L.; Sun, W. M. and Kaplowitz, N. (1994). "Specificity and directionality of thiol effects on sinusoidal glutathione transport in rat liver." *Mol Pharmacol* 46(3):578-85.
 - Lu, S. C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13:1169-1183.
 - Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 30(1-2):42-59.
 - Lu, Y. and Cederbaum, A. I. (2006). Enhancement by pyrazole of lipopolysaccharide-induced liver injury in mice: role of cytochrome P450 2E1 and 2A5. *Hepatology.* 44(1):263-74.
 - Machlin, L. J. and Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1:441-445.
 - MacDonald, C.; Dow, J. and Moore, M. (1977). A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury: *Biochemical Pharmacology.* 26:1529-1531. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid Redox Signal.* 8(5-6):753-62.
 - Machlin, L. J. and Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1:441-445.

-
- Mallov, S. and Bloch, J. L. 1956. Role of hypophysis and adrenals in fatty infiltration of liver resulting from acute ethanol intoxication. *Am. J. Physiol.* 184:29-34.
 - Marklund, S. L.; Holme, E. and Hellner, L. (1982). "Superoxide dismutase in extracellular fluids." *Clin Chim Acta* 126(1):41-51.
 - Martínez, C.; Martín, F.; Fernández, J. M.; García-Martín, E.; Sastre, J.; Díaz-Rubio, M.; Agúndez, J. A. and Ladero, J. M. (2006). Glutathione S-transferases mu 1, theta 1, pi 1, alpha 1 and mu 3 genetic polymorphisms and the risk of colorectal and gastric cancers in humans. *Pharmacogenomics.* 7(5):711-8.
 - Martínez, C.; Martínez, C. M. J. and Esquivel, H. R., (2001) Hígado y sistema endocrino. Su aparición en el metabolismo. 1^{era} edición. (Ed). UNAM FES-Iztacala. México.
 - Masip, L.; Veeravalli, K. and Georgiou, G. (2006). The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid Redox Signal.* 8(5-6):753-62.
 - Matuz-Mares, D. (2005). Análisis del contenido de glutatión total en el hígado de rata en respuesta a la intoxicación aguda con etanol: Papel de los agonistas adrenergicos. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM.
 - McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). "Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem.* 244:6049-6055.
 - McCord, J. M.; Keele, B. B. and Fridovich, Y. (1974). "An enzyme based theory of obligate anaerobius: the physiological function of superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci. USA* 41:35-97.
 - McManus, I. R.; Contag, A. O. and Olson, E. R. (1960). Characterization of endogenous ethanol in the mammal. *Science.* 131:102.
 - Meister, A. and Anderson, M. E. (1983). "Glutathione." *Annu Rev Biochem.* 52:711-760..
 - Meister, A. (1988). Glutathione. In *The Liver: Biology and Pathobiology.* (Aria, I. M. Jakoby, W. B. Popper, H. Schachter, D. and Shafritz, D. A. eds). Raven Press. New York. p.401-417.

-
- Meister, A. (1994). "Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals." *J Biol Chem.* 269(13):9397-400.
 - Merck Index (1989). Encyclopedia of chemical, drugs and biological. 11 ed. Edit. Budavari, S. Mer & Co. Ratway. USA. New Jersey.
 - Mike, 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.
 - Miller, J. K.; Brzezinska-Slebodzinska, E. and Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci.* 76:2812-2823.
 - Miquel, J.; Economos, A. C.; Fleming, J. and Johnson, J. E. Jr. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp Gerontol.* 15(6):575-91.
 - Morgan, E. T.; Koop, D. R. and Coon, M. J. (1982). Catalytic activity of cytochrome P-450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J Biol Chem.* 257:13951
 - Murray, R. K.; Granner, D. G.; Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. (1994). Bioquímica de Harper. 13ª edición. El Manual Moderno. México, D. F.
 - Nieminen, A. L. (2003). Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol.* 224:29-55.
 - Ochoa, S. (1983). "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes." *Arch. Biochem. Biophys.* 223:325-349.
 - Ondarza, R. N, Iturbe, A.; Hernández, E. and Hurtado, G. (2002). Thiol compounds from a free-living pathogenic opportunistic amoeba, *Acanthamoeba polyphaga*. *Biotechnol Appl Biochem.* 36(Pt 3):195-204.
 - Ondarza, R. N.; Hurtado, G.; Tamayo, E.; Iturbe, A. and Hernández, E. (2006). *Naegleria fowleri*: a free-living highly pathogenic amoeba contains trypanothione/trypanothione reductase and glutathione/glutathione reductase systems. *Exp Parasitol.* 114(3):141-6.
 - Ookhtens, M.; Hobdy, K.; Corvasce, M. C.; Aw, T. Y. and Kaplowitz, N. (1985). Sinusoidal efflux of glutathione in the perfused rat liver. Evidence for a carrier-mediated process. *J Clin Invest.* 75(1):258-65.

-
- Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1998). "Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine." *Semin Liver Dis.* 18(4):313-29.
 - Oppenheimer, L.; Wellner, V. P.; Griffith, O. W. and Meister, A. (1979). "Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites." *J Biol Chem.* 254(12):5184-90.
 - Orme-Johnson, W. H. and Ziegler, D. M. (1965). Alcohol mixed function. Oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 8;21(1):78-82.
 - Orrenius, S. and Moldeus, P. (1984). "The multiple roles of glutathione in drug metabolism." *Trends. Pharmacol. Sci.* 5: 432-435.
 - Packer, L.; Witt, E. H. and Tritschler, H. J. (1995). "alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant." *Free Radic Biol Med.* 19(2):227-50.
 - Pajares, M. A.; Corrales, F.; Durán, C.; Mato, J. M. and Alvarez, L. (1992^a). "How is rat liver Sadenosylmethionine synthetase regulated?" *FEBS Letters.* 309(1): 1-4.
 - Pajares, M. A.; Durán, C.; Corrales, F.; Pliego, M. M. and Mato, J. M. (1992^b). "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione." *J. Biol. Chem.* 267(25):17598-17605.
 - Pallardo, F. V.; Sastre, J.; Asensi, M.; Rodrigo, F.; Estrela, J. M. and Vina, J. (1991). "Physiological changes in glutathione metabolism in foetal and newborn rat liver." *Biochem. J.* 274 (Pt 3):891-3.
 - Parcell, S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev.* 7(1):22-44.
 - Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E. and Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 1;333(1):19-39.
 - Patrick, L. (2002). Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern Med Rev.* 7(6):456-71.
 - Petersen, D. R.; Erwin, V. G. and Deitrich, R. A. (1983). Brain acetaldehyde metabolism during ethanol consumption. *Research Monographics.* 9:93-99.

-
- Philpot, R. M. (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." *Methods. Enzymol.* 206:623-631.
 - Powers, S. K. and Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *PNAS.* 58:1025-1033.
 - Poyton, R. O.; Ball, K. A. and Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 20(7):332-40.
 - Prescott, L. F.; Park, J.; Ballantyne, A.; Adrianssens, P. and Proudfoot, A. T. (1977). "Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine." *Lancet* 2 (8035):432-434.
 - Pryor, W. A; Squadrito, G. L. and Friedman, M. (1995). "A new mechanism for the toxicity of ozone." *Toxicol Lett.* 82-83:287-93.
 - Pryor, W. A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radic. Biol. Med.* 28:141–164.
 - Pyke, S.; Lew, H. and Quintanilha, A. (1986). "Severe depletion in liver glutathione during physical exercise." *Biochem Biophys Res Commun.* 139(3):926-31.
 - Rawley, D. A. and Halliwell, B. (1983). "Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease." *Clin. Sci.* 64:649-653.
 - Richman, P. and Meister, A. (1975). "Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione." *J Biol Chem.* 250:1422-1426.
 - Riveros-Rosas. H.; Julian-Sánchez. A. and Piña, E. (1997). Enzymology of Ethanol and Acetaldehyde Metabolism in Mammals. *Arch Med Res.* 28:453-471.
 - Riveros-Rosas, H.; Julián-Sánchez, A.; Villalobos-Molina, R.; Pardo, J. P. and Piña, E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Eur J Biochem.* 270(16):3309-34.

-
- Rock, C. L.; Jacob, R. A. and Bowen, P. E. (1996). "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids." *J Am Diet Assoc.* 96(7):693-702;
 - Rodríguez-Lizarraga, L.; Díaz-Belmont, A. and Zentella de Piña, M. (1993). Frecuencia de Hepatopatía y su relación con el patrón de consumo. *Revista Medica del Hospital General.* México.
 - Roine, R. P.; Gentry, T.; Lim, Jr. R. T.; Baraona, E. and Lieber, C. S. (1991). Effect of concentration of ingested ethanol on blood alcohol levels. *Alcoholism Clin Exp Res.* 15:734.
 - Rossi, R.; Milzani, A. and Dalle-Donne, I. (2001). Different metabolizing ability of thiol reactants in human and rat blood: biochemical and pharmacological implications, *J. Biol. Chem.* 276:7004–7010.
 - Rouault, T. A. and Klausner, R. D. (1996). "The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism." *EXS.* 77:183-197.
 - Rubin, E. and Lieber, C. S. (1968). Hepatic microsomal enzymes in man and rat: induction and inhibition by ethanol. *Science.* 8;162(854):690-1.
 - Saldaña-Balmori, Y.; Zentella de Piña, M.; Guinzberg, R.; Rocha-Hernández, A. and Piña, E. (1996). Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 317:225-229
 - Sastre, J.; Asensi, N.; Gascó, E.; Pallardó, F. V.; Ferrero, J. A.; Furukawa, T. and Viña, J. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration." *Am. J. Physiol.* 32:R992-R995.
 - Sastre, J.; Asensi, M.; Rodrigo, F.; Pallardo, F. V.; Vento, M. and Vina, J. (1994). "Antioxidant administration to the mother prevents oxidative stress associated with birth in the neonatal rat." *Life Sci.* 54(26):2055-9.
 - Sastre, J.; Pallardo, F. V.; Pla, R.; Pellin, A.; Juan, G.; O'Connor, J. E.; Estrela, J. M.; Miquel, J. and Vina, J. (1996). "Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes." *Hepatology.* 24(5):1199-205.
 - Schardinger, F. (1902). *Z. Untersuch Genussmittel.* 5: 1113-1121.

-
- Schonbaum, G. R. and Chance, B. (1976). Catalase. In: Boyer PD, editor. The Enzymes. Vol. XIII: Oxidation-Reduction, part C: Deshydrogenases (II), Oxidases (II), Hydrogen Peroxide Cleavage, Third ed. New York: *Academic Press*. p.363.
 - Segal, A. W.; Garcia, R.; Goldstone, A. H.; Cross, A. R. and Jones, O. T. G. (1981). Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J*. 196:363-367.
 - Sekura, R. and Meister, A. (1977). gamma-Glutamylcysteine synthetase. Further purification, "half of the sites" reactivity, subunits, and specificity. *J Biol Chem*. 252(8):2599-605.
 - Seeling, G. F.; Simonsen, R. P. and Meister, A. (1984). "Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits." *J Biol Chem*. 259(15): 9345-7.
 - Seeling, G. F. and Meister, A. (1985). Glutathione Biosynthesis; γ -Glutamylcysteine Synthetase from Rat Kidney. *Methods in Enzymology*. 113(47):379-390.
 - Sen, C. K. (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul*. 36:1-30.
 - Serviddio, G.; Pereda, J.; Pallardo, F. V.; Carretero, J.; Borrás, C.; Cutrin, J.; Vendemiale, G.; Poli, G.; Vina, J. and Sastre, J. (2004). "Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress." *Hepatology* 39(3):711-20.
 - Sies, H. and Akerboom, T. P. (1984). "Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues." *Methods Enzymol*. 105:445-51.
 - Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." *Angewandte Chem*. 25:1058-1071.
 - Sies, H. (1993). "Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection." *Mut Res*. 299(3/4):183.
 - Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biol Med*. USA. 27:916-921.

-
- Slater, T. F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." *Biochem. J.* 222: 1-15.
 - Smirnova, G. V. and Oktyabrsky, O. N. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochemistry. (Mosc).* 70(11):1199-211.
 - Smith, M.; Hpkinson, D. A. and Harris, H. (1973). Studies o the subunit structureand molecular size of the human alcohol dehydrogenase isozymes determined by the different loci ADH₁, ADH₂, ADH₃. *Ann Hum Genet.* 36:401-414.
 - Smithm, T.; DeMaster, E. G.; Fume, J. K.; Springfield, J. and Levitt, M. D. (1992). First pass gastric mucosal metabolism of ethanol is negligible in the rat. *J Clin Invest.* 89:1801.
 - 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. *J Biochem Mol Toxicol. USA.* 225:565-572.
 - Srivastava, S. K. and Beutler, E. (1969). "The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes." *J Biol Chem.* 244(1):9-16.
 - Stadman, T. C. (1996). Selenocysteines. *Ann Rev Biochem.* 65:83-100.
 - Summer, J. B. and Dounce, A. L. (1937). Crystalline catalase. *J Biol Chem.* 121:417.
 - Sun, W. M.; Huang, Z. Z. and Lu, S. C. (1996). "Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation." *Biochem J.* 320(Pt1):321-8.
 - Tateishi, N.; Higashi, T.; Shinya, S.; Naruse, A. and Sakamoto, Y. (1974). "Studies on the regulation of glutathione level in rat liver." *J. Biochem. (Tokyo)* 75(1):93-103.
 - Tateishi, N.; Shiozaki, H.; Nakashima, K.; Naruse, A. and Higashi, T. (1977). "Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine." *J. Nutr.* 107:51-58.

-
- Tateishi, N. and Sakamoto, Y. (1983). Nutritional significance of glutathione in rat liver. *Glutathione storage, transport and turnover in mammals*. Y. Sakamoto. Tokyo, Scientific Soxoetu. Press: 13-38.
 - Terrádez, P.; Asensi, M.; Lasso de la Vega, M. C.; Puertes, I. R.; Viña, J. and Estrela, J. M. (1993). "Depletion of tumor glutathione *in vivo* by buthionine sulfoximine: Modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth." *Biochem J*. 292:477-483.
 - Teschke, R. and Gellert, J. (1986). Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): Metabolic aspects and clinical implications. *Alcohol Clin Exp Res*. 10:20s.
 - Thom, S. R.; Kang, M.; Fisher, D. and Ischiropoulos, H. (1997). Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning, *J Appl Physiol*. 82:1424–1432.
 - Townsend, D. M.; Tew, K. D. and Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 57(3-4):145-55.
 - Trimm, J. L.; Salama, G. and Abramson, J. J. (1986). "Sulfhydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles." *J Biol Chem*. 261(34):16092-8.
 - Trush, M. A.; Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E. (1982). "Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity." *Biochem Pharmacol*. 31(21):3335-46.
 - Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 15;552(Pt2):335-44.
 - Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*. 231:232-235.
 - Videla, L. A. and Valenzuela, A. (1982). Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelation and pathological implications. *Life Sciences*. 31:2395-2407.
 - Videla, L. A.; Fernández, V.; Ugarte, G. and Valenzuela, A. (1980). Effect of action for aspirin-like drugs. *Nature*. 231:232-235.

-
- Videla, L. A. and Villena, M. I. (1986). Effect of ethanol, acetaldehyde and acetate on the antioxidant-sensitive respiration in the perfused rat liver: influence of fasting and diethylmaleate treatment. *Alcohol*. 3(3):163-7.
 - Viña, J.; Hems, R. and Krebs, H. A. (1978). "Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes." *Biochem J*. 170(3):627-630.
 - Viña, J.; Saez, G. T.; Wiggins, D.; Roberts, A. F.; Hems, R. and Krebs, H. A. (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." *Biochem J*. 212(1):39-44.
 - Viña, J.; Viña, J. R. and Saez, G. T. (1986). "Glutathione: metabolism and physiological functions." *Life Chem. Rep.* 4:1-35.
 - Viña, J.; Pérez, C.; Furukawa, T.; Palacín, M. and Viña, J. R. (1989^a). "Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice." *Br. J. Nutr.* 62:683-691.
 - Viña, J.; Palacin, M.; Puertes, I. R.; Hernandez, R. and Vina, J. (1989^b). "Role of the gammaglutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation." *Am J Physiol* 257(6 Pt 1):E916-22.
 - Viña, J.; Gascó, E.; Pallardó, F. V.; Sastre, J.; Estrela, J. M. and Rodrigo, F. (1990). Effect of physiological changes in cystathionase activity on aminoacid and glutathione metabolism in rat fetus. *Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate*. J. M. Cuezva and A. M. Pascual-Leone. Nueva York., Editorial Plenum Press: 283-286.
 - Viña, J.; Gimenez, A.; Puertes, I. R.; Gasco, E. and Vina, J. R. (1992). "Impairment of cysteine synthesis from methionine in rats exposed to surgical stress." *Br J Nutr.* 68(2):421-9.
 - Viña, J.; Vento, M.; Garcia-Sala, F.; Puertes, I. R.; Gasco, E.; Sastre, J.; Asensi, M. and Pallardo, F. V. (1995). "L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency." *Am J Clin Nutr.* 61(5):1067-9.
 - Viña, J. R.; Pallardo, F. V.; García, C.; Triguero, A.; Martín, J. A.; Boix, J.; Pellín, A.; Viña, J. and Sastre, J. (1996). Metabolic implications of beta-cystathionase activity in mammals. *Methionine metabolism. Molecular*

mechanism and clinical implications. Mato, J. M. and A. Caballero. Madrid, CSIC, Jarpyo Editores: 111-120.

- Voehringer, D. W.; McConkey, D. J.; McDonnell, T. J.; Brisbay, S. and Meyn, R. E. (1998). "Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95(6):2956-60.
- Von-Sonntag, C. (1994). "Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research." *Int J Radiat Biol.* 65(1):19-26.
- Von-Wartburg, J. P.; Bülher, R.; Maring, J. A. and Pestalozzi, D. (1983). The polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenase and their significance for acetaldehyde toxicity. *Pharmacol Biochem Behav.* 18(1):123-125.
- Wahllander, A.; Soboll, S.; Sies, H.; Linke, I. and Muller, M. (1979). "Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases." *FEBS Lett.* 97(1):138-40.
- Wang, W. and Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev.* 50(3):335-56.
- Watson, P. R. (1989). Total body water and blood alcohol levels: updating the fundamentals. In: Crow K. E.; Batt, R. D. editors. *Human Metabolism of Alcohol.* Vol. I: Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects, and General Interest. CRC Press. Boca Raton, FL. P-41.
- Weiner, H. (1979). Aldehyde dehydrogenase. Mechanism of action and possible physiological roles. *Biochem Pharmacol EtOH.* New York. Plenum Press.
- Weisger, R. A. and Fridovich, I. (1973). "Superoxide dismutase: organella specificity." *J Biol Chem.* 248:3582-3591.
- White, M. J. and Heckler, F. R. (1990). "Oxygen free radicals and wound healing." *Clin Plast Surg.* 17(3):473-84.
- William J. B. (1974). Histology and Comparative Organology: a text-atlas. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA.

-
- Winston, G. W. and Cederbaum, A. I. (1983^a). Evidence for two ethanol oxidizing pathways in reconstituted mixed-function oxidase systems. *Pharmacol Biochem Behav.* 18:Suppl1:89-94.
 - Winston, G. W. and Cederbaum, A. I. (1983^b). NADPH-dependent production of oxy radicals by purified components of the rat liver mixed function oxidase system. II. Role in microsomal oxidation of ethanol. *J Biol Chem.* 258:3. 1514-1519.
 - Wu, D. and Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.* 2003;27(4):277-84
 - Wu, G.; Fang, Y. Z.; Yang, S.; Lupton, J. R. and Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134(3):489-92.
 - Yang, C. S.; Tu, Y. Y.; Koop, D. R. and Coon, M. J. (1985). Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.* 45:1140.
 - Yang, H.; Zeng, Y.; Lee, T. D.; Yang, Y.; Ou, X.; Chen, L.; Haque, M.; Rippe, R. and Lu, S. C. (2002). "Role of AP-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone." *J Biol Chem.* 277(38):35232-9.
 - Yin, S. J. (1994). Alcohol dehydrogenase: enzymology and metabolism. *Alcohol and Alcoholism.* Suppl. INC. 2:133-119.
 - Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Rev.* 74:139-162.
 - Zentella de Piña, M.; Hernández-Tobías, A.; Saldaña-Balmori, Y.; Díaz-Belmont, A. and Piña, E. (1992). Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory. *FEBS Lett.* 298:123-125.
 - Zentella de Piña, M.; Saldaña-Balmori, Y.; Hernández-Tobías, A. and Piña, E. (1993). Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcoholism: Clin Exp Res.* 17:1228-1232.
 - 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.; Corona-García, S.; Rocha-Hernández, A. E.; Saldaña-Balmori, Y.; Cabrera, G. and Piña, E. (1994^a). Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. *Life Sciences*. 54(19):1433-1439.
 - Zentella de Piña, M.; Corona-García, S. and Saldaña-Balmori, Y. (1994^b). Toxicidad del Oxígeno: Papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *Boletín de Educación Bioquímica*. Facultad de Medicina. UNAM. México, D. F. 87-93.
 - Zentella de Piña, M.; Díaz-Belmont, A.; Rodríguez, L.; Rocha-Hernández, A. and Corona-García, S. (1995). Glutathión Sanguíneo en el paciente alcohólico con hepatopatía. *Revista Medica del Hospital General de México*. 58:52-58.
 - Zentella de Piña, M. and Saldaña-Balmori, Y. (1996). Papel Fisiológico de los Radicales Libres. *Boletín Educación Bioquímica*. Facultad de Medicina. UNAM. México, D. F. 15:152-161.
 - Zentella de Piña, M.; Castell-Rodríguez, A.; Saldaña-Balmori, Y.; Rocha-Hernández, A.; Ramírez-González, M. D.; Carabez-Trejo, A. and Piña, E. (1997). Effect of piroxicam on carbon tetrachloride-induced liver injury. *PWPSA*. 40:91-3.
 - Zentella de Piña, M. (2002). Los anti-inflamatorios no esteroideos modifican la respuesta lipolítica a la epinefrina en los adipositos aislados de la rata. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM.
 - Zentella de Piña, M.; Vázquez-Meza, H.; Agundis, C.; Pereyra, M. A.; Pardo, J. P.; Villalobos-Molina, R. and Piña E. (2007). Inhibition of cAMP-dependent protein kinase A: a novel cyclo-oxygenase-independent effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in adipocytes. *Auton Autacoid Pharmacol*. 27(2):85-92.
 - Zimatkin, S. M. and Deitrich, R. A. (1997). Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology*. 2:387-399