UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PAPEL DE ALGUNOS ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDES EN LA LIPOPEROXIDACIÓN HEPÁTICA PROVOCADA POR ETANOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
(Orientación BIOQUÍMICA)

P R E S E N T A:

YOLANDA DEL SOCORRO SALDAÑA BALMORI

Tutor: Dr. ENRIQUE PIÑA GARZA

MÉXICO, D. F. Diciembre 2009

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

PAPEL DE ALGUNOS ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDES EN

LA LIPOPEROXIDACIÓN HEPÁTICA PROVOCADA POR ETANOL.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Piña Garza en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Enrique Piña Garza	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM
Dr. Jesús Manuel León Cázares	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Martha Zentella de Piña del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos.

Se reconoce la participación de la Dra. Raquel Guinzberg en el aislamiento de los hepatocitos.

Se reconoce la participación de todos los coautores participantes en las publicaciones ya que cada una de ellas, fue un trabajo de conjunto.

Se reconoce la ayuda técnica del Sr. Gabriel Moreno Campero y del MVZ Enrique Moreno Hernández.

Para la realización de los experimentos de las publicaciones que se anexan se contó con los apoyos de DGAPA-UNAM: IN21048, IN207292, IN208992, IN210094, IN212695, IN213695.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Fernando López Casillas .	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. José Pedraza Chavarri	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Edgar Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

A JAVIER
por su cariño y apoyo incondicional.

MARÍA YOLANDA Y JAVIER y a sus familias
por el amor y fuerza que me inspiran.

A LA UNIVERSIDAD
por la oportunidad que me ha dado de crecer.

Agradezco al DR. ENRIQUE PIÑA GARZA
su estímulo para culminar esta etapa.

CONTENIDO

Página

1. RESUMEN. 6
2. ABSTRACT. 9
3. ABREVIATURAS. 11
4. INTRODUCCIÓN
4.1. GENERALIDADES. 13
4.2. QUIMICA DEL ETANOL 14
4.3. ABSORCIÓN DEL ETANOL. 15
4.4. HÍGADO. 18
4.5. TRIACILGLICEROLES. 21
4.6. METABOLISMO DEL ETANOL. 21
4.6.1. Deshidrogenasa alcohólica. 22
4.6.2. Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS). 24
4.6.3. Catalasa. 26
4.6.4. Deshidrogenasa aldehídica. 27
4.7. REACCIONES BIOQUIMICO-PATOLOGÍCAS DEL ETANOL Y ACETALDEHÍDO. 28
4.8. OXÍGENO. 31
4.9. RADICALES LIBRES. 32
4.10. RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO. 32
4.10.1. Radical superóxido. 33
4.10.1.1. En la cadena de transporte de electrones. 34
4.10.1.2. Con intervención de NADPH oxidasa. 35
4.10.1.3. En el proceso de daño durante el alcoholismo. 36
4.9.1.4. En la auto-oxidación. 37
4.10.2. Peróxido de hidrógeno. 39
4.10.3. Radical hidroxilo. 40
4.11. ESTRÉS OXIDATIVO. 42
4.12. LIPOPEROXIDACIÓN. 43
4.13. METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO. 47
4.14. INFLAMACIÓN. 50
4.15. INFLAMACIÓN HEPÁTICA OCASIONADA POR EL ETANOL. . 51
4.16. ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS. 52
4.16.1. Ácido acetilsalicílico. 56
4.16.2. Dipirona. 57
4.16.3. Naproxen. 58
4.16.4. Nimesulide. 59
4.16.5. Piroxicam. 60
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. 61
6. HIPÓTESIS. 62
7. OBJETIVOS. 63
8. MATERIAL Y MÉTODOS. 64

9. RESULTADOS. 68
Artículo 1
Zentella de Piña M, Hernández-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A, Piña E. (1992), Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Letters. 298(2-3):123-125. 69
Artículo 2
Zentella de Piña M, Saldaña-Balmori Y, Hernández-Tobías A, Piña E. (1993) Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. Alcohol Clin Exp Res. 17(6):1228-1232. 74
Artículo 3
Zentella de Piña M, Corona S, Rocha-Hernández AE, Saldaña-Balmori Y, Cabrera G, Piña E. (1994) Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. Life Sciences. 54(19):1433-1439. 81
Artículo 4
Saldaña-Balmori Y, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Rocha-Hernández A, Piña E. (1996) Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated hepatocytes. European J Pharmacology. 317:225-229. 90
Artículo 5
Riveros-Rosas H, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Saldaña-Balmori Y, Julián-Sánchez A, Saavedra-Molina A, Piña E. (1999). Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes. European J Pharmacology. 380:49-59. 99
10. DISCUSIÓN. 111
11. CONCLUSIONES. 118
12. PERSPECTIVAS. 119
13. REFERENCIAS. 120
14. ANEXOS
Artículo 6
Pérez-Tapia E, Saldaña-Balmori Y, Zentella-De Piña M, Ramírez-González MD, Piña-Garza E. (1996) Piroxicam and tenoxicam effects on ethanol-induced lipid peroxidation in brains of CD-1 male mice. Proc West Pharmacol Soc. 39:77-79. 142
Artículo 7
Zentella de Piña M, Castell-Rodríguez A, Saldaña-Balmori Y, Rocha-Hernández A, Ramírez-González MD, Cárabez-Trejo A, Piña-Garza E. (1997) Effect of piroxicam on carbon tetrachloride-induced liver injury. Proc West Pharmacol Soc. 40:91-93. 145

1. RESUMEN.

Se estudió la capacidad de cinco anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs): ácido acetilsalicílico, dipirona, naproxen, nimesulide y piroxicam, para disminuir el nivel hepático de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, TBARS, (por sus siglas en inglés) –como índice de la lipoperoxidación tisular debida a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO)— así como la modulación de los niveles de triacilgliceroles (TAG) generados en animal íntegro ante la ingesta aguda y excesiva de etanol (3-5 g/kg). Se miden los mismos indicadores en hepatocitos aislados incubados con etanol o lactato en presencia de piroxicam con o sin epinefrina.

La intoxicación aguda con etanol ocasiona un estado inflamatorio en el hígado con aumento de ERO y TAG. Los AINEs —anti-inflamatorios clásicos inhibidores de la ciclooxigenasa (COX)— abatirán la respuesta inflamatoria con la disminución de ERO, yconsecuentemente habrá menor lipoperoxidación, y por ende, niveles más bajos de TBARS, además permitirían una mayor acumulación de TAG en la medida de que se evite la lipoperoxidación.

Se utilizaron dos modelos

In vivo: ratas macho con ayuno controlado recibieron simultáneamente el etanol y el AINE elegido. En muestras de hígado se realizaron las determinaciones de TAG, TBARS y proteínas; en sangre se midieron los niveles de etanol residual.

In vitro: hepatocitos aislados de rata se incubaron en presencia de etanol o de concentraciones equimoleculares de lactato y del AINE, piroxicam. Adicionalmente, en unas muestras se incluyó epinefrina para simular su elevación en sangre por intoxicación *in vivo* con etanol. Se midió el contenido de TAG y de proteínas, la producción de TBARS y el consumo de etanol o lactato.

El etanol *in vivo* aumenta los niveles hepáticos de TAG y TBARS. Los 5 AINEs impiden los aumentos de TBARS, lo que coincide con la hipótesis propuesta, y los 5 AINEs también impidieron el aumento en TAG, lo cual es benéfico para el sujeto intoxicado, pero está en contra de la hipótesis anotada. Además, algunos de los AINEs ocasionaron una importante disminución del etanol en sangre. Los anti-inflamatorios más efectivos para

alcanzar el decremento de la lipoperoxidación fueron el naproxen y el piroxicam y la mejor respuesta para disminuir el contenido de TAG la ofrecieron la dipirona y el naproxen. Los AINEs empleados *in vivo* limitan los efectos tóxicos del etanol al disminuir sus niveles sanguíneos —posiblemente por acelerar su oxidación— y prevenir la elevación de TAG y TBARS en el hígado.

De manera similar, en los hepatocitos incubados con piroxicam se estimula la oxidación del lactato, y en menor escala del etanol y en estos últimos se abaten los niveles de TBARS incrementados por la acción del etanol. Sin embargo, el piroxicam a altas concentraciones ya sea con etanol o con lactato y en concordancia con la hipótesis enunciada, aumenta los TAG en lugar de disminuirlos, tal como se observó *in vivo*. Comparativamente la inclusión de epinefrina en los experimentos *in vitro* evita el aumento de TAG e incrementa su oxidación en los hepatocitos incubados con lactato, mientras que en los que se incubaron con etanol y altas concentraciones de piroxicam la poza de TAG es mayor. Si bien el efecto del piroxicam de abatir los niveles de TBARS persiste en los hepatocitos incubados con etanol, a pesar de la presencia adicional de epinefrina.

Se comprueba experimentalmente la primera parte de la hipótesis de este trabajo: *in vivo* e *in vitro* los AINEs abaten en el hígado la respuesta inflamatoria provocada por el etanol, así disminuye la poza de ERO, disminuye la lipoperoxidación y bajan los niveles de TBARS. En relación con los TAG, si bien los AINEs al ser administrados *in vivo* disminuyen su nivel hepático elevado por la presencia de etanol, al ser ensayado *in vitro* aumentan su poza en presencia de etanol tal como se propone en la hipótesis del trabajo. Por lo tanto, el mecanismo empleado por el piroxicam para disminuir los TAG no parece ser consecuencia de una menor lipoperoxidación como se sugiere en la misma hipótesis. Lo anterior se refuerza con los resultados obtenidos al incubar hepatocitos con etanol en presencia de epinefrina, el piroxicam eleva la poza de TAG y disminuye los TBARS. Se propone como hipótesis, para explicar en el futuro estas acciones opuestas de los AINEs *in vivo* e in *vitro*, que los AINEs *in vivo* inhiben la acción conocida del etanol activando la lipólisis en adipocitos y así limitan el eflujo de ácidos grasos del tejido adiposo al hígado, con lo que disminuyen la poza de TAG.

En conclusión, los AINEs al disminuir los niveles de TAG y TBARS que se elevan en el hígado por la acción del etanol, pueden ser de utilidad para paliar los efectos tóxicos por la ingestión aguda de etanol.

2. ABSTRACT

The ability of five non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), acetylsalicylic acid, dipyrone, naproxen, nimesulide, and piroxicam, to decrease the hepatic levels of substances that react with thiobarbituric acid (TBARS) –as an index of tissular lipid peroxidation due to the presence of reactive oxygen species (ROS)– and to modulate triacylglycerols (TAG) generated in rats in response to acute ethanol intoxication was studied. In addition, we measured the same indicators in isolated hepatocytes incubated with ethanol or lactate in presence of piroxicam with or without epinephrine.

Acute ethanol intoxication produces and inflammatory state in the liver with increased ROS and TAG. NSAIDs, classical inhibitors of cyclooxygenase (COX), abate the inflammatory response with a diminution in ROS, consequently, less lipid peroxidation, leading to lower TBARS levels, aside from permitting a greater accumulation of TAG in the extent that lipid peroxidation is avoided.

Two models were used.
In vivo: male rats under controlled fasting conditions received simultaneously ethanol and the selected NSAID. TAG, TBARS, and proteins were determined in liver samples; residual ethanol was measured in blood.
In vitro: isolated rat hepatocytes were incubated in the presence of ethanol or of equicaloric concentrations of lactate and piroxicam. In addition, in some samples, epinephrine was included to simulate its increase in blood due to ethanol intoxication *in vivo*. We measured TAG, protein content, TBARS production, and the consumption of ethanol or lactate.

Ethanol *in vivo* increases hepatic levels of TAG and TBARS. The five NSAIDs avoided the increases in TBARS that is in accord with our hypothesis. The five NSAIDs block also TAG increase, which is in favor of the intoxicated subject, but is against our hypothesis. Besides, some NSAIDs induced a marked reduction of ethanol in blood. The most effective anti-inflammatory drugs to reach the decrement in lipid peroxidation were naproxen and piroxicam, and the best NSAIDs to decrease TAG content were dipyrone and naproxen. The NSAIDs used *in vivo* limit the toxic effects of ethanol by decreasing its

blood levels, possibly by accelerating its oxidation and preventing TAG and TBARS increments in the liver.

In a similar way, oxidation of lactate was stimulated and, to a lesser degree, ethanol in the hepatocytes incubated with piroxicam; TBARS levels, increased by ethanol action, are abated. However, piroxicam at high concentrations of either ethanol or lactate, and in concordance with our hypothesis, increased TAG, instead of decreasing them, as observed *in vivo*. Comparatively, epinephrine supplemented in the *in vitro* experiments avoided the increase in TAG and increased its oxidation in the hepatocytes incubated with lactate, whereas in hepatocytes incubated with ethanol and high piroxicam concentrations, the TAG pool was greater. However piroxicam's effect persisted and abated TBARS only in those hepatocytes incubated with ethanol, even in epinephrine presence.

The first part of the hypothesis was confirmed experimentally: NSAIDs both *in vivo* and *in vitro* in the liver abate the inflammatory response induced by ethanol, decrease the ROS pool and lipid peroxidation, as well as TBARS levels. Regarding TAG, assayed NSAIDs diminished their hepatic levels by the presence of ethanol, but when assayed *in vitro* increased their hepatic pool by the presence of ethanol as proposed in the working hypothesis. Therefore, the mechanism used by piroxicam to decrease TAG does not seem to be a consequence of a lower lipid peroxidation, as suggested by the hypothesis. Other results reinforce previous conclusion: piroxicam increased the TAG pool and diminished TBARS in hepatocytes incubated in ethanol in the presence of epinephrine. A new hypothesis to explain in the future these opposite NSAIDs actions on hepatic TAG *in vivo* and *in vitro* is proposed: NSAIDs *in vivo* might inhibit the well known ethanol action activating adipocytes lipolysis, and thus, might lower fatty acid efflux from adipocytes to the liver gland to decrease TAG pool.

In conclusion, NSAIDs, by decreasing the TAG and TBARS levels that become elevated due the action of ethanol, could be used to ameliorate the toxic effects of acute ethanol intoxication.

3. ABREVIATURAS

$^{\cdot}OH$:	Radical hidroxilo
1-HET	radical libre 1-hidroxietil
$^1O_2$:	Singulete de oxígeno (ΔgO_2 y el Σg^+O_2)
4-HNE:	4-hidroxinonenal
AA:	Ácido araquidónico
ADH.	Deshidrogenasa alcohólica
AGNE:	Ácidos grasos no esterificados
AINE:	Anti-inflamatorio no esteroideo
AINEs:	Anti-inflamatorios no esteroideos
ALDH:	Deshidrogenasa aldehídica
ASA:	Ácido acetilsalicílico, Ácido 2-acetoxibenzoico
ATP:	Adenosintrifosfato
CAT:	Catalasa
CH_3-CH_2-OH:	Etanol
Cit b-Fe^{2+}:	Citocromo b reducido
Cit b-Fe^{3+}:	Citocromo b oxidado
CO_3^{2-}:	Carbonato
COO^-:	Grupo carboxilo
CoQ_{10}	Ubiquinona
COX:	Ciclooxigenasa (COX-1, COX-2)
CYP2E1:	Citocromo P450, citocromo P4502E1
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
Dp:	Dipirona, [(2,3-dihidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4-yl) metilamina] metanosulfonato de sodio
EDTA:	Ácido etilendiamino tetraacético
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
$FADH_2$:	Flavina adenina dinucleótido reducido
Fe^{2+}:	Fierro reducido
Fe^{3+}:	Fierro oxidado
GSH:	Glutatión reducido
GSSG:	Glutatión oxidado
H^+:	Hidrogenión
H_2O_2:	Peróxido de hidrógeno
$HO_2^{\cdot}$:	Radical hidroperoxilo, radical superóxido protonado
HPETE:	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
IL-1:	Interleucina-1
IL-6:	Interleucina-6
KOH:	Hidróxido de potasio
$L^{\cdot}$:	Radical libre de lípido
$LOO^{\cdot}$:	Radical lipoperoxilo o radical peroxilo
LOOH:	Lipoperóxido
Lp:	Lipoperoxidación
LPS	Lipopolisacárido
LT:	leucotrienos
MDA:	Malondialdehído
MEOS:	Sistema microsomal de oxidación del etanol

MPO:	Mieloperoxidasa
NAD:	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NEM:	N-etilmaleimida
NF-kβ:	Factor de transcripción nuclear kβ
Nm:	Nimesulide, N-(4-Nitro-2-fenoxifenil) metanesulfonamida
$NO^{\bullet}$:	Radical óxido nítrico
NO_3^-:	Íon nitrato
Nx:	Naproxen, Ácido (αS)-6-metoxi-α-metil-2-naftalenacético
$O_2^{\bullet -}$:	Radical superóxido
O_2:	Oxígeno molecular
O_2^{2-}:	Ión peróxido
O_3:	Ozono
OH^-:	Ión hidroxilo
PG:	Prostaglandinas
PLA_2:	Fosfolipasa A_2
Px:	Piroxicam, 4-hidroxi-2-metil-N-(2-piridinil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dióxido
$QH^{\bullet}$:	Semiquinona
QH_2:	Hidroquinona o ubiquinol
CD14:	Antígeno ·14 de CD (del inglés *cluster of* d*ifferentiation*)
RL:	Radical libre
$RO^{\bullet}$:	Radical alcohoxilo
$RO_2^{\bullet}$:	Radical peroxilo
SOD:	Superóxido dismutasa
TAG:	Triacilgliceroles
TBARS:	Sustancias que reacciona con el ácido tiobarbitúrico
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral
TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano
TX:	Tromboxanos
Vitamina E:	α-tocoferol

4. INTRODUCCIÓN.

4.1. GENERALIDADES

La adicción al etanol es uno se los problemas de salud más serios del mundo, ya que es el compuesto tóxico que más frecuentemente y en mayor cantidad ingiere el humano. El etanol alcanza concentraciones muy altas en la sangre y en general en los tejidos del organismo, fácilmente se llega a una concentración de 20 mM en un bebedor social y de 80 mM en un adicto, si se compara con la concentración fisiológica de glucosa en sangre que es de 5mM y se trata del componente más abundante de la dieta. Dichas concentraciones representan un problema metabólico para el hígado, principal sitio donde el etanol es metabolizado.

Además el etanol no puede considerarse un nutrimento fisiológico, y mucho menos a las concentraciones que lo ingiere un adicto. Como consecuencia de lo anterior, el organismo de los mamíferos no dispone de un equipo enzimático propio para la adecuada degradación del etanol. Si bien este tóxico es degradado completamente tal como se verá más adelante, lo hace desplazando a sistemas enzimáticos relativamente inespecíficos, cuya función fisiológica es distinta a la oxidación del etanol, y por lo mismo no existen mecanismos para regular su oxidación, la cual se hace lenta. Debido a lo anterior, la concentración elevada de etanol en los tejidos se mantiene por horas, lo que favorece un conjunto de respuestas sociales indeseables.

No cabe duda que la ingesta de etanol sea un serio problema social y de salud pública. Se calcula que en México existen 34 millones de personas entre 12 y 65 años de edad que son bebedores, y de ellos 14.2 millones beben alcohol ”bajo patrones que ponen en riesgo su salud y la de terceros”; esta adicción afecta a una gran cantidad de personas, de modo que un número aproximado de 40 millones de personas viven un conflicto social intrafamiliar relacionado con el etanol. Las pérdidas económicas asociadas a la ingestión no controlada de etanol son incalculables ya que según las encuestas, el consumo de bebidas alcohólicas se presenta con mayor frecuencia en las etapas productivas, por consiguiente la mayoría de los bebedores fuertes y sus dependientes se encuentran integrados a la fuerza productiva. El número de defunciones debidas directamente al etanol, en particular la cirrosis hepática, coloca a México como uno de los líderes mundiales, en los últimos tiempos en el número de defunciones por cirrosis hepática, el

cual es cercano a 22,000 individuos al año, esto significa la tercera causa de muerte y representa el 9% del total de muertes ocurridas en el país. (CONADIC, 2003-2004)

Ante ese panorama resulta conveniente conocer más sobre la bioquímica-patología de las enfermedades alcohólicas. Al presente no acaba de conocerse con precisión el mecanismo molecular que en muchos bebedores, pero que no en todos, conduzca a un estado terminal de la enfermedad. Desde luego que se conocen las diferentes etapas a través de las cuales el hígado de un bebedor llega a la cirrosis, pero se desconoce por qué no sucede en todos los casos, por qué las etapas tienen una duración diferente en los distintos individuos, cuáles son los mecanismos desencadenantes que hacen pasar de una etapa a otra en la enfermedad, etc. La secuencia básica en las distintas etapas que produce la ingestión exagerada y continua de etanol se ha revisado en multitud de trabajos e incluye: hepatitis con inflamación y estrés oxidativo, esteatosis y cirrosis. En esta tesis se busca, conocer la manera en la que logran interferir algunos antiinflamatorios no esteroideos en el establecimiento de algunas acciones tóxicas iniciales que desencadena la ingestión aguda de etanol en el hígado, y así tratar de evitar o retrasar el progreso de las lesiones para no llegar a la cirrosis, que es la etapa final de la enfermedad y que es considerada como irreversible.

4.2. QUÍMICA DEL ETANOL

El alcohol etílico o etanol (CH_3-CH_2-OH) es una droga que se ha usado a través de los siglos, su consumo es aceptado por la gran mayoría de los países del mundo y a diferencia de otras drogas, en los eventos sociales es más notoria su ausencia que su presencia.

La historia de la producción y del consumo de etanol data desde tiempos bíblicos en el Libro del Génesis; además de que se tienen múltiples datos provenientes de muy diversas fuentes: se tiene información que en la Mesopotamia de consumía cerveza 3,000 años AC; según el Código de Hamurabi se amparaba a los bebedores de cerveza y vino de palma; en una tablilla cuneiforme de 2,200 AC se recomienda el consumo de la cerveza para las mujeres en el periodo de lactancia; los griegos rendían culto a Dionisio y ofrecían bebidas alcohólicas a sus dioses. En ciertas culturas, el acceso al etanol fue considerada

como una prerrogativa de las clases altas y no se permitía la bebida a mujeres y niños. Los romanos apreciaron grandemente al vino y contribuyeron a que se difundiera la vid por toda Europa y se tiene información que fueron los árabes quienes descubrieron el proceso de la destilación. A partir de la Revolución Industrial las bebidas alcohólicas se producen en grandes cantidades por la fermentación de frutos y granos. En casi todos los grupos sociales su consumo es alto entre los adultos, pero en algunos grupos de adolescentes alcanza niveles insospechados en casi todo el planeta.

La notación científica para designar la concentración de etanol es la milimolar (mM) aunque también se emplea la concentración en mg/dl, de ahí que una concentración 1mM equivale a 4.6 mg/dl.

4.3. ABSORCIÓN DEL ETANOL

El etanol es un metabolito que normalmente en condiciones fisiológicas y en ausencia de su ingestión, se encuentra presente en los mamíferos a concentraciones que varían entre 0.1 y 1.0 mM debido a las fermentaciones producidas en el tracto gastrointestinal por la presencia de la flora microbiana; tentativamente en el humano adulto se produce diariamente una cantidad cercana a 3 gramos de etanol lo que ocasiona que en sangre portal haya una concentración aproximada de 0.5 mM. Hay otra pequeña proporción de etanol endógeno que se produce en diferentes tejidos, preferentemente el hígado, debido a algunas reacciones de degradación que generan acetaldehído, el cual por medio de la deshidrogenasa alcohólica se reduce a etanol y también puede ser proporcionado en la dieta cuando se ingieren alimentos fermentados. Hay datos en la literatura (Krebs y Perkins, 1970) de animales intoxicados después de la ingesta de manzanas u otros frutos podridos.

En el hombre la principal fuente de su ingesta es el consumo de bebidas alcohólicas, provenientes de la fermentación de azúcares presentes en frutos o granos ya sea uva, trigo, arroz, manzana, maguey, por mencionar algunos. A diferencia de otras drogas el etanol es una fuente importante de energía ya que proporciona 29.7 kJ (7.1 kcal) por gramo, bastante más de lo que ofrecen los carbohidratos o las proteínas. A estas calorías

se les ha llamado calorías vacías ya que sólo aportan energía y no los otros componentes necesarios para la formación de tejido. En las bebidas alcohólicas, están presentes algunos nutrimentos en cantidades mínimas, al mismo tiempo que se genera una gran cantidad de energía, por ejemplo, un litro de vino con 12% de etanol genera un valor próximo a 3,000 kJ.

La duración en el abuso de etanol y el promedio en el consumo diario, al parecer, están correlacionados con una buena cantidad de sus efectos adversos, lo que afecta principalmente al sistema nervioso central y al hígado, sin dejar de lesionar otros tejidos. Un alcohólico puede consumir la mitad de su requerimiento energético diario a partir de etanol, que lo conduce a deficiencias nutricionales y vitamínicas; simultáneamente, hay mala digestión, complicaciones gastrointestinales, mala absorción de tiamina y folato, además de daño directo al páncreas e intestino delgado. Asociado a los desórdenes nutricionales, se desarrollan algunas patologías como la cirrosis hepática, hepatitis aguda, trastornos cardiacos, todo esto aunado a que los productos derivados de su oxidación tienen una acción directa sobre las membranas celulares. Por otro lado, el etanol deprime la actividad del sistema nervioso central, aunque a bajas concentraciones actúa como un estimulante debido a que hay una depresión de los mecanismos inhibitorios del cerebro, dependiendo de la cantidad ingerida y de la tolerancia del individuo, el proceso puede oscilar desde leve desinhibición, hasta coma, depresión respiratoria y muerte. En fin, hay una gran diversidad en el tipo y severidad de los daños que se presentan en los alcohólicos tanto en la magnitud de la lesión como en la latencia para que se presente, lo cual hace pensar que existen factores genéticos que influyen tanto de una manera cualitativa como cuantitativa en el metabolismo y manejo del etanol.

Hay evidencias experimentales de que la mujer es más susceptible a la ingestión de etanol tanto al aumento en su concentración sanguínea, como al daño ocasionado en los tejidos con la misma cantidad de etanol que el hombre, posiblemente porque posee una mayor proporción de grasa corporal y menor cantidad de agua en los tejidos, aunque también esta susceptibilidad puede deberse a diferencias hormonales (Frezza *et al*., 1990) o a las diferencias cuantitativas en la actividad de deshidrogenasa alcohólica en el estómago (Hernández-Muñoz *et al*.,1990).

Después de la ingesta de etanol, una muy pequeña parte se absorbe a través de la mucosa bucal y en su forma de vapor por los alvéolos pulmonares, la mayor absorción se realiza en el estómago por difusión simple a través del epitelio gástrico y en las regiones de duodeno y yeyuno del intestino delgado ya que es una molécula pequeña, polar y soluble en agua, tiene la capacidad de permear a través de todos los tejidos del cuerpo. A los 5 minutos de la ingesta se detecta etanol en sangre, a los 30 minutos se alcanza la concentración plasmática más elevada y esta continuará mientras haya un gradiente de concentración entre el tracto gastrointestinal y la sangre.

Por otro lado, la velocidad de absorción dependerá de una diversidad de factores como son: volumen de la ingesta, presencia o no de alimentos en el estómago, los grados de alcohol de la bebida, rapidez de la ingesta, tipo de bebida alcohólica, factores genéticos, velocidad de vaciado gástrico, etc. Es importante mencionar que a mayor cantidad de alimento en el estómago o mayor concentración de etanol en la bebida se retrasa el vaciado gástrico. La velocidad de absorción del etanol, aun en un moderado consumo del mismo, excede significativamente la capacidad hepática para oxidarlo; a este respecto y como ya se mencionó el metabolismo del etanol es ineficiente en comparación con el metabolismo de los nutrientes primarios, como es el caso de los carbohidratos o las grasas.

Luego de su absorción el etanol ingresa a la vena porta, atraviesa el hígado, sale por la vena hepática, el corazón lo envía a circulación periférica permitiendo con esto que se distribuya en todos los tejidos y fluidos del organismo. El equilibrio se alcanza más rápidamente en aquellos órganos que están más vascularizados, tal es el caso de hígado, cerebro, pulmones y riñones. Ya que el etanol reacciona poco con componentes celulares y no puede acumularse en algún órgano, se elimina como tal en pequeñas cantidades, pero su destino preferente es eliminarse a través de la oxidación. Aproximadamente el 90% del etanol ingerido se metaboliza por las vías oxidativas, preferentemente del hígado siguiendo una cinética de orden cero a una velocidad de 12 a 20 mg/dl/hora, el 10% restante tendrá un metabolismo extrahepático en estómago, riñones y pulmones o bien se eliminará por la orina, la respiración y el sudor.

4.4. HÍGADO.

El hígado está constituido por células parenquimatosas o hepatocitos que representan del 60 al 80% del total, además de las no parenquimatosas donde las más importantes son las células de Kupffer, las endoteliales y las estelares o de Ito; la alteración en el funcionamiento adecuado de estas células se presenta en diversas patologías, entre otras el tema central de esta tesis, el daño ocasionado por el alcoholismo.

Se ha descrito ampliamente que la ingesta elevada de etanol tanto en humanos como en animales de experimentación tiene una acción hepatotóxica, en donde hay un depósito excesivo de triacilglicéridos, al mismo tiempo que se encuentra deprimida la degradación y la exportación de éstos a la circulación. Estas situaciones coinciden con la esteatosis, que puede producir hígado graso (Lieber *et al*., 1965), cambios estructurales (Lane y Lieber, 1966), cirrosis (Rubin y Lieber, 1972; Lieber y DeCarli, 1974), aumento de la lipoperoxidación (Comporti *et al.,* 1973; Reitz, 1975; Di Luzio y Stege, 1977) así como la disminución de los principales antioxidantes (Rouach *et al*., 1997).

Existen numerosos estudios que conducen a un acercamiento para establecer el mecanismo por el cual se lleva a cabo el daño del hígado por el consumo de etanol. Con ellos se pretende dilucidar la secuencia de sucesos que ocurren a nivel molecular y se manifiestan por un daño hepático ya sea reversible o permanente. Los resultados de algunas de esta investigaciones permiten concluir que el etanol, entre otras acciones, desorganiza la estructura de los lípidos de las membranas dado que actúa indirectamente como agente oxidante sobre ellas; estos desórdenes membranales están asociados con cambios en las características físicas y químicas de los fosfolípidos aniónicos, en particular del fosfatidilinositol en los microsomas hepáticos y la cardiolipina en la membrana interna de la mitocondria (Hoek y Taraschi, 1988). Sin embargo, la interacción molecular precisa afectada por el etanol cuando se incorpora a la membrana biológica, o la naturaleza de los cambios físico-químicos en los fosfolípidos que constituyen la membrana permanecen sin identificarse (Conde de la Rosa *et al*., 2008).

Una de las primeras manifestaciones del efecto que tiene el abuso en el consumo de etanol en los humanos es la infiltración grasa en el hepatocito, proceso que puede

revertirse con el abandono de la ingesta alcohólica. En la hepatitis alcohólica, los hepatocitos se hinchan con citoplasma granular a menudo dispersado en finas hebras (Pignon *et al.*, 1987), hay esteatosis macrovesicular generalizada. Por otro lado, se ha encontrado que en las mitocondrias hay cambios de estructura y función, estos estudios se han hecho tanto en humano (Kiessling *et al*., 1964) como en ratas (Kiessling y Tobe, 1964) y se ha encontrado que después de un consumo exagerado de etanol por tres días, las mitocondrias se encuentran agrandadas, deformadas, con las crestas rotas, sin la organización normal y hay un decremento en la síntesis de ATP; estas alteraciones que presentan las mitocondrias coinciden con el desarrollo de hígado graso (Rubin *et al*., 1972; Cederbaum *et al*., 1975). Por estudios con el microscopio electrónico, se sabe que el número y porosidad de las células sinusoidales por la acción del etanol se ha reducido (Horn *et al*., 1987); todo esto interfiere con el cambio de sustancias entre el plasma y la membrana celular del hepatocito y probablemente contribuyan a la larga a establecer una hipertensión portal.

En relación al daño que ocasiona el etanol en el hígado humano, como ya se mencionó, depende de dos condicionantes, la cantidad de alcohol que se consuma y la frecuencia de la ingesta; dependiendo de esto se tiene que, un consumo agudo y ocasional puede producir esteatosis (hígado graso), este cuadro es reversible si se retira el estímulo. En esta situación hay un acúmulo de triacilgliceroles que obedece a dos causas, por un lado hay una movilización de ácidos grasos del tejido adiposo hacia el hígado (Muramatsu *et al*., 1981) al mismo tiempo que hay una inhibición de la oxidación de los mismos ya que en alcohólicos, la participación de agentes antioxidantes como el glutatión hepático y el alfa tocoferol presente en el suero, se encuentran disminuidos.

La ingesta elevada de etanol tiene una acción hepatotóxica debido a que hay vasodilatación portal que obliga a una mayor captación de lípidos en el órgano y al estar también elevado el nivel de NADH no pueden ser oxidados y hay la posibilidad de que esto conduzca al depósito excesivo de ellos en forma de triacilgliceroles. Al mismo tiempo su degradación y la exportación a la circulación se encuentran deprimidas, lo que coincide con la esteatosis, que puede revertirse como se dijo antes, o puede evolucionar a hepatitis y a cirrosis. La hepatitis alcohólica es responsable de un profundo daño a la función hepática, hay inflamación debido a la ruptura de microvasos, filtración de los

elementos sanguíneos en espacios intersticiales, migración de leucocitos y células fagocíticas, esto coincide con edema e hipersensibilidad, además de que hay liberación de prostaglandinas y leucotrienos y en ocasiones este cuadro está asociado con morbo y mortalidad.

Di Luzio y sus colaboradores (Di Luzio, 1963; Di Luzio y Hartman, 1967) fueron los primeros en sugerir que el etanol puede afectar el balance oxidativo de las células hepáticas conduciéndolas a un estrés oxidativo en donde simultáneo al aumento del contenido de triacilgliceroles (TAG), hay aumento de especies reactivas del oxígeno (ERO), los que afectan principalmente a los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas induciendo la lipoperoxidación. Con el aumento de la lipoperoxidación hay una pérdida de la fluidez membranal, además de que se alteran sus funciones de secreción y este hecho puede ser responsable de la muerte celular. Se considera que la intoxicación alcohólica, tanto aguda como crónica, es el principal inductor no fisiológico del estrés oxidativo tanto en humanos como en ratas.

En general el estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre las defensas antioxidantes de las que dispone la célula y las especies reactivas de oxígeno que fisiológicamente se generan por el transporte mitocondrial de electrones, el citocromo P4502E1, por los fagocitos activados y por las NADPH oxidasas. Aun cuando se sabe que el etanol induce estrés oxidativo en el hígado (Nordmann *et al*., 1987, 1990), el mecanismo por el cual el daño oxidativo contribuye a la patología hepática alcohólica todavía no se acaba de conocer (Baraona y Lieber, 1998; Albano, 2006; 2008).

En cada una de las etapas señaladas se llevan a cabo una serie de reacciones metabólicas en donde hay daño a un tipo de células y las moléculas que se producen como consecuencia, ocasionan a su vez una respuesta que afecta a un segundo tipo de células y así sucesivamente de modo que se establece una cadena de reacciones con sus productos de oxidación que en una primera etapa son responsables de la esteatosis. Posteriormente, esos metabolitos en otras células hepáticas ocasionan la formación de sus propios metabolitos que dañan a otras células y sus productos de oxidación conducen a la inflamación y así sucesivamente, de tal suerte que intervienen aproximadamente una

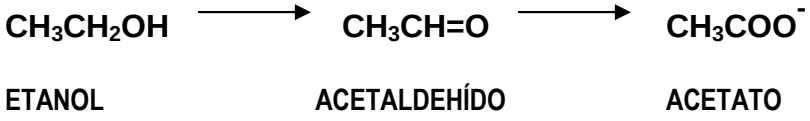
docena de tipos de células y se producen una decena de moléculas por la oxidación del etanol (Piña *et al*., 2003).

4.5. TRIACILGLICEROLES

Este tipo de moléculas cumplen en los seres vivos con una función muy importante, que es la de almacenar energía a largo plazo para la serie de procesos celulares que la requieran, además de que son aislantes térmicos ya que impiden la pérdida de calor corporal y protegen a los órganos vitales del exterior. Los triacilgliceroles (TAG) son estructuras resultantes de la esterificación de una molécula de glicerol con tres de ácido graso de cadena larga, debido a en esta unión no poseen grupos ionizables y por lo tanto son moléculas apolares e hidrofóbicas.

4.6. METABOLISMO DEL ETANOL

La primera etapa de la oxidación del etanol en las células de los mamíferos, en particular en el hígado, es la formación de acetaldehído la que puede llevarse a cabo a través de tres posibles sistemas enzimáticos, en compartimentos subcelulares y con mecanismos de reacción diferentes: A) con la participación de la deshidrogenasa alcohólica (EC 1.1.1.1) localizada en el citosol, B) por el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) en el retículo endoplásmico, y C) por medio de la catalasa (EC 1.11.1.6) presente en los peroxisomas; existe en menor escala, la actividad oxidativa extrahepática para formar acetaldehído en diferentes órganos: estómago, corazón y riñón, así como también hay una vía del metabolismo no oxidativo que da lugar a ésteres etílicos de los ácidos grasos (Goodman y Deyking, 1963). Una vez que se ha formado el acetaldehído por cualquiera de todas las vías, interviene la deshidrogenasa aldehídica (EC 1.2.1.3) que lleva a cabo su oxidación y se obtiene acetato, el cual a su vez se activa con coenzima A para integrarse a la vía de los ácidos tricarboxilicos



Finalmente, las enzimas participantes en el metabolismo del etanol presentan una gran heterogeneidad determinada genéticamente con polimorfismos de enzimas e isoenzimas lo que lleva a una variedad de fenotipos, de ahí que las diferencias individuales y raciales en el metabolismo del etanol, están determinadas genéticamente (Higuchi *et al*., 1994)

4.6.1. Deshidrogenasa alcohólica.

La deshidrogenasa alcohólica (ADH) (EC 1.1.1.1) dependiente de NAD^+ es una enzima citosólica presente en el hepatocito que oxida al etanol para obtener acetaldehído y viceversa. Este sistema es un conjunto de varias isoenzimas que comparten un 60-70% de identidad en los aminoácidos que las componen; en vertebrados se han identificado ocho clases y en humano se han encontrado cinco: ADH-1, ADH-2, ADH-3, ADH-4 y ADH-5 (Lieber, 1997), mientras que en otras especies como en la rata, se encuentran las isoenzimas ADH-1, ADH-2, ADH-3, ADH-4 y ADH-6 (Höög *et al*., 2001) y en pollo las clases ADH-1, ADH-3 y ADH-7. La ADH-1 es la que más se ha estudiado para entender el metabolismo y la toxicidad del etanol, al mismo tiempo es la más abundante en hígado, intestino, riñón y testículos su Km es de 0.2-2.0 mM, (Negoro y Wakabayashi, 2004), tiene una cinética de orden cero y su velocidad de reacción no se incrementa por la presencia de altas cantidades de etanol.

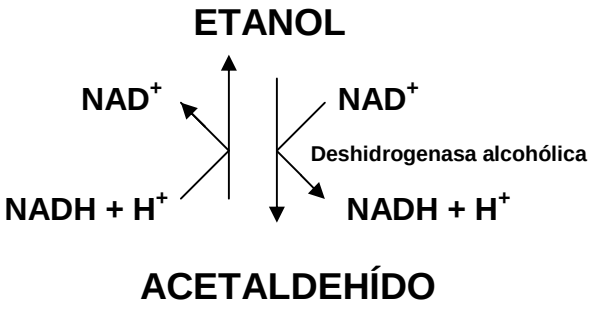


Fig. 1. REACCIÓN DE LA DESHIDROGENASA ALCOHÓLICA

Hay datos que indican que aproximadamente el 90% del etanol ingerido se oxida con la participación de la ADH (Palmer *et al*., 1991).

Vale la pena considerar algunas características del sistema de alcohol deshidrogenasas de los mamíferos esbozadas en la introducción de este trabajo. La Km de la deshidrogenasa alcohólica −donde quedan incluidas todas las isoenzimas que participan− cuando se usa como sustrato al etanol es muy alta y tiene un valor de 0.05 a 36 mM, el cual comparada con la Km de la misma enzima para el retinol es de 14 a 290 µM, este último valor es varios órdenes de magnitud menor. Lo anterior, aunado al hecho de que el etanol no se considera nutrimento fisiológico para los mamíferos, ha llevado a proponer que las llamadas deshidrogenasas alcohólicas que oxidan al etanol, en realidad son deshidrogenasas específicas de otros alcoholes, por ejemplo el retinol y que pueden oxidar al etanol cuando la concentración de éste es cientos o miles de veces mayor que las de su sustrato natural. Riveros Rosas y colaboradores (1997) han publicado una lista de deshidrogenasas celulares de varios tejidos que pudieran oxidar al etanol. Algunas consecuencias de este punto de vista pueden comentarse: el etanol como sustrato espurio presente en altas concentraciones impediría la acción fisiológica de la enzima y no sucedería la oxidación del sustrato natural de la enzima, lo que alteraría la función de una etapa enzimática y con ello podría haber acumulación transitoria del sustrato natural en forma reducida, y concomitantemente, carencia del producto natural, un compuesto oxidado. Esta visión puede ser relevante en tejidos como el sistema nervioso central donde ocurren, después de la intoxicación aguda con etanol, un conjunto de alteraciones funcionales difíciles de analizar y de ubicar.

En el hígado, una de las consecuencias de la oxidación preferente del etanol y de la falta de regulación en su oxidación, es que se desplaza la reacción para formar acetaldehído y NADH en el citosol del hepatocito, donde se ubica la deshidrogenasa alcohólica. En esas condiciones sube la relación NADH/NAD^+, y disminuye la actividad catalítica de todas las deshidrogenasas del citosol. Una de las más afectadas es la deshidrogenasa láctica, con lo que se acumula lactato que sale de la célula hepática y explica la acidosis láctica frecuente en los alcohólicos. En situaciones normales, el NADH generado por las deshidrogenasas citosólicas es reconvertido en NAD^+ por medio de las llamadas lanzaderas que incorporan los equivalentes reductores del NADH al seno mitocondrial donde son incorporados a la cadena respiratoria. La desmedida oxidación del etanol en el citosol sobrepasa la capacidad de regenerar al NAD^+ y por ello se acumula NADH

4.6.2. Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS).

El término citocromo P450 incluye a una familia de citocromos de la que se han identificado al menos 40 diferentes especies en humanos. La proliferación del retículo endoplásmico después del consumo crónico de etanol sugiere la existencia de un camino adicional el cual fue descrito originalmente por Lieber y DeCarli (1968) al que llamaron sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS del inglés microsomal ethanol oxidizing system). Aquí participa el citocromo P450 específicamente la CYP2E1 que cataliza también el metabolismo de otras drogas hepatotóxicas, con las cuales compite por su degradación convirtiéndolas en metabolitos tóxicos, lo que explica el aumento de la susceptibilidad de los alcohólicos a los efectos adversos de varios xenobióticos, en donde quedan incluidos algunos solventes orgánicos. En bebedores crónicos, hasta un 25% de la ingesta alcohólica se oxida por la vía del MEOS debido a que la ADH se encuentra saturada por la cantidad de etanol presente. La oxidación del etanol por esta vía constituye una afirmación al enunciado anterior: el etanol, un tóxico cuya desaparición ocurre vía sistemas de detoxificación, al igual que fármacos y venenos.

La vía del MEOS es llamada así porque se encuentra en el paquete microsomal después del fraccionamiento subcelular del homogenizado de hígado. Esta fracción se obtiene cuando las células hepáticas son rotas y las membranas plasmáticas junto con el retículo endoplásmico forman vesículas que se sedimentan por centrifugación a alta velocidad; de ahí que los microsomas no son una fracción subcelular sino que se obtienen de una colección de vesículas de membranas de diferentes partes de la célula. La velocidad de oxidación en esta vía es dependiente de la concentración de sustrato y se induce con la ingesta crónica de etanol ya que la vía de oxidación principal se encuentra saturada.

$$CH_3CH_2OH + NADPH + H^+ + 2O_2 \xrightarrow[\text{citocromo P450 reductasa}]{\text{CYP2E1}} CH_3CH{=}O + NADP^+ + 2H_2O_2$$

La CYP2E1 (Koop, 1992) requiere NADPH y oxígeno molecular para oxidar al etanol, en este proceso se obtiene peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a partir del cual pueden ocurrir la formación de radicales libres como son los radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e hidroxilo ($^{\cdot}OH$). Estas moléculas están directamente implicados en los efectos tóxicos del etanol (Lieber y DeCarli, 1970; Lieber, 2004); las especies reactivas de oxígeno generadas en este sistema y por otros que se mencionarán más adelante, contribuyen a la lipoperoxidación (Cahill *et al*., 2002).

En los trabajos de Albano y colaboradores se ha demostrado exhaustivamente que el CYP2E1 puede metabolizar al etanol en humanos y en animales de experimentación produciendo además del acetaldehído al radical libre 1-hidroxietil (Albano *et al*., 1988; 2006; González, 2005). Posteriormente ellos demostraron que la formación de este radical se debe principalmente a la actividad del sistema NADPH oxidasa dependiente de CYP2E1, y una menor parte del radical hidroxietilo sea atribuible a la reacción del etanol con los radicales $^{\cdot}OH$ generados a partir del H_2O_2 catalizado por fierro:

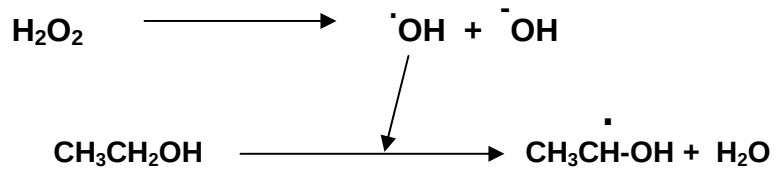


Fig. 2. FORMACIÓN DEL RADICAL 1-HIDROXIETIL A PARTIR DE ETANOL

Por técnicas con resonancia de espín electrónico se ha identificado que hay una asociación entre el radical 1-hidroxietil con la estimulación de la lipoperoxidación y el desarrollo del daño hepático. Este daño se realiza por reacciones de alquilación de las proteínas hepáticas y el radical 1-hidroxietil induce la producción de anticuerpos específicos. Albano y su grupo de trabajo han demostrado que los antígenos derivados de reacciones con el radical 1-hidroxietil interactúan con las membranas plasmáticas de

hepatocitos aislados tratados con etanol y desarrollan inmunotoxicidad (Albano *et al*., 1999; Clot *et al*., 1997).

Luego de los estudios realizados por Lieber y DeCarli en 1968, diversos grupos de trabajo encontraron que este sistema tiene gran capacidad para metabolizar además del etanol, a 1-butanol, 1-pentanol, anilina, acetaminofen que produce metabolitos tóxicos los cuales son promotores de la carcinogénesis, (Tephly *et al*., 1969; Morgan *et al*., 1983; Maddrey, 1988), acetona, tetracloruro de carbono (Johansson e Ingelman-Sundberg, 1985) y benceno entre otros o por experimentos *in vitro*, se ha encontrado que el etanol tiene un efecto inhibitorio sobre el proceso de oxidación de las otras drogas, posiblemente por una competencia por la unión al citocromo P450 para que se realice la detoxificación (Rubin *et al*., 1971) ya que hay más etanol que cualquier otro tóxico

4.6.3. Catalasa.

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa, contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Se encuentra presente en los peroxisomas (Oshino et al., 1975) y es capaz de oxidar al etanol a acetaldehído con la participación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la cantidad de etanol oxidado por esta vía tiene un valor máximo del 2%. La vía se ve favorecida cuando se produce H_2O_2 en los peroxisomas y se ha detectado que los niveles de esta enzima es alta cuando se estimula artificialmente la generación de peróxido de hidrógeno a partir de la oxidación *in vitro* de ácidos grasos en los peroxisomas (Handler y Thurman, 1985); por lo tanto, su principal función es regular los niveles de H_2O_2 en el organismo y eliminar la posible intoxicación debido su presencia. La oxidación del etanol por la catalasa se realiza en dos fases: en la primera se forma el compuesto I por la unión de la enzima al peróxido de hidrógeno y en la segunda el compuesto I se une al etanol el cual se oxida a acetaldehído al participar como donador de hidrógenos. (Keilin *et al*., 1945; Aebi, 1974).

$$\textbf{Catalasa} + H_2O_2 \longrightarrow \textbf{Compuesto I}$$

$$CH_3CH_2OH + \textbf{Compuesto I} \longrightarrow CH_3CH{=}O + 2H_2O + \textbf{Catalasa}$$

4.6.4. Deshidrogenasa aldehídica.

El acetaldehído, que se produce por los tres sistemas ya descritos, es metabolizado hasta acetato por la deshidrogenada aldehídica (ALDH) (EC 1.2.1.3), una enzima con un gran polimorfismo de la cual se han encontrado varias isoenzimas (Harada *et al*., 1978; 1985). En el hombre se han reportado al menos 9 isoformas, las cuales se han identificado por sus características enzimáticas y sus propiedades fisicoquímicas. La isoenzima hepática mitocondrial ($ALDH_2$) es la que probablemente tiene el papel más importante en el metabolismo del acetaldehído ya que tiene una Km baja (1-2 µM) y participa en el catabolismo del acetaldehído presente en individuos tanto con baja como con alta ingesta de etanol **(**Keiding *et al*., 1983). Por estudios realizados en hígado de rata se han identificado isoenzimas de la ALDH en mitocondrias, en el citosol y en los microsomas (Siew *et al*., 1976). En hígado de rata, la oxidación de bajas concentraciones de acetaldehído, se realiza por la isoenzima mitocondrial (Grunnet, 1973), con concentraciones superiores a 0.4 mM de acetaldehído, participa la isoenzima extramitocondrial (Lindros *et al*., 1974).

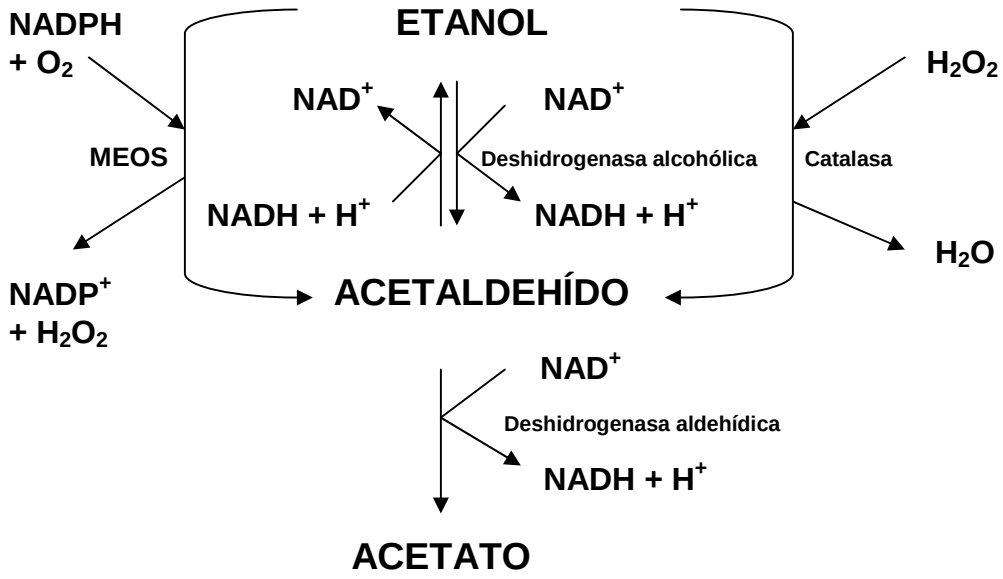


Fig. 3. PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS EN LA OXIDACIÓN DEL ETANOL

4.7. REACCIONES BIOQUIMICO-PATOLOGÍA DEL ETANOL Y ACETALDEHÍDO

La velocidad de absorción del etanol después de un consumo significativo excede la capacidad hepática para su oxidación, debido a ello, hay acumulo de acetaldehído y acetato en prácticamente todos los tejidos y NADH en el hígado. Estos últimos metabolitos en exceso, son mediadores de los efectos del etanol sobre la homeostasis (Palmer, 1989) y son responsables de una buena cantidad de desórdenes metabólicos. Por ejemplo, el acetato inhibe la lipólisis de los TAG en el tejido adiposo (Crouse *et al*., 1968; Lieber, 1982; Palmer *et al*., 1991); sin embargo, el efecto anterior se opone a la acción del etanol elevando los niveles de epinefrina (Szkudelski *et al*., 2004; Langin, 2006) la cual, en el tejido adiposo, tiene un pronunciado efecto lipolítico y favorece la liberación de ácidos grasos no esterificados, desde el tejido adiposo hacia los demás tejidos. Además, hay un incremento en la lipogénesis hepática lo que favorece la acumulación de TAG en parte por la mayor disponibilidad de acetato proveniente de la oxidación del etanol; esto se asocia a la acumulación de vacuolas lipídicas en el citoplasma del hepatocito durante la esteatosis. Por otro lado, el incremento de NADH a través de la reducción hepática del piruvato, aumenta la concentración de lactato, mismo que estimula la síntesis de colágena (Lieber, 2004) y simultáneamente disminuye la concentración de glutatión total (Das y Vasudevan, 2007).

En contraste, el mismo exceso de NADH generado durante la oxidación del etanol, puede inhibir la β-oxidación de los ácidos grasos y al ciclo de los ácidos tricarboxilicos, ya que el NADH que habría de producirse por esas vías para alimentar a la cadena de transporte de electrones, se reemplazó por el generado en la oxidación del etanol y como consecuencia en el hígado hay una disminución de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxilicos, de la oxidación de los ácidos grasos (You y Crabb, 2004), así como también se suprime agudamente la oxidación de aminoácidos.

Las consecuencias de las alteraciones moleculares por un aumento en la disponibilidad de acetaldehído han sido ampliamente documentadas. Al mismo tiempo, es interesante señalar que por investigaciones realizadas en la población japonesa, se observó una

deficiencia de la isoenzima $ALDH_2$ en aproximadamente el 50% de las biopsias hepáticas estudiadas (Agarwal *et al*., 1981). Por estudios posteriores, se encontró que hay amplia deficiencia de la isoenzima en poblaciones orientales y en algunas tribus sudamericanas. La pérdida o baja de la actividad enzimática se debe a la sustitución de un residuo de lisina por uno de glutamato (Crabb *et al*., 1983; Harada *et al*., 1985).

Por otra parte, el acetaldehído puede formar aductos estables con muchas sustancias y los complejos formados son responsables de un daño más permanente, como por ejemplo cuando se asocia con las proteínas de la membrana (Gaines *et al*., 1977; Nomura y Lieber, 1981; Barry y McGivan, 1985), con ADN (Ristow y Obe, 1978), con hemoglobina (Stevens *et al*., 1981), con fosfolípidos (Kenney, 1982), con lipoproteínas de baja densidad (Savolainen *et al*., 1987) y entre otros metabolitos, con algunas enzimas (Sunethra *et al*., 1988; Solomon, 1988). Dentro de las reacciones mencionadas una que es especialmente deletérea es la que realiza el acetaldehído en el hepatocito ya que interfiere con la polimerización de la tubulina que se lleva a cabo por la unión covalente de sus dímeros, formados por los grupos amino omega de los residuos de lisina (Sorrell y Tuma, 1985; Jennett *et al*., 1980). Esta falta de polimerización de la tubulina interfiere con la formación de microtúbulos en el hígado e impide el movimiento de organelos y proteínas dentro de la célula, y la interferencia con las proteínas de la membrana celular es probable que altere el transporte a través de ella. Lo anterior explica, en parte, porque uno de los primeros efectos del alcoholismo es la acumulación de proteínas dentro de los hepatocitos. Este defecto en el tránsito del hepatocito dañado probablemente interfiere con funciones hormonales, factores tróficos, biogénesis de péptidos y por supuesto el transporte de proteínas (Casey *et al*., 1989).

La oxidación del etanol está asociada con desórdenes muy importantes en el metabolismo general ya que hay un profundo desarreglo de la homeostasis con disminución del metabolismo oxidativo de lípidos y proteínas acoplado con resistencia a la insulina (Shelmet *et al*., 1988), supresión de la oxidación de la glucosa y reducción de su síntesis hepática, así como el decremento de la utilización de glucosa periférica.

El metabolismo hepático de los carbohidratos se afecta ya que por la generación excesiva de NADH, se inhibe el flujo gluconeogenético hepático de precursores de tres carbonos y

de aminoácidos glucogénicos, debido a esto, se puede presentar hipoglucemia (Hoffman y Goldfrank, 1989). En pacientes diabéticos, la oxidación del etanol está asociada con una marcada hiperlactacidemia; además, el etanol puede afectar la disponibilidad de precursores gluconeogenéticos por su efecto inhibitorio agudo sobre la síntesis de proteínas musculares (Preedy y Peters, 1988). Por otro lado, el músculo tiene una capacidad muy pequeña de oxidar al etanol, por lo se puede decir que los desarreglos ocasionados por el consumo excesivo de etanol se deben al etanol *per se* o a sus metabolitos.

Tanto en tejido adiposo, en hígado como en los tejidos periféricos se realiza una lipólisis anormal ya que el etanol afecta la cantidad de ácidos grasos transportados del tejido adiposo al hígado (Lieber et al., 1959). Por lo tanto, los mecanismos homeostáticos que gobiernan la fuente y disponibilidad de los combustibles derivados de los lípidos se perturban severamente por la oxidación del etanol ya que como se mencionó antes (Crouse *et al*., 1968; Lieber, 1982; Palmer *et al*., 1991), el acetato inhibe la lipólisis de los triacilglicéridos en el tejido adiposo y en consecuencia la administración aguda de etanol reduce la cantidad de ácidos grasos libres circulantes debido a la supresión periférica de su liberación.

La ingestión elevada de etanol, tiene una acción hepatotóxica debido al depósito excesivo de TAG y a su disminución en la degradación y exportación a la circulación, coincidiendo con el desarrollo de esteatosis. Simultáneamente, hay elevación de la lipoperoxidación iniciada por radicales libres, la cual afecta a los fosfolípidos de la membrana, ocasionando pérdida de sus funciones y bajo estas condiciones la capacidad antioxidante de la célula es insuficiente, lo que conduce al estrés oxidativo. Son muchos los estudios realizados para investigar el mecanismo mediante el cual se produce el daño hepático ante la ingesta de etanol. En el caso de la intoxicación aguda, es probable que un exceso de acetaldehído en el citosol hepático sea oxidado por una vía alterna en la que participe la xantina oxidasa y el radical $^{\bullet}OH$ desencadene la lipoperoxidación.

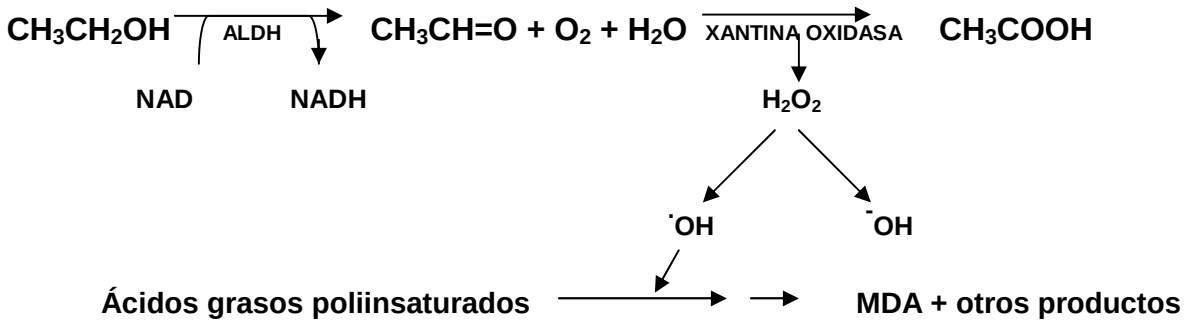


Fig. 4. PARTICIPACIÓN DE LA XANTINA OXIDASA EN LA LIPOPEROXIDACIÓN

4.8. OXÍGENO

Se estima que hace dos mil quinientos millones de años la atmósfera terrestre era reductora, carente de oxígeno y las formas de vida que existían en ella, eran organismos constituidos por células sin núcleo diferenciado, denominados procariotes. Cuando se desarrollaron las primeras formas de vida más compleja en la Tierra, las algas y los primeros vegetales emplearon la porción visible del espectro solar para producir energía a partir del agua. Este proceso muy eficiente llamado fotosíntesis, dio como producto final la generación de una cantidad muy grande de la molécula de oxígeno (O_2). Aproximadamente mil millones de años después, el O_2 había aumentado su proporción a aproximadamente el 1 % de la cantidad que existe actualmente y los eucariontes lo utilizaron para la oxidación y liberación de la energía contenida en los nutrimentos, al mismo tiempo que desarrollaron mecanismos de defensa contra el oxígeno, ya que éste también es susceptible de producir daño. Hace quinientos millones de años la concentración de oxígeno alcanzó aproximadamente el 10 % de su concentración actual, se formó la capa de ozono y surgieron los seres multicelulares. El oxígeno molecular es indispensable para la vida de los organismos aerobios ya que es el aceptor final de los electrones en la cadena respiratoria, vía por la que se habrá de producir la mayor cantidad de ATP.

El oxígeno es el elemento predominante en la costra terrestre y la proporción de éste en la atmósfera es del 21%, es un elemento indispensable para la vida y paradójicamente a concentraciones en el aire más altas que lo normal, ocasiona toxicidad en animales, plantas y bacterias aerobias. Gershman y colaboradores en 1954 propusieron que el principal efecto dañino del oxígeno puede ser atribuido a la formación de radicales libres.

4.9. RADICALES LIBRES.

El término de radical libre (RL) se ha definido como cualquier especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones no apareados en su capa de valencia. La presencia de por lo menos un electrón no apareado, ocasiona que las especies químicas sean paramagnéticas ya que son ligeramente atraídas por el campo magnético; en la mayoría de los casos estas especies son altamente reactivas.

La vida media del RL es de microsegundos, no viajan a gran distancia pero tiene la capacidad de reaccionar con todo su entorno. En los seres vivos los RL generados en exceso pueden dañar a las moléculas de los tejidos donde se encuentran.

Es fundamental señalar que los radicales libres cumplen con una significativa función biológica por lo que no siempre son dañinos. Por ejemplo, las mutaciones del ADN pueden ser fatales para un organismo en particular, pero también son las que explican que mediante la evolución haya la diversidad de especies que habitan este planeta. Los errores de replicación del ADN, la radiactividad natural y los rayos ultravioletas inducen mutaciones y es muy probable que los radicales libres hayan tenido un papel significativo en el proceso evolutivo. Otro ejemplo paradigmático sobre los beneficios de los RL en los vertebrados es su formación en cantidades moderadas, para luchar contra bacterias y virus y una vez que han cumplido su función, son neutralizados por el propio sistema mediante mecanismos específicos.

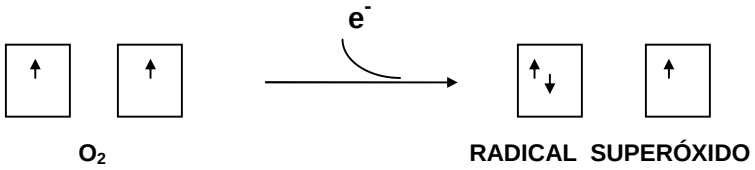
4.10. RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO

A pesar de que el O_2 es indispensable para la vida aeróbica, llega a ser tóxico cuando se encuentra a concentraciones más altas de lo normal, o es responsable de ciertas

patologías en situaciones de hipoxia. La toxicidad del oxígeno se debe a que tiene la capacidad de formar las llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO), algunas de ellas son RL, tienen una mayor reactividad y son de vida media más corta que el oxígeno en su estado basal. Estas especies son las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno molecular y son: dos formas de oxígeno singulete ($^1O_2$), los radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxilo ($^{\cdot}OH$), peroxilo ($RO_2^{\cdot}$), alcohoxilo ($RO^{\cdot}$) e hidroperoxilo ($HO_2^{\cdot}$); además del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que no es un RL pero tiene gran capacidad para formar $OH^{\cdot}$, o bien cuando el O_2 es parcialmente reducido y forma el ozono (O_3).

4.10.1. Radical superóxido.

Cuando a una molécula de O_2 se le añade un electrón, éste va a entrar en alguno de los dos orbitales que tienen un sólo electrón para dar lugar al radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) al que generalmente se le designa como superóxido:



La principal reacción del $O_2^{\cdot -}$ es la de la dismutación para producir peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la reactividad del $O_2^{\cdot -}$ es limitada, tiene la capacidad para oxidar a los complejos con metales de transición y a los sustratos orgánicos unidos a estos metales. Puede, mediante su protonación, dar lugar a la formación del radical hidroperoxilo ($HO_2^{\cdot}$) en medio ácido como en la vacuola del fagocito o en el microambiente de la membrana celular, el $HO_2^{\cdot}$ es un agente más oxidante y citotóxico que el propio $O_2^{\cdot -}$. El radical $O_2^{\cdot -}$ se forma durante la respiración celular en la mitocondria, también se produce por la participación del citocromo P450, por la acción de oxidasas como son la xantina oxidasa, las NADPH oxidasas y la sintasa de óxido nítrico desacoplada. Aproximadamente el 3% de la hemoglobina que un individuo oxida diariamente produce radical superóxido y

también lo obtiene la célula de la autooxidación de compuestos como el gliceraldehído o las flavinas reducidas.

4.10.1.1. En cadena de transportes de electrones.

En los organismos aeróbicos aproximadamente el 95% del oxígeno de la respiración es procesado mediante la reducción tetravalente para producir dos moléculas de agua en la reacción catalizada por la citocromo oxidasa participante de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. La citocromo oxidasa es el aceptor terminal de electrones y con ella se concluye la reducción de la molécula de oxígeno. La energía liberada por estas oxidaciones se canaliza para realizar la síntesis de ATP.

Se sabe que en la mitocondria y en el retículo endoplásmico es en donde se produce la mayor cantidad de $O_2^{\cdot-}$ dentro de la célula en condiciones fisiológicas y se estima que en la mitocondria, del 1 al 3% del total del oxígeno consumido diariamente es transformado en $O_2^{\cdot-}$. La reducción del oxígeno, en la cadena de transporte de electrones mediada por la citocromo oxidasa para producir agua, es considerado como un proceso relativamente seguro, a pesar de las reducciones univalentes intermedias en el proceso; el camino no enzimático de éstas reducciones univalentes del oxígeno, da como resultado la formación de algunas especies reactivas intermedias. El primer electrón que reduce al oxígeno da lugar al radical $O_2^{\cdot-}$, la adición de un segundo electrón y dos protones genera al H_2O_2 que fue reportado inicialmente en 1971 y en 1972 por Loschen (Loschen *et al*., 1971), y Boveris (Boveris *et al*., 1972) ambos del grupo de Chance; este H_2O_2 tiene dos posibilidades, una es romperse para dar lugar al ión hidroxilo (OH^-) y a la especie que es altamente reactiva, el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$) y la segunda continuar en la secuencia en donde un tercer electrón produce el radical $^{\cdot}OH$ además de liberar a un ión OH^- que al reunirse con un protón forma una primera molécula de agua y finalmente, un cuarto electrón sumado de un protón más, da lugar a la segunda molécula de agua.

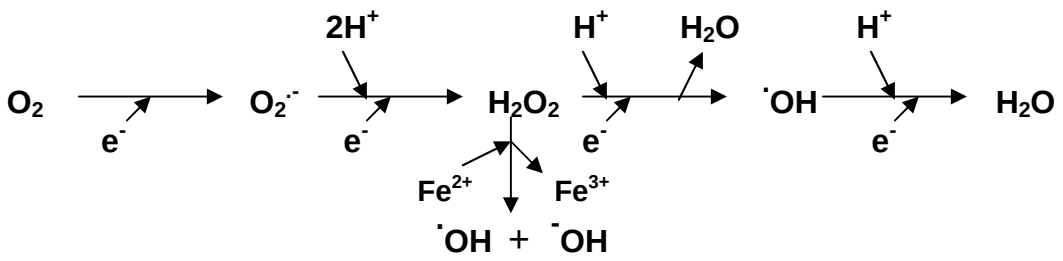


Fig. 5. REDUCCIÓN DEL OXÍGENO HASTA LA PRODUCCIÓN DE AGUA.

El ambiente reductivo de la célula proporciona amplias oportunidades para que el oxígeno pueda soportar paso a paso, las reducciones univalentes. De ahí que el $O_2^{\cdot -}$, el H_2O_2 y el $^{\cdot}OH$, sean productos en el ambiente aeróbico y que a la vez estos agentes aparezcan como responsables de la toxicidad del oxígeno.

4.10.1.2. Con la intervención de NADPH oxidasa,

El $O_2^{\cdot -}$ en mecanismos de defensa durante la fagocitosis. Otra fuente potencial de la generación de radicales libres son las células fagocíticas tales como los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos; estas células utilizan el sistema enzimático NADPH oxidasa para generar $O_2^{\cdot -}$ como parte de su arsenal contra la invasión de microorganismos. En la incorporación de bacterias dentro de los leucocitos durante la fagocitosis se lleva a cabo un aumento en el consumo de O_2 simultáneamente hay un mayor flujo de glucosa a través de la vía del fosfogluconato que produce niveles altos de NADPH y por la NADPH oxidasa el oxígeno produce $O_2^{\cdot -}$.

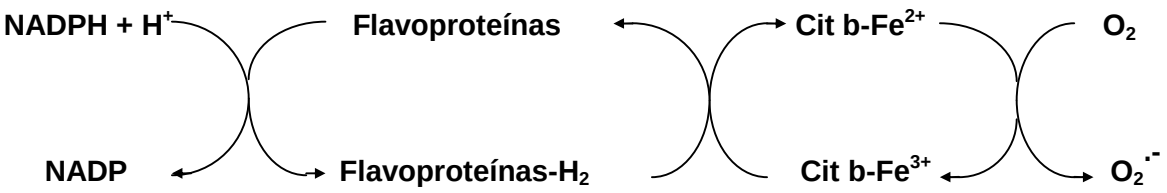


Fig. 6. PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO POR LOS FAGOCTITOS. EL CONSUMO DE OXÍGENO EN NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS ACTIVA A LA NADPH OXIDASA.

La NADPH oxidasa se encuentra en la superficie externa de la membrana cuando ésta se invagina y forma la vacuola fagocitaria que engloba a la bacteria engullida por el leucocito y la oxidasa actúa sobre el O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$. Posteriormente, ocurre una dismutación espontánea y se forma H_2O_2 el cual en presencia de halógenos como el cloro y con la participación de la enzima mieloperoxidasa (MPO), forma hipoclorito con una función bactericida.

La NADPH oxidasa posee 5 subunidades (dos membranales $gp91^{(phox)}$ y $p22^{(phox)}$ y 3 citoplásmicas y $p67^{(phox)}$, $p47^{(phox)}$ $p40^{(phox)}$ y una pequeña GTPasa Rac), esta enzima se ha identificado posteriormente en diferentes tipos de células como son los fibroblastos, las del músculo liso y las endoteliales, en todos los casos se encuentran asociadas a la membrana plasmática y al igual que la enzima fagocítica utilizan a la coenzima reducida para generar $O_2^{\cdot-}$ (Babior, 2002), (Vignais, 2002), (Sumimoto *et al*., 2005), (Virgen Díaz, 2006).

4.10.1.3. En el proceso de daño durante el alcoholismo.

La vía mediante la cual el etanol induce la patogénesis aun no esta totalmente aclarada a pesar de que se sabe que los macrófagos hepáticos contribuyen al estrés oxidativo. Hay la hipótesis de que la NADPH oxidasa es la mejor fuente de oxidantes generados por el etanol (Kono *et al.*, 2000), (Wheeler *et al*., 2001). Kono y colaboradores en 2000, para ver la participación de la NADPH oxidasa durante la intoxicación crónica con etanol realizaron experimentos con dos grupos de ratones, uno de ellos con la NADPH oxidasa activa y el otro grupo con ratones genéticamente modificados sin la subunidad $p47^{(phox)}$. A ambos

grupos se les administró etanol por varias semanas por vía orogástrica; en el primero de los grupos se observó que desarrollaron daño hepático severo por un mecanismo en el que participan endotoxinas intestinales, receptor de CD14, hubo producción de RL, activación de factores de transcripción NF-kβ y liberación del factor citotóxico TNF-α; mientras que en el segundo grupo, no hubo aumento de RL, ni activación de NF-kβ, ni hígado dañado. De estos resultados se concluye que los RL generados por la NADPH oxidasa en las células de Kupffer, juegan un papel importante en la hepatitis alcohólica por la activación de NF-kβ, las que a su vez activan la producción del factor citotóxico TNF-α.

4.10.1.4. En auto-oxidación.

La auto-oxidación puede considerarse como una fuente *in vivo* de radicales libres del oxígeno ya que una gran variedad de componentes celulares solubles son capaces de llevar a cabo reacciones de oxido-reducción. Entre estas sustancias quedan incluidas los carbohidratos, los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y otras moléculas como son tioles, catecolaminas, flavinas e hidroquinonas; en todos los casos el $O_2^{\cdot -}$ es el primer radical que se forma por la reducción del O_2 realizado por estas moléculas. La velocidad de la auto-oxidación depende de la concentración de O_2 en el medio, de ahí que en condiciones de hiperoxia, puede esperarse que haya un aumento significante en la generación de radicales libres del oxígeno. Estos radicales pueden ser transformados a través de oxidasas, como por ejemplo por la xantina oxidasa, la indolamina dioxigenasa, la galactosa oxidasa, la ciclo-oxigenasa y la lipooxigenasa entre otras.

El estudio que ha atraído más la atención al respecto es la auto-oxidación de los lípidos de la membrana y el conocimiento logrado a partir de ello, sirve para explicar disfunciones membranales que están relacionadas con algunas enfermedades o la participación de xenobióticos. Además, que ha ayudado para entender la importancia fisiológica del α-tocoferol (vitamina E), el antioxidante liposoluble presente en todas las membranas celulares, así como el papel del ácido ascórbico y del ácido úrico como agentes protectores de este proceso en los organismos.

Como ya se mencionó la presencia de las dobles ligaduras intervienen para que

fisiológicamente se inicie el proceso lipoperoxidativo, el que para su estudio clásico se ha dividido en tres etapas: iniciación, propagación y terminación:

La etapa de la iniciación se desencadena cuando el residuo de un ácido graso poliinsaturado participante de los lípidos de membrana, es atacado por una especie reactiva generalmente el $^{\bullet}OH$ que le abstrae un hidrógeno a uno de los carbonos $-CH_2-$ el que queda como radical libre ($L^{\bullet}$) centrado en el carbono. El carbono que ha perdido el hidrógeno es generalmente estabilizado mediante un rearreglo molecular que da lugar a un dieno conjugado el cual reacciona con O_2 y forma el radical peroxilo ($LOO^{\bullet}$), en estas condiciones la molécula que tiene el suficiente poder oxidante para atraer un hidrógeno metilénico del ácido graso adjunto para quedar como lipoperóxido (LOOH) que ya no es radical libre.

La propagación se lleva a cabo cuando la nueva molécula a la que se le ha abstraído un hidrógeno, hace lo mismo a lo que fue sujeta ella, −abstraerle un hidrógeno a la molécula de ácido graso poliinsaturado adyacente− estableciéndose una reacción en cadena y de esta manera se propaga la lipoperoxidación a través de la membrana. La longitud de esta cadena lipoperoxidativa depende de varios factores ya sea la relación de proteínas y lípidos en la membrana, la composición del ácido graso, la concentración de oxígeno y la presencia o no de antioxidantes en la membrana. Por otro lado, durante el proceso también se producen algunos lipoperóxidos intramembranales que para su remoción se requiere de la participación de enzimas específicas, por ejemplo la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa que metaboliza dichos lipoperóxidos a alcoholes, o bien las fosfolipasas que favorecen la disociación de los peróxidos lipídicos de las membranas. Algunas enzimas antioxidantes, entre ellas la glutatión peroxidasa, la glutatión S-transferasa y la alquil-peroxidasa, intervienen en el metabolismo de los diferentes LOOH a sus respectivos alcoholes.

Finalmente la lipoperoxidación puede terminar fisiológicamente cuando el radical lipídico reacciona con otra molécula, la cual puede ser un segundo radical lipídico, para formar un complejo menos reactivo. Alternativamente, cuando el $LOO^{\bullet}$ Está frente a una molécula

antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno, se forma LOOH, terminando así la cadena de reacciones. El α-tocoferol, y la ubiquinona (CoQ_{10}) son los antioxidantes más relevantes para participar en la fase de terminación de la cadena de reacciones de oxidación de los lípidos en los sistemas biológicos. La vitamina E tiene propiedades antioxidantes porque dona un hidrógeno a la molécula de $LOO^{\cdot}$ para quedar como LOOH, mientras que la vitamina queda como radical tocoferilo que es un radical libre estable ya que su electrón desapareado queda deslocalizado en la molécula, de esta manera se interrumpe la peroxidación de lípidos. El radical tocoferilo se puede regenerar a partir de interacciones con moléculas de la membrana o del citosol, tales como la ubiquinona, el ácido ascórbico o tioles como el GSH. Así, los radicales libres generados en el proceso de la lipoperoxidación pueden ser detoxificados directamente por glutatión reducido (GSH) o a través del efecto que tiene éste sobre la vitamina E. Es importante mencionar que el decremento de los niveles intracelulares de GSH puede favorecer la lipoperoxidación inducida por otros factores.

4.10.2. Peróxido de hidrógeno.

La reacción de dos radicales hidroperoxilo ($HO_2^{\cdot}$) producidos por la protonación del $O_2^{\cdot -}$ dan como producto H_2O_2 en una clásica reacción de terminación de radicales libres

$$HO_2^{\cdot} + HO_2^{\cdot} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Por otro lado, el H_2O_2 se forma *in vivo* en la células humanas, principalmente a partir del $O_2^{\cdot -}$ esta reacción puede realizarse por la vía no enzimática, o bien con una reacción de dismutación en donde uno de los dos $O_2^{\cdot -}$ es oxidado y el otro reducido, mediante la participación de la superóxido dismutasa (Carrico y Deutsch, 1970).

$$2\,O_2^{\cdot -} + 2H^{+} \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

El H_2O_2 es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición, se forma en fagocitos, espermatozoides, mitocondrias y microsomas. Por otro lado, hay datos de que el H_2O_2 participa en la señalización celular en adipocitos y hepatocitos (Díaz-Cruz et al., 2007), en estas células su síntesis depende de la actividad de la NADPH oxidasa que sintetiza $O_2^{\cdot -}$ el que da lugar al H_2O_2 que puede modular vías metabólicas del mismo modo que lo hacen los segundos mensajeros Ca^{2+} y AMPcíclico.

4.10.3. Radical hidroxilo.

El radical hidroxilo es la especie química más reactiva que se conoce y por lo tanto la más tóxica, puede formarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X y rayos γ) que pueden realizar la ruptura del agua corporal, por otro lado; ya que la unión O-O es relativamente débil, la luz UV puede romper de una forma homolítica al H_2O_2 y dar lugar a dos radicales hidroxilo ($^{\cdot}OH$)

$$H_2O_2 \longrightarrow 2\,{}^{\cdot}OH$$

Este radical tiene una vida media estimada alrededor de 10^{-9} s, es altamente reactivo y generalmente actúa cerca de su sitio de formación. Dependiendo del sitio donde se forme será el tipo del daño que produzca, por ejemplo si se forma cerca del DNA puede ocasionar modificaciones en purinas o pirimidinas, puede también romper las hebras del DNA, mientras que cuando se produce cerca de alguna molécula de enzima que se encuentra presente en exceso en la célula, como por ejemplo la deshidrogenasa láctica, puede no tener consecuencias biológicas. La reacción que más frecuentemente se relaciona con el radical $^{\cdot}OH$ es la peroxidación de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de la membrana, ya que a causa de su acción, hay pérdida de la flexibilidad, de las funciones secretoras y ruptura de los gradientes iónicos transmembranales principalmente.

En 1894 Fenton describió la reacción en la que se podían oxidar moléculas orgánicas por la mezcla de peróxido de hidrógeno y sales de fierro reducido (Fe^{2+}) y obtener radical hidroxilo, de ión hidroxilo al mismo tiempo que el fierro se oxida (Fe^{3+}).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + HO^- + {}^{\cdot}OH$$

Posteriormente, en 1934 Haber y Weiss incorporando este conocimiento a los sistemas biológicos, dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el $O_2^{\cdot -}$ es un agente reductor del Fe^{3+} de las proteínas y da como producto al Fe^{2+}, éste que se encuentra reducido interactúa con el H_2O_2 lo que da lugar a la re-oxidación del compuesto proteico con Fe^{3+} y a la formación del ión y del radical hidroxilo

$$\text{proteína-}Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow \text{proteína-}Fe^{2+} + O_2$$

$$\text{proteína-}Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow \text{proteína-}Fe^{3+} + HO^- + {}^{\cdot}OH$$

El $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 son capaces de producir al radical $^{\cdot}OH$ en presencia de los metales de transición que se encuentran en los sistemas biológicos. Esta reacción se puede realizar con varios metales pero el fierro parece ser el más importante en los sistemas biológicos, a partir de la característica de que el Fe^{3+} es muy insoluble; en función de esto, el fierro libre de los sistemas biológicos se encuentra en pequeña proporción. Los procesos de captación y distribución de los iones metálicos están muy regulados en los mamíferos ya que hay varias proteínas como la ferritina que tiene la capacidad de almacenar hasta 4,500 iones de fierro por molécula.

Aunque como ya se dijo antes, el radical $^{\cdot}OH$ es el más agresivo de todos los radicales libres debido a su alta capacidad oxidante, su formación se encuentra limitada por la participación de dos enzimas la superóxido dismutasa (SOD), -descubierta en 1968 por McCord y Fridovich (1969), que actúa sobre el $O_2^{\cdot -}$ haciendo posible la formación de H_2O_2 y por la catalasa que al participar ante el H_2O_2 forma agua y oxígeno molecular.

4.11. ESTRÉS OXIDATIVO

En células y tejidos dañados hay una sobreproducción intracelular de radicales libres, que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes y que pueden alcanzar niveles tóxicos, reaccionando con lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA como una consecuencia del desbalance en la relación prooxidante-antioxidante. Sies denominó como estrés oxidativo (Sies y Cadenas, 1985; Sies, 1986) al fenómeno en el que hay un desequilibrio en este balance, desplazándose éste a favor de las fuerzas oxidantes. Este estrés o daño oxidativo puede generarse además, por algunas agentes físicos o químicos, isquemia, inflamación, desordenes sanguíneos o bien por disminución de las defensas antioxidantes. Algunos de estas alteraciones o enfermedades pueden iniciarse o exacerbarse debido a condiciones prooxidantes ambientales, drogas o alimentos. En el caso del envejecimiento en el que el deterioro progresivo, se puede deber a la acumulación de radicales libres ocasionada por su generación incesante producido durante el curso del metabolismo normal; o bien por la atenuación de las defensas antioxidantes. En experimentos realizados por Dai Kim y colaboradores (1996), encontraron que en ratas jóvenes la restricción alimenticia y el ejercicio modulan las defensas antioxidantes celulares y protegen contra el daño de los radicales libres en el hígado y músculo esquelético, sugiriendo que los efectos benéficos de estos dos agentes pueden ser mediadores entre el estrés oxidativo y los sistemas de defensa que lo contrarrestan.

Kera y colaboradores propusieron en 1988 que la acción citotóxica del etanol se lleva a cabo por la vía de los radicales libres del oxígeno. En el trabajo demuestran que la lipoperoxidación en hígado, inducida por una dosis de etanol, puede bloquearse por disulfiram o cianamida, ambos inhibidores de la deshidrogenasa aldehídica que es la enzima responsable de metabolizar al acetaldehído, este bloqueo ocurre a pesar de que hay niveles altos de acetaldehído en la circulación. La conclusión es que la peroxidación de los lípidos, asociada a un alto consumo de alcohol, en la que hay alteración en la velocidad de oxidación del acetaldehído, principalmente por la deshidrogenasa aldehídica de baja Km, se debe, más que al acetaldehído mismo, a la acción de los radicales libres del oxígeno que se forman durante el proceso.

4.12. LIPOPEROXIDACIÓN

Tappel definió como lipoperoxidación al proceso en el que hay un deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de las membranas (Tappel, 1979). Las membranas biológicas son estructuras laminares, flexibles y finas que rodean a las células y a los organelos, desempeñan múltiples funciones, como es el delimitar espacios y con ello regular la concentración interna y externa de metabolitos, el permitir el transporte controlado de sustancias a través de sus poros y canales, la captación y liberación de señales, la catálisis enzimática, la transducción de energía, el procesamiento de la información, la interacción con otras células y el anclaje del citoesqueleto principalmente. Tienen una estructura uniforme y sus principales constituyentes son las proteínas y los lípidos, los carbohidratos que participan se encuentran en menor proporción y están unidos generalmente a unas u otros formando las glucoproteínas o los glucolípidos.

Las distintas membranas tienen proporciones y tipos diferentes de proteínas y lípidos que es lo que marca su especialización, pero poseen ciertas propiedades que les son fundamentales, en donde la principal es el estar constituidas por una bicapa formada por fosfolípidos con ácidos grasos insaturados y poliinsaturados que le otorgan gran fluidez. Algunas de las proteínas presentes penden de la superficie, otras están embebidas en el interior y otras atraviesan la membrana de lado a lado; a mayor cantidad de proteínas presentes en las membrana, será mayor el número de funciones que desarrollen.

En las membranas de las células animales los lípidos dominantes son los fosfolípidos aunque algunas membranas particularmente como la plasmática y la mitocondrial contienen cantidades significativas de esfingolípidos y de colesterol. Los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos participantes de las membranas de las células animales, generalmente son de 14 a 24 átomos de carbono, son poliinsaturados y sus dobles ligaduras tienen una posición *cis*.

En cada lado de la bicapa lipídica, las proteínas y los lípidos pueden difundir con gran rapidez sin embargo el intercambio de las moléculas lipídicas entre las dos mitades de la bicapa es muy poco probable. Aunque por diferente mecanismo, tanto lípidos (Bus et al.,

1974; Dodge et al., 1967; Menzel, 1970; Goldstein et al., 1970; Thomas et al., 1968; Plaa y Witschi, 1976; Recknagal, 1967; Slater y Sawyer, 1971), como proteínas pueden reaccionar en presencia del oxígeno y ser sujetos al fenómeno de la peroxidación, ocasionando el daño más significativo que la célula recibe por el mecanismo de la producción de radicales libres. El daño oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana tiende a ocasionar trastornos funcionales y de transporte ya que ocasiona que se disminuya la fluidez (Slater et al., 1987; May y McCay, 1968; Dormandy, 1978).

Los ácidos grasos poliinsaturados (linoléico, linolénico y araquidónico) presentes en los fosfolípidos de la membrana celular son degradados por la lipoperoxidación mediada por los radicales libres con la consecuente afectación de su integridad, sugiriendo que esto es la causa del daño donde hay pérdida de la función y destrucción de la membrana celular.(Fridovich, 1978; Sevanian y Hochstein, 1985). Se tiene bien documentado que el metabolismo del etanol juega un papel importante en la patogénesis de algunos disturbios hepáticos (Di Luzio y Stege 1977; Dianzani, 1985; Cederbaum, 1989). Comporti en, 1978 propone que la lipoperoxidación inducida por etanol se restringe a nivel hepático, pero hay estudios *in vitro* que conducen a aclarar que tejidos extrahepáticos como los del sistema nervoso central, del testículo y del corazón son propensos a la lipoperoxidación.

La lipoperoxidación en las células animales aumenta con la edad, con los estados de enfermedad y con la presencia de toxinas; para Halliwell y Gutteridge (1989) la mejor explicación del estrés oxidativo es conforme a la siguiente secuencia:

ENFERMEDAD O TOXINA

↓

DAÑO CELULAR

↓

AUMENTO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN

Con este enfoque las enfermedades no son producidas por la presencia de radicales libres como algunos proponen, sino que éstas son los agentes causales. En los últimos

años se ha implicado a las especies reactivas del oxígeno con una variedad de síntomas, enfermedades y procesos degenerativos.

Ahora bien, cuando la producción de radicales libres rebasa las condiciones fisiológicas, generalmente se debe a la presencia de agentes externos como es el caso de la ingesta de etanol; la lipoperoxidación descrita arriba con sus tres etapas -iniciación propagación y terminación- se ve afectada en la última parte del proceso ya que la terminación no se puede llevar a cabo en su totalidad y la presencia de los radicales producidos ocasionan daños a la membrana al mismo tiempo que produce metabolitos tóxicos. Las consecuencias del daño pueden ser agregación, entrecruzamiento, degradación de proteínas y fragmentación dependiendo de la naturaleza de las ellas o de las especies reactivas atacantes, alteración en la actividad enzimática o alteración en la función membranal que pueden afectar la homeostasis y las señales de transducción membranal. Hay datos que indican que hay una relación inversa entre lipoperoxidación y velocidad de proliferación celular; además de que producen edema celular, cambios en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. (Niemelä *et al*., 2002; Martínez Sánchez, 2005)

La peroxidación de los ácidos grasos de los lípidos de las membranas puede ocurrir tanto por la vía no-enzimática como por la enzimática; durante la peroxidación no-enzimática las especies reactivas de oxígeno inician el daño oxidativo en los lípidos de la membrana y los radicales libres de las especies resultantes, propagan el proceso de la peroxidación, lo que permite la acumulación de hidroperóxidos. Éstos finalmente se descomponen en una gran variedad de productos terminales donde los principales son malondialdehído (MDA), hexanal, y 4-hidroxinonenal (4-HNE); en la lipoperoxidación enzimática, los ácidos grasos oxidados son liberados de los lípidos de las membranas por fosfolipasas y otras lipasas.

El proceso lipoperoxidativo enzimático se inicia cuando el ácido araquidónico (20:4 Δ 5, 8, 11, 14) se libera de los fosfolípidos de la membrana por la acción de la fosfolipasa A_2 en respuesta a una variedad de estímulos, entre otros la participación de agentes pro-inflamatorios como es la ingesta de etanol. El metabolismo del acido araquidónico, representa una fuente de especies reactivas de oxígeno que pueden inducir el estrés

oxidativo; este ácido se metaboliza principalmente por tres rutas: por la vía de la lipooxigenasa que hace posible la formación de derivados hidroxilados y leucotrienos, por la vía de la ciclooxigenasa que permite la formación de prostaglandinas y por la vía catalizada por el citocromo P450 que conduce a la producción de epóxidos derivados del ácido eicosatrienoico (Needleman *et al*., 1986; Basu-Modak *et al*., 1996).

La etapa de la iniciación de la lipoperoxidación presentada en el tema de autooxidación que permite, después de una serie de reacciones, la formación del lipoperoxilo, el cual puede sustraer un hidrógeno del ácido graso vecino y continuar con la etapa de propagación o bien se pueden formar los endoperóxidos cíclicos por la acción de la ciclooxigenasa y con esto se abre la posibilidad ya sea de dar lugar a la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que algunos de ellos son mediadores de la inflamación, o bien continuar hacia la vía de la degradación donde se sintetiza MDA y otros productos terminales como son aldehídos, algunos hidrocarburos como el pentano, etano y otros residuos orgánicos (Zentella de Piña *et al*., 1994a).

Como se ha mencionado antes, el MDA es sólo una de las moléculas que se generan al final de la lipoperoxidación al igual que diversas moléculas, pero son los aldehídos los que van a formar aductos con proteínas que alteran las funciones de éstas dentro del metabolismo general. El MDA al formar aductos con acetaldehído y proteínas induce el aumento en la secreción de citocinas que promueven la inflamación, aumenta la producción de moléculas que son parte de la matriz extracelular que desencadenan la fibrosis en la región perivenular, además de que aumenta la secreción de proteínas que permiten la activación del factor de crecimiento que desencadena la cicatrización.

Para su identificación en el laboratorio el MDA reacciona a bajo pH y a temperatura elevada, participa en reacciones nucleofílicas con el ácido tiobarbitúrico (TBA) generando un color rosado de un aducto de MDA con TBA (MDA-TBA_2), lo que permite que esta reacción se utilice como un índice de lipoperoxidación; el MDA puede reaccionar con otras moléculas distintas al TBA, del mismo modo que el TBA reacciona con otros aldehídos, actualmente se designa a la prueba como sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBARS), es una prueba no específica, pero confiable (Janero, 1990).

La reacción del MDA fue descrita por Kohn y Liversedge, en 1944, y posteriormente por Patton y Kuntz en 1951. El método empleado es el descrito por Yagi (1976), (Kosugi *et al*., 1993) tiene un coeficiente de extinción de 1.59 $x10^5$ $mM^{-1}cm^{-1}$ (Wills, 1969) se utiliza ácido acético y un buffer de fosfatos a pH 7.0 (Zentella de Piña *et al.*, 1992), la extracción del compuesto rosado se realiza en presencia de butanol-piridina. Para correr un estándar se realiza con tetraetoxipropano en solución acuosa a concentraciones de 1.25 a 5.0 mM, (Gutteridge *et al*., 1974; Buege y Aust, 1978; Draper *et al*., 1986; 1993; Conti *et al*., 1991; Lefèvre *et al*., 1998).

Además algunas de las moléculas volátiles que se producen en la lipoperoxidación tienen un con alto potencial toxigénico y se ha propuesto que algunas de estas moléculas pequeñas pueden actuar en sistemas biológicos como segundos mensajeros. Los lipoperóxidos pueden inhibir la actividad de algunas enzimas y los radicales $LOO^{\cdot}$ tienen la capacidad de inhibir la transcripción del ADN. El gradiente de iones calcio (Ca^{2+}) se altera cuando la enzima calcio-ATPasa pierde su actividad catalítica debido a la oxidación de los grupos tioles presentes en la molécula. Es posible que ello, aunado a la entrada excesiva de Ca^{2+}, resultante de la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, sean los eventos que lleven a la muerte celular observada en casos extremos de daño por la lipoperoxidación.

4.13. METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Antes se mencionó que el ácido araquidónico (AA), ácido graso poliinsaturado (20:4, Δ 5, 8, 11, 14) forma parte de los fosfolípidos de la membrana y se libera por la acción de la fosfolipasa A, una vez desprendido y dependiendo de los tipos de células en las de las que se trate y de las condiciones intracelulares, va a ser responsable, mediante la llamada cascada del ácido araquidónico, de la formación de los eicosanoides, un grupo de moléculas biológicamente activas con diversas funciones. Los principales eicosanoides y que interesan en este estudio son las prostaglandinas (PG) y los tromboxanos (TX) que se sintetizan por la vía de la ciclooxigenasa y los leucotrienos (LT) que se sintetizan por la vía de la lipooxigenasa, su estudio es importante ya que todos los representantes de estas líneas tienen acciones muy específicas dentro del metabolismo celular.

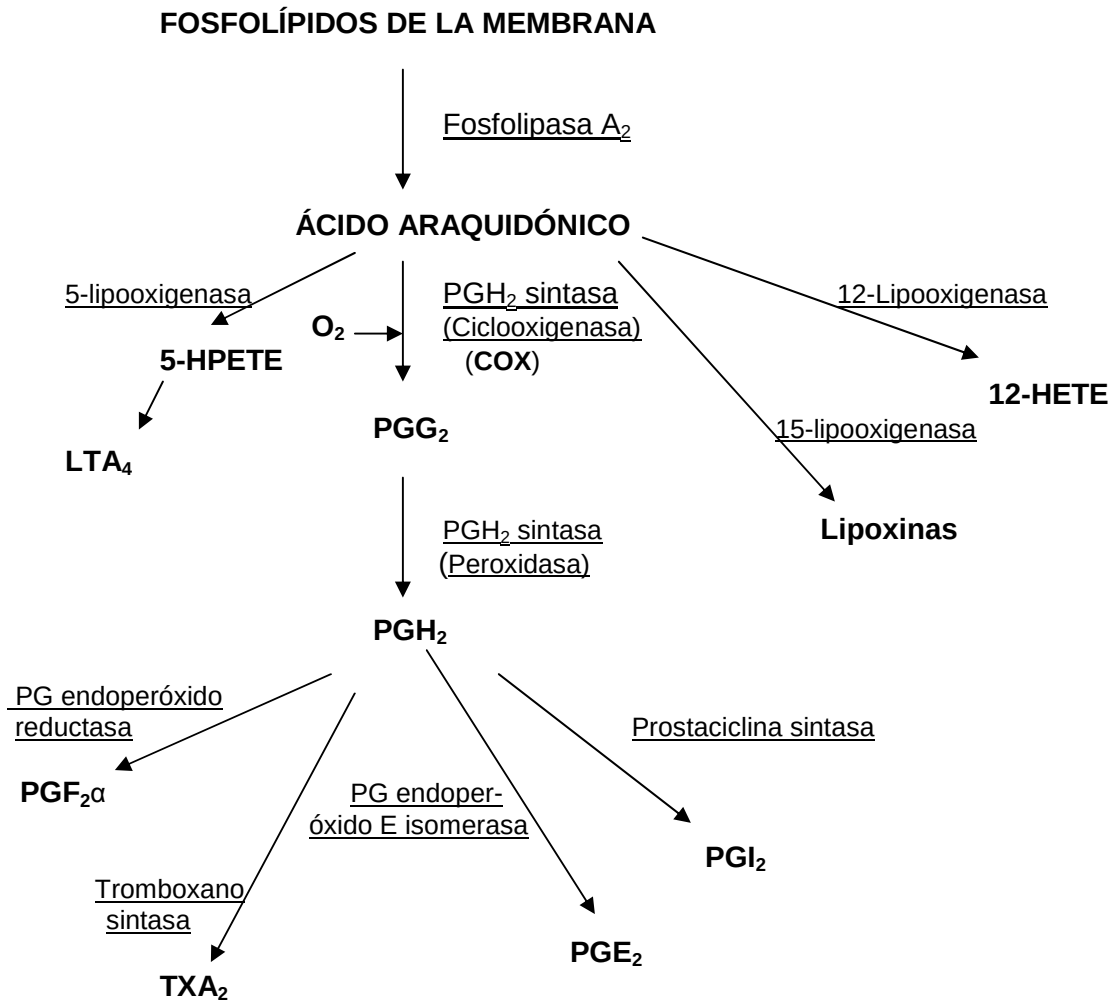


Fig. 7. Síntesis de eicosanoides a partir de ácido araquidónico.

El AA en presencia de la prostaglandina sintasa (EC 1.14.99.1) llamada también ciclooxigenasa (COX), una proteína presente en la membrana de los microsomas y del retículo endoplasmático, inicia el proceso de oxidación (Yamamoto, 1991). Esta enzima cataliza dos reacciones, una como ciclooxigenasa verdadera y otra como peroxidasa; en un primer paso el sustrato recibe una molécula de oxígeno y forma la prostaglandina G_2 (PGG_2) y posteriormente con la función de peroxidasa reduce el grupo hidroperóxido y da lugar a la PGH_2. Ambas prostaglandinas tiene una vida media muy corta y se catabolizan para dar lugar a otros miembros de su mismo grupo y a los tromboxanos (TX). Las

prostaglandinas y los tromboxanos sintetizados tienen múltiples funciones, muchas de ellas antagónicas, así algunas participan en la vasodilatación y otras en la vasoconstricción; en la broncodilatación y en la broncoconstricción; en la estimulación y en la inhibición de la agregación plaquetaria; en la activación (algunos derivados del ácido araquidónico) y en la inhibición de la inflamación (algunos derivados ω-6 del ácido linoleico). Además, intervienen en la percepción del dolor, controlar el descenso de la presión arterial al favorecer la eliminación de sustancias por el riñón y producir aumento de temperatura corporal. A partir de PGH_2 y por la acción de prostaciclina sintetasa se forma PGI_2 que tiene un fuerte poder antiagregante y vasodilatador, mientras que el mismo sustrato por la acción de la tromboxano sintetasa pasa a TXA_2 que es un poderoso agregante plaquetario y vasoconstrictor (Samuelsson, 1972).

Por estudios realizados por Needleman y sus colaboradores hacia 1990 (Raz y Needleman, 1990; Needleman e Isakson, 1997) encontraron que la ciclooxigenasa tiene dos isoformas la COX-1 y la COX-2, ambas reaccionan con el mismo sustrato, el ácido araquidónico, pero se codifican por diferentes genes, poseen diferente estructura y regulación genética.

La COX-1 es una enzima constitutiva, se encuentra presente en casi todos los tejidos, en mayor proporción en estómago, riñón, en células endoteliales y en plaquetas. Es citoprotectora y participa en la agregación plaquetaria, tiene como función la regulación de la proliferación de las células, participa en la producción de prostaglandinas que intervienen en procesos fisiológicos tales como: protección del epitelio gástrico, mantenimiento del flujo renal, la agregación plaquetaria, la migración de neutrófilos y también se expresan en el endotelio vascular. Se encuentra asociada al retículo endoplásmico de las células y no es estimulada por la inflamación.

La COX-2 es inducible en procesos inflamatorios y se ha planteado que su inducción es responsable de la síntesis de prostaglandinas, que como se sabe son mediadoras de procesos patológicos y por ende está relacionada con dolor, inflamación, fiebre y aumento de la permeabilidad vascular (Vane, 2000; Mitchell *et al*., 1994; Meade *et al*., 1993). La COX-2 tiene como función mediar los procesos de inflamación y la señalización por prostanoides, se expresa tras la inducción provocada por diversos mediadores

inflamatorios (interferón γ, factor de necrosis tumoral α, interleucina-1, factores de crecimiento, etc.) en diversas células y tejidos.

Ambas proteínas presentan gran homología, pero con diferencias en su sitio activo. (Raz y Needleman, 1990; Needleman e Isakson, 1997). Para algunos autores podría existir una tercera isoforma: la COX-3, radicada en el cerebro, mientras que para otros no sería más que la COX-2 pero con funciones más propias de la COX-1. Esta enzima está codificada por el mismo gen que la COX-1 y al parecer los efectos analgésicos y antipiréticos de acetaminofén, dipirona y otras drogas se realizan a través de esta isoenzima. (Chandrasekharan et al., 2002).

4.14. INFLAMACIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa natural de la célula en el que los anticuerpos, el complemento y las células fagocíticas penetran al tejido para proteger de la presencia de sustancias extrañas. En la inflamación aguda los vasos sanguíneos se dilatan lo que ocasiona el rubor y el calor característicos, el edema se produce por aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de leucocitos que contribuyen a la tumefacción y el dolor se desencadena por la acción de algunos mediadores sobre las terminaciones nerviosas.

Los agentes que estimulan al desarrollo de la inflamación son los llamados mediadores de la inflamación: histamina, bradiquinina, factor activador de plaquetas, PG, TX y LT. Estos tres eicosanoides se consideran como hormonas locales debido a que no hay depósito para ellos sino que se sintetizan y liberan en función de los requerimientos y se ha identificado la presencia de PG en aquellos procesos que ocasionan ruptura de la membrana. En el principio de la inflamación hay leucocitos formadores de LTB_4 en el exudado celular y la presencia de prostaglandinas aumenta la permeabilidad vascular. De esta forma las PG y los LT participan directamente en el proceso de la inflamación.

La inflamación es un proceso limitado, sin embargo cualquier causa anormal que activa a los fagocitos tiene la potencialidad de provocar una respuesta que puede ser devastadora. La respuesta inflamatoria es característica en muchas enfermedades tal es el caso de la

artritis reumatoide y lupus eritematoso entre otras, en casos de inflamación crónica el tejido afectado es directamente expuesto a altos niveles de $O_2^{\cdot -}$ y sus metabolitos. Es muy importante mencionar que esta misma respuesta, en ocasiones, es beneficiosa para el organismo cuando se encuentra ante reacciones indeseables y potencialmente peligrosas debido a agentes que le afectan como es el caso de las bacterias.

En 1982 Halliwell propone que los oxidantes pueden atacar normalmente a las biomoléculas para crear nuevos antígenos y que esto puede contribuir a desarrollar autoinmunidad, en esas condiciones hay una disminución de la respuesta antioxidante observada con una baja de la glutatión peroxidasa.

Los corticosteroides inhiben a la fosfolipasa A_2 y por lo tanto disminuyen la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos e indirectamente causan una liberación de una proteína inhibidora de la fosfolipasa llamada lipocortina y disminuyen los niveles del factor activador de plaquetas, además los esteroides tienen un efecto terapéutico en la artritis reumatoide. Ya se había mencionado antes que los AINEs son inhibidores de las COX, su administración debilita la adhesión plaquetaria mediante la disminución del tromboxano A_2 plaquetario, generándose así una tendencia al sangrado.

4.15. INFLAMACIÓN HEPÁTICA OCASIONADA POR EL ETANOL.

Las células de Kupffer son los macrófagos cuya principal función es la de ingerir y destruir cualquier molécula extraña y las células estelares tienen dos funciones, cuando están en reposo sirven como almacén de grasa y cuando están activadas producen proteínas como la colágena, cuando están sobreactivadas dan lugar al tejido cicatrizado ocasionado la fibrosis.

La ingesta elevada de etanol altera la flora bacteriana intestinal, el desarrollo de las bacterias gram-negativas se encuentra elevado; por otro lado el aumento de etanol en la dieta ya sea en forma aguda o crónica incrementa la permeabilidad de las células epiteliales del tubo digestivo. La pared celular bacteriana posee un lipopolisacárido (LPS) con actividad antigénica y cuando las bacterias que viven en el intestino liberan

endotoxinas al morir, ambos LPS y endotoxinas pasan a la sangre portal, alcanzan el hígado, activan al receptor CD14 de las células de Kupffer, lo que ocasiona la producción y liberación de varias citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF-α) y ERO. El TNF-α está directamente relacionada con la respuesta inmune, estimula la toxicidad por la inducción y activación de señales químicas que conducen a la apoptosis (Thurman, 1998; Wheeler y Thurman, 2003). El incremento en la secreción de citocinas, media la comunicación entre células y promueven la inflamación en la que como antes se mencionó, hay gran concentración de leucocitos y células fagocíticas, por todo lo anterior está claro que el etanol ocasiona inflamación hepática.

4.16. ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Desde antes de la Era Cristiana se han empleado sustancias con fines anti-inflamatorios, en el papiro de Ebers se habla de la acción analgésica de las hojas de mirto, Hipócrates recomendaba la corteza de sauce y de álamo para la fiebre. En 1763 Edward Stone descubrió la acción antipirética del ácido salicílico (ASA), en 1827 Leroux aisló el ácido salicílico y posteriormente Kolbe trabajó en su síntesis. Finalmente después de una gran cantidad de estudios y hallazgos relacionados con los ácidos salicílico y acetilsalicílco, en 1898 el ASA es sintetizado. En 1971, John R Vane descubrió el mecanismo por el cual la aspirina exhibe una acción anti-inflamatoria, analgésica y antipirética, posteriormente él prueba que la aspirina y otros AINEs inhiben la actividad de la COX la cual permite la formación de PGs que causan inflamación (Vane, 1971) y en 1982 junto con Bergström y Samuelsson ganó el Premio Nobel, por sus investigaciones sobre la fisiología y la bioquímica de las prostaglandinas y las sustancias relacionadas. (Vane y Botting, 2003).

Las moléculas derivadas del ácido araquidónico se consideran como hormonas eicosanoides, ya que tienen la capacidad de modificar algunas actividades de las células donde se encuentran y en su contorno más inmediato y como ya se mencionó participan en la inflamación. Por otro lado los AINEs impiden la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos debido a que inhiben la actividad tanto de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) como a la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Hay estudios que apoyan que la inhibición de la COX-2, es lo que permite la acción anti-inflamatoria, analgésica y antipirética de los AINEs. Sin

embargo, se ha encontrado que algunas moléculas de los que inhiben simultáneamente a la COX-1 y a la COX-2 tienen la capacidad de causar hemorragias digestivas y úlceras, como es el caso de la aspirina.

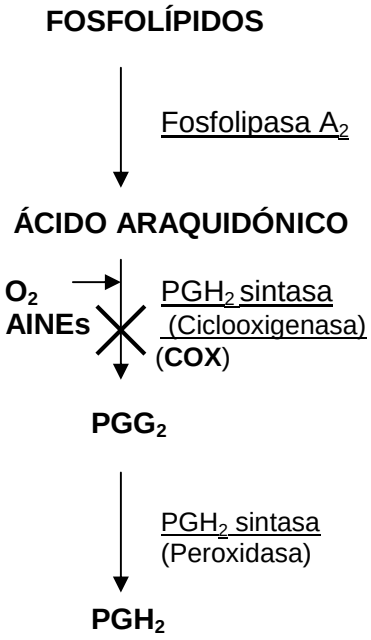


Fig. 8. Los AINEs bloquean la acción de la prostaglandina sintasa y con ello la síntesis de eicosanoides.

La mayoría de los AINEs son usados para mitigar el dolor, exhibiendo con ello su capacidad inhibitoria de COX. Por ejemplo, el nimesulide inhibe COX-2, y debido a ello limita la síntesis de PGE_2, mientras que el ASA al inhibir preferentemente a la COX-1, afecta a la síntesis de TX_2. (Famaey, 1997).

Es importante mencionar que algunos AINEs en presencia de hepatocitos aislados, mitocondrias o microsomas han demostrado tener efecto hepatotóxico, aunque estos datos requieren más trabajo para entender su patología (O'Connor *et al*., 2003; Yokoyama *et al*., 1995; Ji *et al*., 2001; Ong *et al*., 2006).

La capacidad de los AINEs para disminuir la inflamación depende del tipo de agente causal de la inflamación, sumado a las características particulares de las estructuras que actúan como inhibidores de las dos formas de COX. (Rainsford, 2007). En la Tabla 1 se enlistan los principales AINEs que según su estructura química se han clasificado en 8 ó 9 grupos; se subrayan y se ponen las fórmulas de los que se han elegido para el estudio que ocupa esta tesis, (TABLA 1) que como se ha dicho antes, intervienen en la disminución de la lipoperoxidación, situación inherente a la inflamación ocasionada por la hepatitis alcohólica.

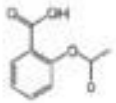
En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el daño hepático inducido por la ingesta aguda de etanol en ratas y se ha encontrado que algunos AINEs, inhiben la inflamación y participan en la regulación del estrés oxidativo tanto en hígado entero como en hepatocitos aislados.

Los AINEs estudiados son ácido acetilsalicílico, dipirona, naproxen, nimesulide y piroxicam, y los resultados obtenidos indican -como se verá más adelante- que *in vivo,* disminuyen la síntesis de TAG y ayudan a bloquear la lipoperoxidación que se alcanza durante la ingesta aguda de etanol. (Zentella de Piña *et al*., 1992), (Zentella de Piña *et al*., 1993), (Gutiérrez-Salinas *et al*., 1993), (Zentella de Piña *et al*., 1994), (Pérez-Tapia *et al*., 1996), (Zentella de Piña *et al*., 1997), mientras que en hepatocitos aislados incubados con etanol y piroxicam, hay una aumento en la poza de TAG y una disminución de la lipoperoxidación (Saldaña-Balmori *et al.*, 1996), (Riveros-Rosas *et al*., 1999), Los resultados obtenidos nos permite proponer que estos AINEs intervienen, en algunas condiciones, para atenuar el estrés oxidativo inducido por el etanol.

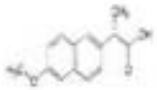
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

SALICILATOS	DERIVADOS DEL ÁCIDO ACÉTICO	DERIVADOS DEL ARIL-PROPIÓNICO	DERIVADOS DEL ÁCIDO FENÁMICO	ÁCIDOS ENÓLICOS	ÁCIDOS ENÓLICOS	VARIOS	AMINO-FENOLES	COXIB
ÁCIDO ACETIL SALICILICO Ácido salicílico Benorilato Clonixinato de lisina Diflunisal Etersalato Salicilamida Salicilato de calcio Salicilato de magnesio Salicilato de sodio	Acemetacina Diclofenac Difenpiramida Glucametacina Indometacina Ketorolac Oxametacina Proglume-tacina Sulindac Tolmetin	Alminoprofén Benoxaprofén Butibufén Dexibuprofén Dexketoprofén Fenbufén Fenoprofén Flunoxaprofén Flurbiprofén Ibuprofén Ibuproxam Ketoprofén **NAPROXEN** Oxaprozina Pirprofeno Tiaprofeno	Ácido flufená-mico Ácido mefená-mico Ácido niflúmico Ácido tolfená-mico Flufenamil Meclofenamato	PIRAZOLONAS Aminofenazona Clofezona **DIPIRONA** Fenilbutazona Feprazona Kebuzona Mofebutazona Nifenazona Oxifenilbuta-zona Suxibuzona	OXICAMES Droxicam Meloxicam Oxaprocina **PIROXICAM** Tenoxicam	Azapropazona Diacereína Glucosalina Morniflumato Nabumetona **NIMESULIDE**	Fenacetina Acetaminofen	Celecoxib Etoricoxib Rofecoxib Valdecoxib

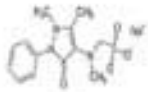
FÓRMULAS DE LOS 5 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS QUE SE ELIGIERON PARA DESARROLLAR EL TRABAJO DE LA PRESENTE TESIS.



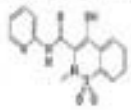
ÁCIDO ACETILSALICILICO



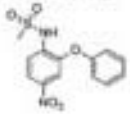
NAPROXEN



DIPIRONA

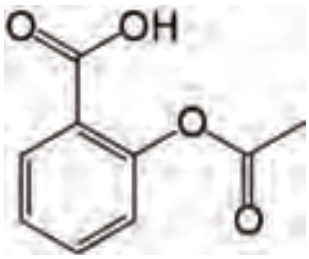


PIROXICAM



NIMESULIDE

4.16.1. Ácido acetilsalicílico.



Ácido 2-acetoxi-benzoico

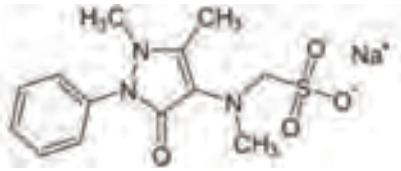
El ácido acetilsalicílico (aspirina) es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) de la familia de los salicilatos, con un uso ampliamente distribuido en todo el planeta ya que tiene acciones anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Después de su ingestión se absorbe en el estómago, emigra por vía plasmática y al término de 30 minutos se ha hidrolizado aproximadamente el 75%; tiene gran capacidad para unirse a las proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina.

Es un inhibidor no selectivo de las dos isoformas de la ciclooxigenasa; el centro activo de la COX se encuentra al fondo de un canal hidrofóbico y el ácido acetilsalicílico acetila a la serina 530 y deja en el canal al ácido salicílico impidiendo la acción fisiológica sobre el ácido araquidónico, así modifica la actividad enzimática de la COX-2 e inhibe la agregación plaquetaria. Por lo general, la COX-2 produce los prostanoides, la mayoría de los cuales son pro-inflamatorios, las modificaciones que sobre esta enzima hace la aspirina, la conducen a producir en su lugar a las lipoxinas las cuales tienden a ser anti-inflamatorias, al mismo tiempo que se detiene la producción de prostaglandinas y tromboxanos.

La aspirina también interfiere con los mediadores químicos del sistema kalicreína-cinina, por lo que inhibe la adherencia de los granulocitos sobre la vasculatura que ha sido dañada, estabiliza los lisosomas previniendo así la liberación de mediadores de la inflamación e inhibe la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Reduce la fiebre, estos efectos antipiréticos probablemente son mediados tanto por la inhibición de la COX en el sistema nervioso central y por la inhibición de la interleucina-1,

el cual es liberado por los macrófagos durante los episodios de inflamación. Se ha demostrado que la aspirina interrumpe la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de los cartílagos y del hígado al difundir al espacio que está entre las dos membranas de la mitocondria y actúa como transportador de los protones requeridos en los procesos de la respiración celular. Con la administración de dosis elevadas de aspirina se observa la aparición de fiebre debido a una gran cantidad de calor liberado por la cadena de transporte de electrones, lo que es contrario a la acción antipirética de la aspirina a dosis terapéuticas. Además, la aspirina induce la formación de radicales de óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) en el cuerpo, lo cual reduce la adhesión de los leucocitos, uno de los pasos importantes en la respuesta inmune a infecciones, aunque aún no hay evidencias de que la aspirina sea capaz de combatir una infección. Datos publicados recientemente, sugieren que el ácido salicílico, y otros derivados de la aspirina modulan sus acciones de señalización celular por medio del NF-κB, un complejo de factores de transcripción que juegan un papel importante en muchos procesos biológicos, incluyendo la inflamación. Con dosis bajas, la aspirina prolonga el tiempo de sangrado, la propiedad que tiene la aspirina como anticoagulante, hace que su uso sea útil en la reducción de la incidencia de infartos al miocardio.

4.16.2. Dipirona.



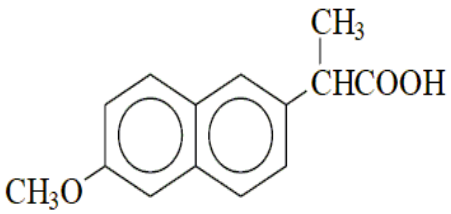
[(2,3-dihidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1*H*-pirazol-4-il) metilamina] metanosulfonato de sodio

La dipirona, llamado también metamizol es un fármaco del grupo de las pirazolonas, tiene un potente poder analgésico, antipirético, espasmolítico y no tiene efecto anti-inflamatorio (Pierre *et al*., 2007). Algunos autores sugieren que el efecto que tiene a nivel periférico, es la activación de canales de potasio, con lo cual produce hiperpolarización de las terminales periféricas aferentes, disminuyendo así el potencial de acción y no la disminución de la síntesis de PG; esto es, tiene un mecanismo diferente al resto de los AINEs. La dipirona es un medicamento que genera controversia, en muchos países

constituye el analgésico no narcótico muy empleado, mientras que en otros ha sido prohibido su uso ya que en los años 70, se descubrió que con su ingesta existía el riesgo de agranulocitosis y anemia plástica, razón por la cual en diversos países del primer mundo lo han prohibido o bien han restringido su uso exclusivamente bajo prescripción médica (Figueroa *et al*., 2006).

Es un analgésico común, un débil inhibidor no específico a dosis dependiente de las dos isoformas de COX (Hinz *et al*., 2007), pero más potente en la recientemente reportada COX-3 (Rezende *et al*., 2008; Nossaman *et al*., 2007). Al ser un inhibidor de las ciclooxigenasas, disminuye la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, los cuales sensibilizan los receptores mecánicos y químicos al dolor; es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica y la barrera hemato-placentaria. Luego de su ingesta es rápidamente hidrolizado en el jugo gástrico a 4-metil-aminoantipirina (4-MAA),esta molécula da lugar a 4-formil-aminoantipirina (4-FAA) y a 4-aminoantipirina (4-AA), la que es acetilada a 4-acetil-aminoantipirina (4-AAA) por la N-acetil-transferasa; estos metabolitos han sido usados para caracterizar su unión a COX (Pierre *et al*., 2007). Como ya se mencionó, el ácido acetilsalicílico es un inhibidor de la COX-1 y un metabolito de la degradación de la dipirona el 4-metil-aminoantipirina (MAA), atenúa el efecto de la ASA sobre la COX-1 ya que forma un puente de hidrógeno con la serina de la COX-1 e impide la participación de ASA. (Hohlfeld *et al*., 2008).

4.16.3. Naproxen.

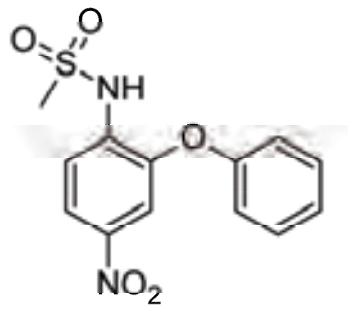


Ácido (αS)-6-metoxi-α-metil-2-naftalenacético

El naproxen es un fármaco analgésico-anti-inflamatorio derivado del ácido propiónico y clasificado como AINE inhibidor no selectivo de la COX-1. Es una sustancia liposoluble, se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, este proceso es facilitado por la

presencia de alimentos en el estómago; aunque se requeren dosis más elevadas que otros AINEs (200-400 mg/día). El naproxen se une muy bien a la albúmina y por lo tanto tiene una vida media más larga en sangre que otros analgésicos, llegando hasta 12 horas, la máxima concentración se tiene entre 2 y 4 horas después de su ingesta y su metabolismo se realiza en el hígado. Actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, pero su mecanismo exacto de actuación es desconocido, es un inhibidor no selectivo de la COX-1 (Capone *et al*., 2007)**.** Por otro lado hay diversos investigadores que han encontrado que el naproxen induce la lipoperoxidación en hepatocitos aislados (Yokoyama *et al.*, 1995) ya que aumenta a las TBARS y disminuye la cantidad de glutatión. En 2001 Ji y colaboradores encontraron que en microsomas hepáticos tratados con altas concentraciones de naproxen hay una elevación de Fe^{3+} de donde se concluye que el AINE contribuye al aumento de Fe^{3+} que induce la LP.

4.16.4. Nimesulide

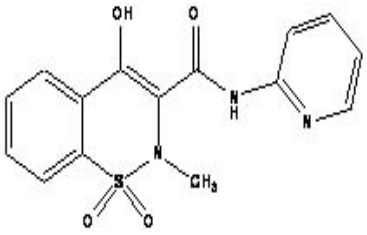


N-(4-Nitro-2-fenoxifenil) metanesulfonamida

El nimesulide es un analgésico, anti-inflamatorio y antipirético, inhibidor de la síntesis de prostaglandinas con acción específica sobre la enzima inducible COX-2 y es un atrapador de $O_2^{\cdot -}$.(Famaey, 1997; Giuliano y Warner, 1999; Capone *et al*., 2007). Después de su ingestión se absorbe con facilidad y la máxima concentración en plasma se encuentra entre 1 y 3 horas aproximadamente. La ingesta alimenticia puede reducir la velocidad de absorción y aproximadamente el 99% se une a las proteínas plasmáticas. La mayor parte del nimesulide ingerido se metaboliza principalmente en 4-hidroxi-nimesulide y sólo entre el 1 y el 3% es excretada como tal en la orina y aproximadamente el 70% de sus metabolitos son excretados por vía urinaria y el resto por las heces. El mecanismo de

acción del nimesulide puede contribuir a explicar algunos efectos farmacológicos, los cuales incluyen acción sobre la liberación de histamina, la mieloperoxidasa de los neutrófilos, actividad de la bradicinina, factor de necrosis tumoral alfa, la degradación del cartílago, síntesis de metaloproteasas, inhibición de la fosfodiesterasa tipo IV, agregación plaquetaria y sobre la síntesis del factor activador de plaquetas. Igual que otros AINEs el nimesulide (50 micromolar) puede iniciar un cuadro de hepatitis ya que desacopla la respiración y puede causar necrosis de los hepatocitos lo que ocasiona depleción de ATP (Berson *et al*., 2006).

4.16.5. Piroxicam



4-hidroxi-2-metil-N-(2-piridinil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dióxido

El piroxicam es un AINE que se absorbe completamente y su la máxima concentración plasmática se encuentra entre las 2 y las 4 horas después de su ingestión.

Pertenece a la familia de los oxicanes y actúa inhibiendo la ciclooxigenasa (COX), destacándose entre otros AINEs por su larga duración de acción. Es un inhibidor no selectivo, ya que inhibe a las isoformas (COX-1 y COX-2) de la COX (Griswold y Adams, 1999; Van Antwerpen y Nève, 2004). Además inhibe la quimiotaxis, la liberación de enzimas lisosomales, tiene capacidad de generar anión superóxido. Se une a las proteínas plasmáticas y se metaboliza por hidroxilación y glucuronoconjugación.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La ingestión elevada de etanol tiene una acción inflamatoria y hepatotóxica debido en parte a un incremento en la producción de radicales libres, a un mayor depósito de triacilgliceroles y a su disminución en la degradación y exportación a la circulación ya que ambos procesos promueven un aumento de la lipoperoxidación. Se plantea el papel de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) como posibles agentes que disminuyan la síntesis de ERO y por ende la lipoperoxidación hepática y la inflamación.

6. HIPÓTESIS.

Los AINEs atenuan los procesos inflamatorios a través de la inhibición de la ciclooxigenasa y eventualmente por una disminución en la producción ERO. Se postula que los AINEs disminuyan la inflamación hepática ocasionada por la ingesta excesiva de etanol, y en consecuencia que abatan la generación de ERO, disminuyan la lipoperoxidación y por ello tienda a elevarse la poza de TAG y en general, sean menores los efectos tóxicos del etanol.

7. OBJETIVO GENERAL

Establecer un manejo lógico para revertir las acciones inflamatorias y tóxicas provocadas en el hígado por la ingestión exagerada de etanol, que se base en los clásicos efectos antiinflamatorios de los AINEs.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer la participación de algunos AINEs en el estrés oxidativo consecuente a la intoxicación con etanol.

2. Estudiar la modificación que tienen los indicadores del daño oxidativo, cuando los hepatocitos aislados son incubados con etanol y diversas concentraciones de piroxicam.

3. Valorar los resultados obtenidos debido a la presencia del etanol, en las 3 condiciones experimentales diferentes: ratas alimentadas, o con ayuno, y hepatocitos aislados y detectar el efecto de los AINEs participantes

8. MATERIAL Y MÉTODOS.

En este capítulo se presenta de manera breve y general el diseño de los experimentos que son el tema de estudio en los que se enfoca la presente tesis. Lo anterior obedece a que en el capítulo de Resultados se incluyen una serie de artículos publicados, y en cada uno de ellos se encuentran detalladas las condiciones particulares en las que se efectuaron los experimentos individuales: se señalan los materiales, los métodos empleados, el tratamiento de los animales y el manejo de las células.

Los experimentos se realizaron con ratas macho cepa Wistar alimentadas *ad libitum* con dieta comercial (Nutricubos de Purina, México), con libre acceso al agua.

Para los experimentos publicados en los artículos:

► Zentella de Piña M, Hernández-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A, Piña E. (1992), Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Letters. 298(2-3):123-125 y

► Zentella de Piña M, Saldaña-Balmori Y, Hernández-Tobías A, Piña E (1993) Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. Alcohol Clin Exp Res. 17(6):1228-1232, se emplearon ratas de 200 a 225 g de peso y se les mantuvo en ayuno de 16-24 h previas al inicio del tratamiento.

Los datos obtenidos de los experimentos publicados en el artículo:

► Zentella de Piña M, Corona S, Rocha-Hernández AE, Saldaña Balmori Y, Cabrera G, Piña E. (1994) Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. Life Sciences. 54(19):1433-1439 se realizaron en ratas con un peso de 150 a 200 g y a las que se les mantuvo alimentadas hasta el inicio del tratamiento.

Para los experimentos publicados en los artículos:

► Saldaña-Balmori Y, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Rocha-Hernández A, Piña E. (1996) Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated hepatocytes. European J Pharmacology. 317:225-229 y

► Riveros-Rosas H, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Saldaña-Balmori Y, Julián-Sánchez A, Saavedra-Molina A, Piña E. (1999). Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes. European J Pharmacology. 380:49-59 se aislaron hepatocitos de ratas con 200-250 g. de peso a las que se les había mantenido en ayuno las 48 h previas a su sacrificio.

Resumiendo, los experimentos realizados se dividen en:

in vivo: **A**. Con ayuno de 16 ó 24 horas

B. Alimentadas *ad libitum*

*in vitro***:** **C**. Con hepatocitos aislados después de un ayuno de 48 horas.

Experimentos *in vivo.* Una vez concluido el tiempo del ayuno, las ratas del grupo **A** fueron divididas en cuatro sub-grupos y recibieron por vía orogástrica en un volumen de 2.0 ml., de uno de los siguientes tratamientos:

1. Glucosa, 37.5 kcal/Kg. de peso (de una solución al 40%), más NaCl al 0.9% equivalente a la cantidad en la que se disolvió el AINE;

2. Etanol, 5 g/Kg de peso (37.5 kcal/Kg. de peso de una solución al 30%), más NaCl al 0.9% equivalente a la cantidad en la que se disolvió el AINE;

3. Glucosa a la cantidad arriba señalada, más uno de los cinco AINEs disueltos en NaCl al 0.9%: ácido acetilsalicílico (56 mg/Kg. de peso), dipirona (43 mg/Kg. de peso), naproxen (7 mg/Kg. de peso), nimesulide (30 mg/Kg. de peso) o piroxicam (10 mg/Kg. de peso) y

4. Etanol más uno de los cinco AINEs en las cantidades señaladas arriba.

Los experimentos del grupo **B** se realizaron con ratas a las que se les mantuvo con alimento *ad libitum* hasta poco antes del inicio del experimento y que recibieron uno de los 4 tratamientos descritos para las ratas del grupo **A**.

Tanto a las ratas de los experimentos del grupo **A** como las del grupo **B** se les permitió la acción del etanol y/o del anti-inflamatorio por periodos que van de 2, 4, 8, 12 y 16 horas –aunque en otros experimentos los tiempos del tratamiento no tuvieron horarios tan amplios– al término de las cuales se sacrificaron por decapitación se recogió la sangre en presencia de anticoagulante y se extrajo el hígado, un trozo de éste fue homogeneizado

en agua bidestilada y se tomaron alícuotas para hacer las determinaciones de TAG, TBARS y proteínas.

Las determinaciones de etanol se realizaron en sangre conforme al método descrito por Bernt y Guttmann (1974). Las proteínas se midieron por la técnica de Bradford (1976). Las determinaciones de TAG se realizaron por la técnica de Gottfried y Rosenberg (1973); éstos se extrajeron de la alícuota del homogenizado de hígado con heptano, se hidrolizaron con KOH y el glicerol liberado se oxidó con peryodato, el formaldehído resultante se condensó con acetil-acetona dando lugar a un derivado colorido que se midió espectrofotometricamente, los resultados se expresan como miligramos de TAG por miligramo de proteína. Las TBARS se midieron por el método de Ottolenghi modificada por Hernández-Muñoz (1984) y finalmente modificado por nosotros (Zentella de Piña *et al*., 1992). Para las determinaciones de TBARS, se tomó una alícuota de homogenizado de hígado, se incubó con buffer fosfatos por 0.15 M pH 7.4 durante 30 minutos a 37º C, esta reacción se detuvo con ácido acético al 20% y pH 2.5, se añadió ácido tiobarbitúrico al 0.8%, las muestras se llevaron a baño de ebullición por 45 minutos, se añadió KCl al 2% y se realizó la extracción con butanol-piridina (15:1) y se leyó la absorbancia de la capa orgánica a 532 nm. La concentración de TBARS en las muestras se calcularon usando el coeficiente de extinción de 1.56×10^5 M^{-1} cm^{-1}. Los resultados se expresaron como nmolas de TBARS por miligramo de proteína. Las determinaciones de GSH y GSSG se realizaron conforme a la técnica reportada por Akerboon y Sies (1981), se tomaron dos trozos de hígado que fueron congelados rápidamente en N_2 líquido, posteriormente en una de ellas se hizo la determinación de glutatión total, el tejido fue homogeneizada en ácido perclórico en EDTA, la otra muestra de tejido se homogeneizó en presencia de ácido perclórico en EDTA y N-etilmaleimida para determinar el GSSG. Los valores de GSH se obtienen de la diferencia de glutatión total y el GSSG.

Para los experimentos *in vitro* (Grupo **C**):

En estos experimentos los animales tuvieron ayuno de 48 horas antes del tratamiento. Los hepatocitos se obtuvieron conforme la técnica de Berry y Friend (1969) modificada por Guinzberg y colaboradores (1987) mediante la perfusión del órgano y aislados con colagenasa; se ensayó la viabilidad de las células por el método de exclusión de azul de tripán y los experimentos se realizaron cuando tuvieron 90% de viabilidad. Las células

aisladas se incubaron en un buffer de bicarbonato Ringer-Krebs con cantidades crecientes de piroxicam (1 x 10^{-9} a 1 x 10^{-4} M), en ausencia o presencia de epinefrina (1 x 10^{-6} M) y con 50 mM de etanol o 50 mM de lactato de sodio. Después de una hora de incubación, se midió la poza de TAG, la producción de TBARS, el lactato o el etanol consumido y las proteínas. Las técnicas empleadas para las determinaciones de TAG, TBARS, proteínas y etanol son las mismas que se mencionaron para las determinaciones *in vivo* y las determinaciones de lactato se realizaron conforme la técnica descrita por Guttmann y Wahlefeld (1974).

9. RESULTADOS

El estudio del daño ocasionado por la presencia de etanol en ratas, se ha abordado desde diferentes ángulos, a continuación se presentan 5 artículos publicados cronológicamente por nuestro grupo de trabajo, que nos han ayudado a conocer una acción benéfica de los AINEs en un diseño experimental de intoxicación alcohólica:

►Grupo **A**. En los dos primeros artículos se presentan los resultados de los experimentos realizados con animal íntegro, con ayuno controlado y permitiendo el efecto del etanol y cada uno de los 5 AINEs utilizados;

►Grupo **B**. En el tercer artículo, se trabajó con animal íntegro, sin retiro del alimento y permitiendo el efecto del etanol y sólo uno de los AINEs, el piroxicam

►Grupo **C**. En los dos últimos artículos los experimentos se hicieron con hepatocitos aislados de rata incubados en presencia de etanol, con y sin epinefrina y de sólo uno de los AINEs, el piroxicam.

1. Zentella de Piña M, Hernández-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A, Piña E. (1992). Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Lett. 298(2-3):123-125.

Di Luzio en sus trabajos de 1963 y 1967 plantea el concepto de que el etanol afecta el balance de antioxidantes en la célula hepática y reporta que en homogenizado de hígado de rata tratada con etanol hay un aumento tanto de la poza de TAG como de la lipoperoxidación. Durante la oxidación del etanol en la célula, por la acción de diversas deshidrogenasas, se induce el incremento de NADH + H^+, este aumento se refleja en una mayor producción de metabolitos reducidos en comparación con los oxidados, entre otros por la reducción de la dihidroxiacetona fosfato ocasiona hay un aumento de glicerol-3-fosfato, lo que ocasiona que el metabolismo se desplace hacia la síntesis de TAG. Por otro lado, la oxidación del etanol conduce a un aumento de acetaldehído que impulsa un aumento de la lipoperoxidación. Vane en 1971 descubrió que ASA y drogas similares inhiben la síntesis de prostaglandinas que contribuyen a la inflamación.

El diseño original del empleo del piroxicam para esta serie de experimentos tuvo como antecedente que con su ingesta, se observó una mejoría en el cuadro general que presentaban humanos varones con hepatitis alcohólica que acudían a un servicio hospitalario (Díaz Belmont *et al*., 1987). Posteriormente, en el laboratorio se encontró que el piroxicam prevenía el aumento de 2 aminotransferasas en hígado y que mantenía normales los valores de TAG y los TBARS en ratas intoxicadas con CCl_4 (Díaz Belmont *et al*., 1990).

Es importante mencionar que en el desarrollo de los experimentos publicados en este artículo se ensayaron dos diferentes técnicas para la medición de TAG, la señalada en el método de Butler *et al*., (1961) y la de Gottfried y Rosenberg, 1973), con la segunda se obtuvieron resultados más reproducibles; de igual forma la lipoperoxidación se midió en dos condiciones diferentes una de ellas conforme a la técnica de Ottolenghi y modificada por Hernández-Muñoz et al. en 1984 en la que se emplea amortiguador TRIS 0.15M pH 7.4, y la otra con la que se desarrollaron los experimentos en donde el amortiguador TRIS, se sustituyó por uno de fosfatos 0.15 M y pH 7.4, con este amortiguador las determinaciones se obtuvieron con mayor exactitud y reproducibilidad.

Los experimentos se realizaron con ratas del grupo **A** descrito en Material y Métodos, el AINE que se estudió fue el piroxicam, el ayuno previo al inicio del tratamiento fue de 16 horas, los animales se dividieron en los 4 sub-grupos previamente descritos. Las ratas fueron sacrificadas después de 4, 8, 12 y 16 horas, en los resultados se observó que a las 8 y 12 horas de haber administrado el etanol hay una poza elevada de TAG, este valor se disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en las ratas que recibieron el etanol y el AINE. Los valores más altos de la lipoperoxidación obtenida por la administración de etanol se dieron a las 8 horas y la administración simultánea de etanol y piroxicam permitió que disminuyeran significativamente ($P< 0.001$) tanto a las 8 como a las 12 horas; por otro lado el etanol residual presente en la sangre de las ratas que fueron sacrificadas a las 8 horas de tratamiento y que habían recibido alcohol al mismo tiempo que el AINE fue 38% menor de las que sólo recibieron etanol.

En conclusión, hay un aumento en la poza de TAG y en la producción de TBARS en homogenizado de hígado debido a la oxidación del etanol y cuando está presente el piroxicam, disminuyen significativamente los TAG y los TBARS a las 18 y a las 12 horas, del mismo modo con la presencia del AINE se activó la oxidación del etanol, por lo que la cantidad residual del mismo en la sangre en las ratas que lo recibieron se encontró disminuida.

Volume [illegible], number 2,3, 171–175 FEBS 10721 February 1992
© 1992 Federation of European Biochemical Societies [illegible]

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

Maria Zentella de Piña[a,b], Aida Hernández-Tobías[a], Yolanda Saldaña-Balmori[a], Armando Díaz-Belmont[a] and Enrique Piña[a]

[a]Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México and [b][illegible] Hospital General de México, [illegible] de Salud, México

Received 23 December 1991

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

Ethyl alcohol; [illegible]; Non-steroidal anti-inflammatory agent; Alcoholic hepatitis; [illegible]; Piroxicam

1. INTRODUCTION

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

2. MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (200–225 g) were fasted [illegible] h before treatment and divided into four groups: control, receiving [illegible] [illegible] and equivalent amounts of piroxicam vehicle solution; ethanol, receiving 3 or 5 g of ethanol/kg body weight [illegible] piroxicam [illegible] 25% glycerol/water solution [illegible] and ethanol plus piroxicam, receiving ethanol 3 or 5 g/kg and piroxicam [illegible] mg/kg body weight. The [illegible] compounds were given by intragastric via (OGV) unless otherwise indicated. In most of the experiments rats were killed [illegible]. Blood was collected in EDTA and liver samples were taken to evaluate TAG, protein and malondialdehyde (MDA). TAG were determined by the method described by [illegible] et al. [2] [illegible] in liver homogenates prepared in [illegible] [3], MDA was quantified by the thiobarbituric acid method [4] modified as recommended by Hernández-Muñoz et al. [4]. Protein was determined by the Bradford colorimetric method [5]. Blood ethanol was assayed [illegible] by the method of Bernt and Gutmann [6]. Hematocrit was measured with standard clinical laboratory techniques.

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

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

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

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

3. RESULTS

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

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

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

Published by Elsevier Science Publishers B.V.

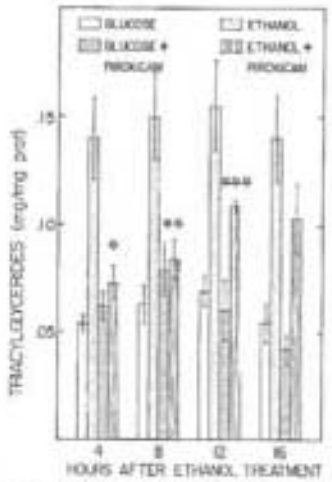


Fig. 1. Effect of piroxicam on ethanol-promoted lipid accumulation in liver. Levels of TAG in the liver of rats at different times after treatment. The dose of ethanol was 5 g/kg of body weight by OGV. Piroxicam was administered consecutively to glucose or ethanol and by the same route. Range of individual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

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

Ethanol content in the stomachs of rats receiving 5 g of ethanol per kg of body weight by OGV 2 h before was 4.62 ± 1.14 mmol/g of stomach (n=4), when ethanol was given alone, and it was 6.22 ± 1.51 (n=4) when ethanol was supplemented with piroxicam; the difference was without statistical significance ($P < 0.2$). Similarly, the treatment with piroxicam produced no difference in the amount of ethanol eliminated by urine from rats treated with 3 g of ethanol per kg of body weight by IPV; i.e. 6 nmol/h and 5 nmol/h with and without piroxicam, respectively. Furthermore, the hematocrit value was the same in both groups of animals.

4. DISCUSSION

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

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

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

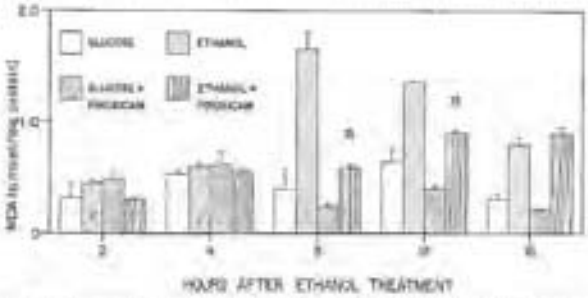


Fig. 2. Effect of piroxicam on ethanol-promoted liver peroxidation. Levels of MDA in the liver of rats at different times after receiving the treatment indicated in the figure. Other indications as in Fig. 1. n from 3 to 7. $^{*}P < 0.001$ comparing ethanol vs. ethanol plus piroxicam.

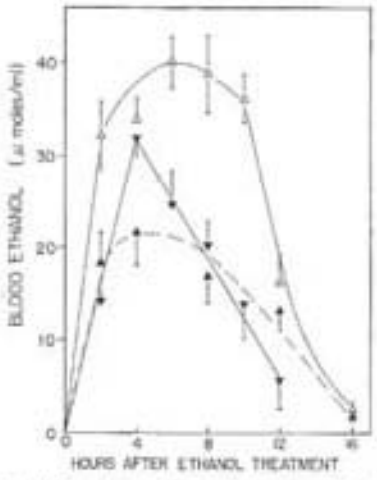


Fig. 3. Role of piroxicam on time course ethanol levels in blood. All animals received 5 g/kg ethanol by OGV plus: (△—△), 0.1 ml saline by OGV; (▲—▲), 0.1 ml 20 mg/ml piroxicam by OGV; and 20 mg/ml piroxicam by IPV, (▼—▼). For 2 h $n=8$, and $n=5$ in other data. Other indications as in Fig. 1. Values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

TAG content (Fig. 1), a minor cellular transformation to hydroxyethyl free radical [10,11] and therefore no activation of lipoperoxidation, and also the reported decrease in the duration of hypnosis [12]. Finally, the action of piroxicam limitating lipoperoxidation and MDA production (Fig. 2) might also be related to the reported action of NSAIDs to scavenge, or to inhibit, the generation of free radicals [13,14].

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

REFERENCES

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

2.- Zentella de Piña M, Saldaña-Balmori Y, Hernández-Tobías A, Piña E. (1993) Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. Alcohol Clin Exp Res.17(6):1228-1232.

Los experimentos se realizaron con ratas del grupo **A** descrito en Material y Métodos, se siguió el protocolo presentado en la anterior publicación pero en este estudio se trabajó con cuatro AINE, ácido acetilsalicílico, dipirona, naproxen y nimesulide. La cantidad de etanol que recibieron las ratas ocasionó un aumento en el contenido hepático de TAG y TBARS a las 8 y 12 horas después de iniciado el tratamiento.

Cuando se administró simultáneamente etanol y ácido acetilsalicílico (ASA), a las 4 y 8 horas, se abatió la cantidad de TBARS producidas ($P < 0.05$); y considerando que la vida media del ácido acetilsalicílico es de aproximadamente de 6 horas, fue necesario administrar una segunda dosis del AINE, para mantener el efecto. Se encontró que a las 12 horas continuó disminuida la cantidad de TBARS. Los datos obtenidos con la dipirona, –un anti-inflamatorio que se está borrado de los cuadros básicos de medicamentos de países del primer mundo debido a que el consumo sostenido por tres semanas puede contribuir a que se presente degranulación hepática– se encontró que su presencia junto con el etanol tuvo un efecto muy marcado en la disminución de TBARS, a las 8 y a las 12 horas de tratamiento ($P < 0.001$). El naproxen, a la concentración farmacológica en presencia de etanol, fue efectivo propiciando una protección del tejido hepático, el que se observó tanto en la disminución de la poza de TAG como por la disminución de TBARS en el homogenizado de hígado ($P < 0.001$). El nimesulide exhibe una acción semejante a la presentada por estos últimos AINEs, aunque es más marcado su efecto como anti-lipoperoxidativo a las 8 horas ($P < 0.001$) que a las 12 ($P < 0.01$).

Los niveles de TAG y de TBARS, en estos experimentos se elevaron por la presencia del etanol y se disminuyeron por la participación de los AINE, teniendo valores diferentes dependiendo de la naturaleza del AINE y del tiempo en el que se permitió la intoxicación. Es notoria la observación del efecto anti-lipoperoxidativo de los AINE empleados, así como la protección en la liberación de TAG hepáticos.

La disminución del contenido de etanol en sangre fue diferente para los AINE participantes, con ASA y naproxen disminuyó importantemente a las 4 horas para el

primero y a las 8 horas para el segundo, el nimesulide no tuvo efecto y con la dipirona aumentó su concentración, este comportamiento diferente del etanol en presencia de los AINEs puede deberse entre otras causas, a efectos diferentes de los AINEs sobre la oxidación del etanol.

Con los resultados obtenidos con estos experimentos, proponemos que, mediante los indicadores empleados para medir el daño hepático, los AINEs estudiados contribuyen para atenuar el estrés oxidativo que se produce por la ingesta aguda de etanol.

0145-6008/93/1706-1228$3.00/0
ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH

Vol. 17, No. 6
November/December 1993

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

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

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

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

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

Pretreatment with antioxidants was shown to be effective against ethanol-induced LP.[5] Interestingly, this pretreatment was effective also in preventing ethanol-induced fatty liver.[5] However, it is not apparent why a nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID), piroxicam, inhibits hepatic increase of TBA reactive substances (TBARS) and triacylglycerols (TAGs) measured after the acute intoxication of rats with ethanol.[6] Furthermore, in the intoxicated animals, piroxicam produced a decrease in the levels of blood ethanol in comparison with control ones.[6] The purpose of this work is to learn whether different NSAIDs share with piroxicam the action of preventing the increase in TAGs and TBARS, caused by ethanol intoxication. These experiments could be important due to the widespread clinical use of NSAIDs.[7]

METHODS

Male Wistar rats (200–225 g) were fed ad libitum with a commercial diet (Nutricubos from Purina, Mexico). The content of minerals and vitamins in the diet was maintained constant, according to the producer. The animals were fasted 24 hr before treatment, but free access to water was permitted. Rats were divided into four groups and treated as follow: *glucose*, receiving gavage glucose 37.5 kcal/kg body weight (as a 40% w/v solution) plus a corresponding amount of NSAID vehicle; *ethanol*, receiving gavage ethanol 37.5 kcal/kg body weight (as a 30% solution) plus equivalent amounts of the NSAID vehicle; *glucose plus a NSAID*, receiving gavage glucose as in the control group and one of the following NSAIDs: acetylsalicylic acid (ASA), dipyrone, naproxen, or nimesulide, at the doses indicated below; and *ethanol plus a NSAID*, receiving gavage ethanol as in the ethanol groups and one of the listed NSAIDs at the doses described in the following paragraphs. Each one of the NSAIDs, dissolved in NaCl (0.9%), was given orogastrically immediately after glucose or ethanol solutions. Doses of NSAIDs used were as follow: acetylsalicylic acid as aspirin (commercial presentation from Bayer) 56 mg/kg body weight, approximately one-half of the daily doses quoted by Insel[7] for patients with acute rheumatic fever; in a different model, 56 mg of ASA/kg is as effective as 10 mg/kg body weight piroxicam,[8] which was the dose used to inhibit the ethanol-mediated increase of TBARS and TAG liver content.[6] In experiments elapsing more than 8 hr, a second identical dose of ASA was given 8 hr after the first administration, because the elimination half life for ASA might be shorter than 1 hr.[9] Dipyrone (Neo-melubrina from Hoechst), 43 mg/kg body weight, and naproxen (Naxen from Syntex), 7 mg/kg body weight, were used at equivalent doses to those suggested for their use in humans (ref. 10 for dipyrone and ref. 7 for naproxen). Due to the high therapeutic index of nimesulide (Mesulide from Lakeside) lethal dose$_{50}$/effective dose$_{50}$ = 260,[11] it was used at the doses of 30 mg/kg body weight, which is five times higher than the dose recommended for human use.[12]

Rats were killed by decapitation 4, 8, and 12 hr after treatment. Blood samples were collected in EDTA for ethanol determination and liver homogenates prepared in double distilled water for protein, TBARS, and TAGs determinations. TAGs were extracted with heptane and hydrolyzed with KOH as described by Gottfried and Rosenberg[13]; glycerol was then oxidized with periodate and the resulting formaldehyde condensed with acetylacetone to form a yellow dehydrolutidine derivative, measured colorimetrically.[14] TBARS was determined by minor modifications to the TBA original method[15]: the liver homogenate was passed through a cheesecloth and a 0.2 ml aliquot incubated with 1.0 ml of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.0) for 30 min at 37°C, 1.5 ml acetic acid (20%) (pH 2.5), and 1.5 ml TBA (0.8%) were then added. The mixture was

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

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

This work was supported in part by Grant IN-207282 from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de Mexico.

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

Copyright © 1993 by The Research Society on Alcoholism.

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

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

Protein was quantified by Bradford colorimetric method.[15] For the blood ethanol determination the spectrophotometric method of Bernt and Gutmann,[16] using alcohol dehydrogenase, was used. For statistical analysis Student's *t* tests were performed, and *p* values calculated and included in the corresponding figure.

RESULTS

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

One glucose- and one ethanol-treated rat were included in each experiment. Because four NSAIDs were tested, at the end of the experimental period, data from near 20 rats from either the glucose or ethanol groups were available in each one of the selected times (4, 8, or 12 hr). For this reason each value in the glucose- or in the ethanol-treated group within the four figures included corresponds to ~20 determinations of blood ethanol, TBARS, and TAGs liver content.

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

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

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

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

DISCUSSION

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

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

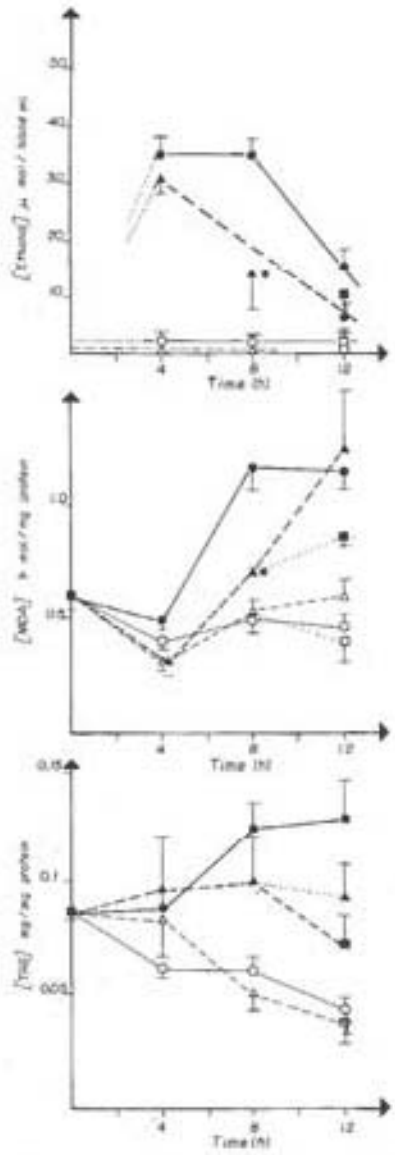


Fig. 1. Effect of ASA on time course biochemical indicators. Experimental groups: glucose (□), receiving gavage glucose 37.5 kcal/kg body weight, as a 40% w/v solution, plus 0.9% NaCl in equivalent amounts used to dissolve ASA; ethanol (●), receiving gavage ethanol 37.5 kcal/kg body weight, as a 30% solution, plus 0.9% NaCl in equivalent amounts used to dissolve ASA; glucose plus ASA (one dose) (○——○), glucose as previously indicated with one single dose of 56 mg ASA/kg body weight dissolved in 0.9% NaCl; glucose plus ASA (two doses) (△. . □), glucose as previously indicated and two identical doses of 56 mg ASA/kg body weight dissolved in 0.9% NaCl, the first dose was given at the beginning of the experiment and the second one was given 8 hr later; ethanol plus ASA (one dose) (▲——▲), ethanol and one single dose of ASA as indicated; and ethanol plus ASA (two doses) (▲. . ■), ethanol and two identical doses of ASA as previously indicated. Statistics: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, comparing ethanol group vs. ethanol plus ASA group ($n = 18$ for glucose and ethanol groups and $n = 4$ for glucose plus ASA, one or two doses, and for ethanol plus ASA, one or two doses).

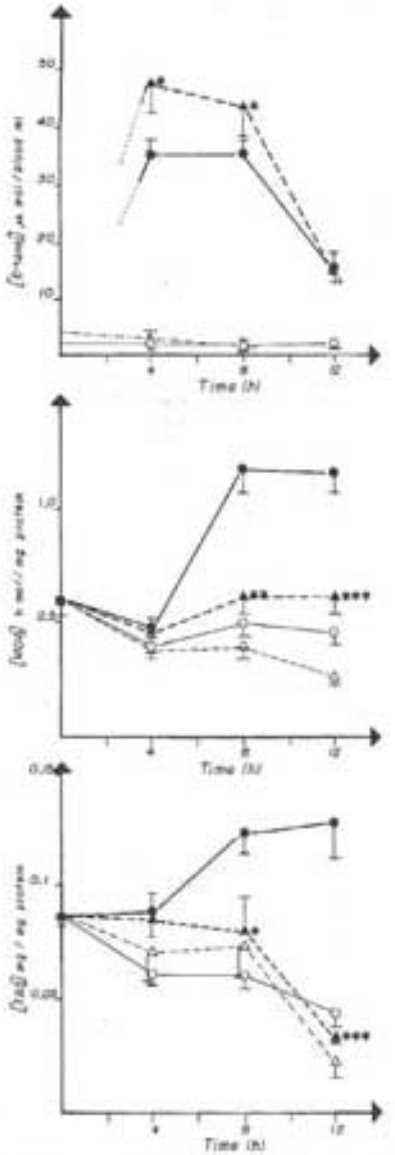
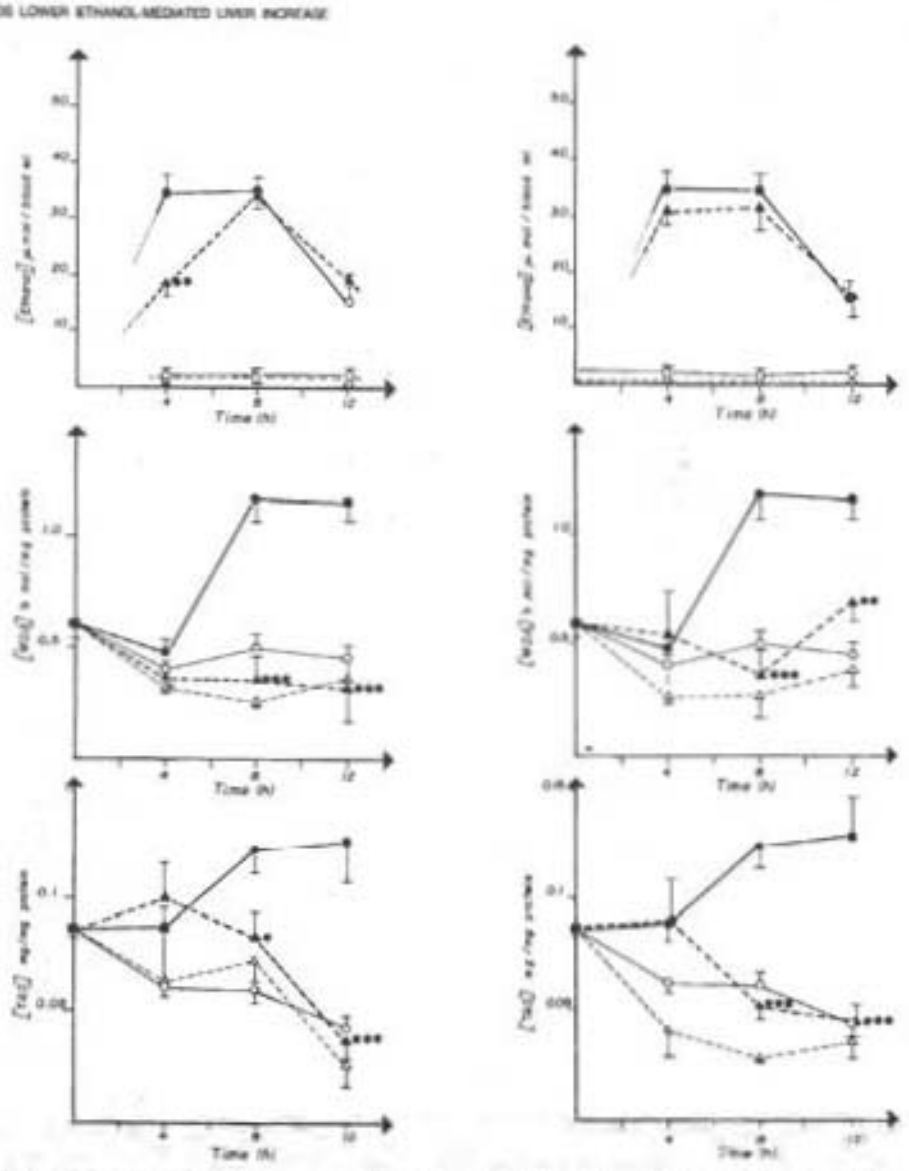


Fig. 2. Dipyrone effects on time course biochemical indicators. Groups: glucose (□), receiving gavage glucose 37.5 kcal/kg body weight, as 40% w/v solution, and 0.9% NaCl in equivalent amounts to dissolve dipyrone; ethanol (●), receiving gavage ethanol 37.5 kcal/kg body weight, as 30% solution, and 0.9%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



liver increase in TAG content, equally promoted by an acute ethanol intoxication. In a similar way, treatment with antioxidants also controls ethanol-induced LP and fatty liver.[2,5] Furthermore, the described actions of the presently studied compounds are shared by piroxicam,[6] another member of the NSAIDs family, thus giving a positive answer to the question depicted in the introduction to this study.

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

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

The rather high doses of NSAIDs used in this work and in a previous one[6] do not minimize their remarkable similar actions on reverting TBARS and TAG increases in the liver as effects of ethanol intoxication. At this stage of the experimental work, a possible mechanism of these NSAIDs actions is only speculative. The anti-LP effect of the NSAIDs described herein might be related to the well-established action of these drugs on the cyclooxygenase inhibition,[18] but a more direct activity of the NSAIDs working as free radical scavengers has been described for some of them,[19,20] and this possible mechanism cannot be ruled out.

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

1. Pacifici RE, Davies KJA: Protein degradation as an index of oxidative stress. in Packer L, Glazer AN (ed): Oxygen Radicals in Biological Systems. Part B. Oxygen Radicals and Antioxidants. Methods in Enzymology, vol 186. San Diego, Academic Press, 1990, p 485

2. Rubin CH, Di Luzio NR: Permeability of liver lipids in its pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. Science 152:1380–1382, 1966

3. Burk RF, Hill KE: Use of perfused organs in measurement of drug-induced oxidant stress, in Packer L, Glazer AN (ed): Oxygen Radicals in Biological Systems. Part B. Oxygen Radicals and Antioxidants. Methods in Enzymology, vol 186. San Diego, Academic Press, 1990, p 759

4. Gutteridge JMC, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 15:129–135, 1990

5. Di Luzio NR: Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by the simultaneous administration of antioxidants. Life Sci 3:113–118, 1964

6. Zentella de Piña M, Hernández-Tobias A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A, Piña E: Biochemical ethanol effects affected by a nonsteroidal anti-inflammatory drug. FEBS Lett 298:123–125, 1992

7. Insel PA: Analgetic-antipyretics and antiinflammatory agents; drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout, in Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds): Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, ed 8. New York, Pergamon Press, 1990, p 638

8. Wiseman EH: Review of preclinical studies with piroxicam: Pharmacology, pharmacokinetics and toxicology. Roy Soc Med Int Cong Symp Ser 1:11–23, 1978

9. Brooks PM, Day RO: Nonnarcotic Antiinflammatory drugs—Differences and similarities. N Engl J Med 324:1716–1725, 1991

10. Mandel HG, Davison C: Nonnarcotic analgesics and antipyretics. II. Nonsalicylates and drugs useful in gout, in Di Palma J R (ed): Drill's Pharmacology in Medicine, ed 4. New York, McGraw-Hill, 1971, p 404

11. Swingle KF, Moore GGI, Grant TJ: 4-Nitro-2-phenoxymethanesulfonanilide (R-805): A chemically novel anti-inflammatory agent. Arch Int Pharmacodyn 221:132–139, 1976

12. Reiner M, Magni E: Efficacy and safety of nimesulide in the short term treatment of rheumatoid arthritis. Curr Ther Res 31:906–912, 1982

13. Gottfried SP, Rosenberg B: Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triglycerides. Clin Chem 19:1077–1078, 1973

14. Ottolenghi A: Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. Arch Biochem Biophys 79:355–363, 1959

15. Bradford MM: A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254, 1976

16. Bernt E, Gutmann I: Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD^+, in Bergmeyer HM (ed): Methods of Enzymatic Analysis, vol 3, ed 2. New York, Verlag Chemie, Academic Press, 1974, p 1499

17. Machlin LJ, Bendich A: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. FASEB J 1:441–445, 1987

18. Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. Nature (New Biol) 231:232–235, 1971

19. Sagone AL, Hussey RM: Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: Evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems. J Immunol 139:2177–2183, 1987

20. Abramson S, Edelson H, Kaplan H, Ludewig R, Weissmann G: Inhibition of neutrophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 77:3–6, 1984

21. Williams GD, Grant BF, Stinson FS, Zobeck TS, Aitken SS, Noble J: Trends in alcohol-related morbidity and mortality. Public Health Rep 103:592–597, 1988

22. Multi-authorial: Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Encuestas de Salud, Encuesta Nacional de Adicciones, Alcohol. México, Secretaría de Salud, 1990

3.- Zentella de Piña M, Corona S, Rocha-Hernandez AE, Saldaña Balmori Y, Cabrera G, Piña E. (1994) Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. Life Sci. 54(19):1433-1439.

Los experimentos se realizaron con ratas del grupo **B** descrito en Material y Métodos, se siguió el protocolo ya descrito, aunque para estos experimentos los animales tuvieron libre acceso al alimento hasta el inicio de tratamiento, fueron tratadas con piroxicam y/o etanol y el tiempo que se permitió el tratamiento fue de 8 y 12 horas.

Se tiene información de que los niveles de glutatión en los animales con ayuno descienden a medida que pasa el tiempo y que este descenso se acentúa por la presencia de etanol. A partir de ello nos planteamos una pregunta de investigación para la realización de estos experimentos: ¿Cuál sería el efecto de la presencia de alimento en ratas a las que se les indujo daño hepático por intoxicación alcohólica y que ocurriría cuando además se les administraría piroxicam? El estudio se amplió, para buscar respuesta a a otra pregunta ¿Qué ocurriría en la poza de glutatión –sistema intracelular antioxidante– en esas ratas que recibirían etanol o etanol + piroxicam?

En ratas con ayuno de 16 h los valores de TAG, 8 y 12 h después de la administración de etanol muestran cifras de 0.15 mg/mg de proteína. La presencia adicional de piroxicam disminuye la cifra a 0.08 y 0.11mg/mg de proteína respectivamente (Zentella *et al*., 1992). Los datos de los experimentos realizados con los animales sin ayuno que participaron en el presente artículo fueron los siguientes: la poza de TAG para las ratas intoxicadas con etanol y sacrificadas a las 8 y a las 12 horas de tratamiento fueron de 0.05 y 0.022 mg/mg de proteína respectivamente, la presencia adicional de piroxicam disminuyó la poza de TAG a 0.01 y 0.015 mg/mg de proteína respectivamente.

Nuestros estudios realizados previamente con animales a los que se les había retirado el alimento, y que habían sido intoxicados con etanol y sacrificados a las 8 y 12 horas de tratamiento (Zentella *et al*., 1992), la cantidad de TBARS fue de 1.7 y 1.5 nmolas/mg de proteína respectivamente, y la presencia adicional de piroxicam disminuyó esos valores a 0.6 y 0.9 nmolas/mg de proteína respectivamente. Ahora bien, los experimentos realizados con los animales sin ayuno en las condiciones del presente artículo, mostraron que la cantidad de TBARS para las ratas intoxicadas con etanol y sacrificadas a las 8 y 12

horas de tratamiento fue de 0.9 y 0.35 nmolas/mg de proteína respectivamente, la inclusión de piroxicam disminuyó los valores a 0.28 y 0.30 nmolas/mg de proteína respectivamente. En los dos indicadores estudiados TAG y TBARS, la presencia de alimento disminuyó los valores alcanzados tanto con el etanol solo, como cuando las ratas recibieron etanol más piroxicam.

Ante la pregunta de qué ocurriría en la poza de glutatión –sistema intracelular antioxidante– en esas ratas que recibirían etanol o etanol + piroxicam? Está ampliamente documentado que en la intoxicación alcohólica, hay un aumento de TBARS y TAG y concomitantemente hay una disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH).

Nuestros resultados indican que tanto a las 8 como a las 12 horas, las ratas que recibieron etanol, tuvieron un 33 y 35% menos de GSH que sus respectivos controles que recibieron glucosa; en las ratas que recibieron etanol + piroxicam el GSH aumentó un 32 y 27% respectivamente, al compararlo con el dato correspondiente de las ratas que recibieron solo etanol. Los valores de GSH + GSSG en las ratas que tuvieron 8, como 12 horas de tratamiento, y que recibieron solo etanol fue de 37 y 45% menos de GSH + GSSG que sus respectivos controles, mientras que las ratas que recibieron etanol + piroxicam tuvieron 36 y 27% más de GSH + GSSG al comparar este dato con el obtenido de las ratas que recibieron solo etanol. El efecto deletéreo del etanol al disminuir la poza de glutatión, se revierte por la presencia del piroxicam

Pergamon

Life Sciences, Vol. 54, No. 19, pp. 1433-1439, 1994
Copyright © 1994 Elsevier Science Ltd
Printed in the USA. All rights reserved
0024-3205/94 $6.00 + .00

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

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

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and
**Departamento de Producción Animal:
Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Postal address:
A. Postal 70159, México 04510, D.F. MEXICO.

(Received in final form February 18, 1994)

Summary

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

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

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

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

Materials and Methods

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

Rats were lightly anaesthetized with ethyl ether and subjected to an incision in the abdomen to expose the organs. Two pieces of liver were taken out, blood washed and immediately introduced in liquid N_2, within the next 24 h one was used to measure oxidized glutathione (GSSG) and the other one to measure GSH + GSSG. A sample of blood was quickly withdrawn by heart punction and placed in ice cold 0.33 N perchloric acid to quantify ethanol by the spectrophotometric technique of Bernt and Gutmann (11). The remaining liver was then pulled out and homogenated in ice cold bidistilled water (1:9 w/v) to assay TAG, TBARS and protein. TAG were determined by the method described by Gottfried and Rosenberg (12). Lipid peroxidation was quantified by the TBARS method as carefully detailed by Zentella de Piña et al. (13). The extinction coefficient of MDA 1.56 x 10^5 cm^{-1} M^{-1} (14) was used and the obtained value is considered as the TBARS content. Protein was determined as described by Bradford (15) by using bovine albumin as standard. In order to measure GSH + GSSG, one of the samples maintained in liquid N_2 was weighed and homogenized in 1.6 ml ice cold I M perchloric acid in 2 mM EDTA, the mixture was centrifuged at 5000 *g* for 10 min at 4°C and the supernatant was adjusted in the range of pH 5 - 7, at 4°C, with a solution containing 2 M KOH and 0.3 M N-morpholinopropanesulfonic acid. The sample was centrifuged again and GSH + GSSG was quantified immediately in an aliquot of the supernatant following method I detailed by Akerboom and Sies (16). GSSG was measured in the other liver sample maintained in liquid N_2, and was weighed and homogenized in 1.6 ml of a solution containing 1 M perchloric acid, 2 mM EDTA and 50 mM N-ethylmaleimide. The mixture was centrifuged at 4°C and the supernatant was brought to pH 6.0, at 4°C with 2 M KOH plus 0.3 M N-morpholinopropanesulfonic acid, the precipitate was eliminated by centrifugation and, in the supernatant, the excess of N-ethylmaleimide was removed by extraction with diethyl ether and the remaining ether was eliminated under reduced pressure (16). An aliquot of 0.5 ml from these washed samples was used to assay GSSG by the method IV described by Akerboom and Sies (16). For either GSSG or GSH + GSSG, the calculation was based on the standard curves prepared for each individual experiment; the content of GSH was calculated by the difference of both previous values.

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

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

Other reagents were analytical grade from Merck-México.

Results and Discussion

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

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

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

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

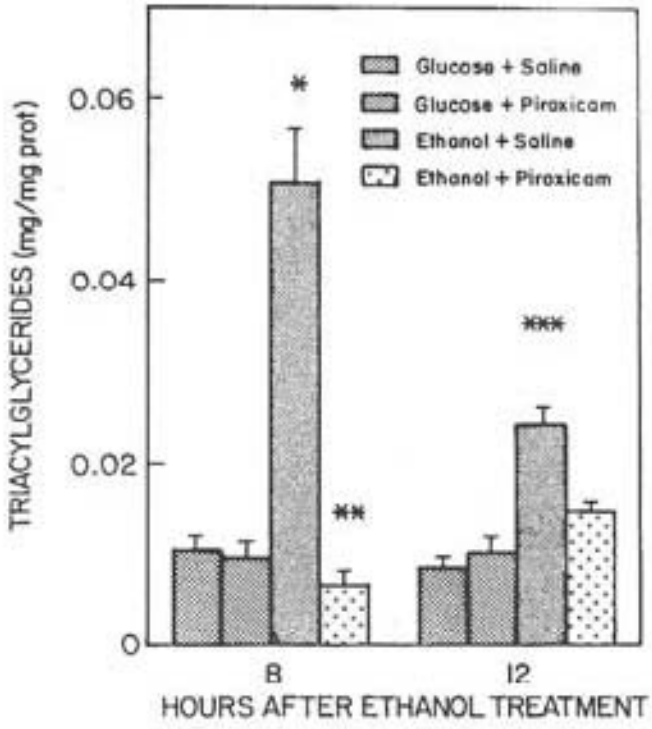


FIG. 1

Effect of piroxicam on the content of hepatic triacylglycerols from fed rats receiving, by orogastric via, isocaloric doses of glucose or ethanol, equivalent to 5 g of ethanol/kg body weight. Piroxicam was administered immediately after glucose or ethanol gavage. The data represent average ± standard error (SE). Range of individual assays (n) from 4 to 6.
* $p < 0.008$ comparing glucose + saline vs ethanol + saline at 8 h.
** $p < 0.006$ comparing ethanol + saline vs ethanol + piroxicam at 8 h.
*** $p < 0.001$ comparing glucose + saline vs ethanol + saline at 12 h.

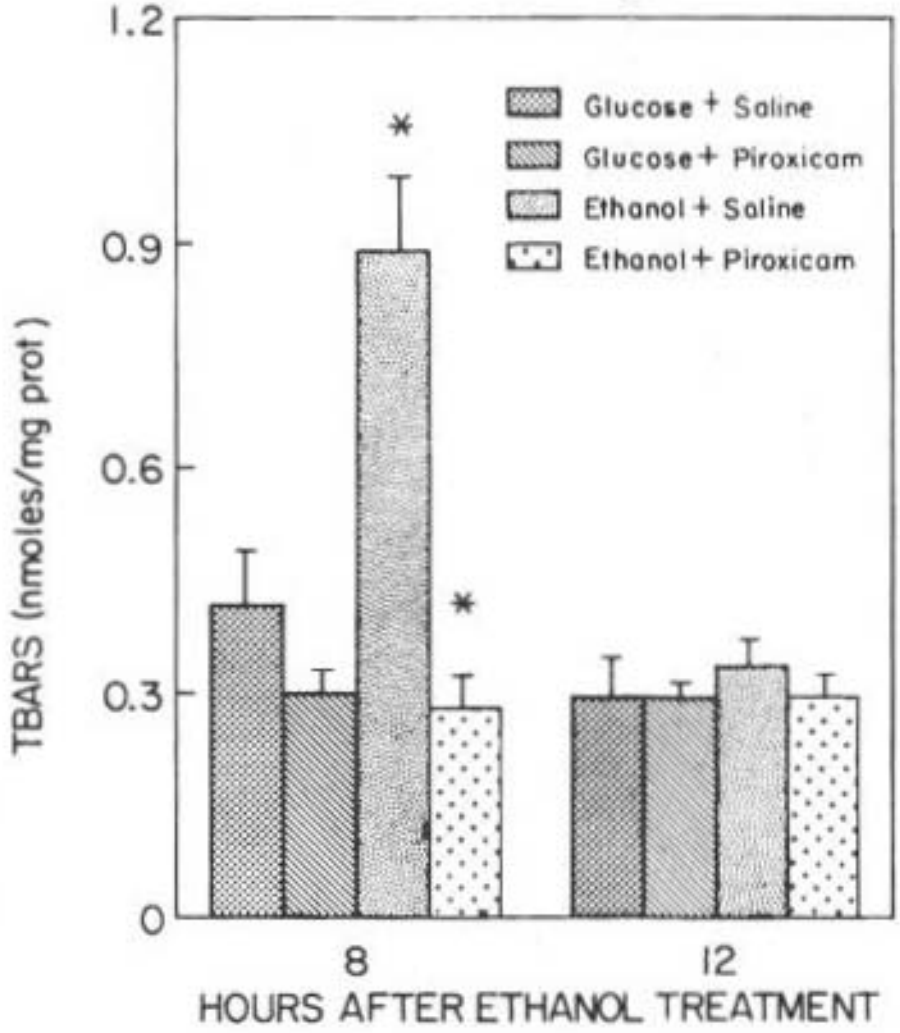


FIG. 2

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

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

TABLE I

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

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

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

[b] Data are in μmoles/g wet liver and correspond to the mean ± SE with the number of rats in parentheses.

[c] Glucose + saline vs ethanol + saline $p < 0.01$.

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

[e] Glucose + saline vs ethanol + saline $p < 0.03$.

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

Other comparisons without statistical significance.

TABLE II

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

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

* Glucose + saline vs ethanol + saline $p < 0.007$.

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

Other indications as in Table I

Acknowledgements

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

References

1. H. SIES, *Oxidative stress*, H. Sies (ed), 1-7, Academic Press, San Diego(1985).
2. N.R. DI LUZIO, Life Sci. *3* 113-118 (1964).
3. R. NORDMANN, C. RIBIERE and H. ROUACH, Free Rad. Biol. Med. *12* 219-240 (1992).
4. L.A. VIDELA, V. FERNANDEZ, G. UGARTE and A. VALENZUELA, FEBS Lett. *111* 6-10 (1980).
5. L.A. VIDELA and A. VALENZUELA, Life Sci. *31* 2395-2407 (1982).
6. A. VALENZUELA, C. LAGOS, K. SCHMIDT and L.A. VIDELA, Biochem. Pharmacol. *34* 2209-2212 (1985).
7. A. MEISTER, Science *220* 472-477 (1983).
8. T.F. SLATER, *Free Radical Mechanisms in Tissue Injury*, T.F. Slater (ed), 171-197, Pion, London (1972).
9. J.M.C. GUTTERIDGE and B.HALLIWELL, Trends Biochem. Sci. *15* 129-135 (1990).
10. M. ZENTELLA DE PIÑA, A. HERNANDEZ-TOBIAS, Y. SALDAÑA BALMORI, A. DIAZ BELMONT and E. PIÑA, FEBS Lett. *298* 123-125 (1992).
11. E. BERNT and I. GUTMANN, *Methods of Enzymatic Analysis* Vol. 3, 2nd edn, H.U. Bergmeyer (ed), 1499-1502, Verlag Chemie, Academic Press, New York (1974).
12. S.P. GOTTFRIED and B. ROSENBERG, Clin. Chem. *9* 1077-1078 (1973).
13. M. ZENTELLA DE PIÑA, Y. SALDAÑA-BALMORI, A. HERNANDEZ-TOBIAS and E. PIÑA, Alcohol Clin.Exp. Res. *17* (1993).
14. T.J. PLAYER, D.J. MILLS and A.A. HORTON, Biochem. Biophys. Res. Comm. *78* 1397-1402, (1977).
15. M.M. BRADFORD, Anal. Biochem. *72*, 248-254, (1976).
16. T.P.M. AKERBOOM and H. SIES, *Methods in Enzymology*, Vol. 77 William B. Jakoby (ed), 373-382, Academic Press Inc., New York (1981).
17. N. KAPLOWITZ, J. KUHLENKAMP, L. GOLDSTEIN and J. REEVE, J. Pharmacol. Exp. Ther. *212* 240-245 (1980).
18. H. GÜNTHERBERG and S. RAPAPORT, Acta Biol. Med. Ger. *20* 559-564 (1968).
19. E. BEUTLER and C.WEST, Anal. Biochem. *81* 458-460 (1977).
20. H. SPEISKY, A. MACDONALD, G. GILES, H. ORREGO and Y. ISRAEL, Biochem. J. *225* 565-572 (1985).
21. L. MICHELI, G. GIORGI, A.I. FIASCHI, D. CERRETANI, Pharmacol. Res. 22 31-34 (1990).
22. G.D. WILLIAMS, B.F. GRANT, F.S. STINSON, T.S. ZOBECK, S.S. AITKEN and J. NOBLE, Public Health Rep. *103* 592-597 (1988).
23. A. LARSSON, S. ORRHENIUS, A. HOLMGREN, B. MANNERVIK (eds.) *Functions of glutathione*. Raven Press, New York, (1983).
24. P.A. INSEL, *Goodman and Gilmans' The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edn. 8 th. A.G. Gilman, T.W. Rall A.S. Nies and P. Taylor (eds), 638, Pergamon Press, New York (1990).

4.- Saldaña-Balmori Y, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Rocha-Hernández A, Piña E. (1996) Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. Eur J Pharmacol. 317(2-3):225-229.

En estudios con el animal íntegro es difícil establecer la relación causa-efecto entre los cambios bioquímicos específicos y los cambios patológicos. Es por ello que se realizaron esta serie de experimentos con células aisladas, cuyo uso puede proporcionar información importante para esclarecer el problema. Los experimentos realizados para este trabajo se realizaron en presencia o no de epinefrina debido a que hay datos en la literatura en relación a que en animal íntegro, el etanol estimula la liberación de esta hormona (Maickel et al., 1963).

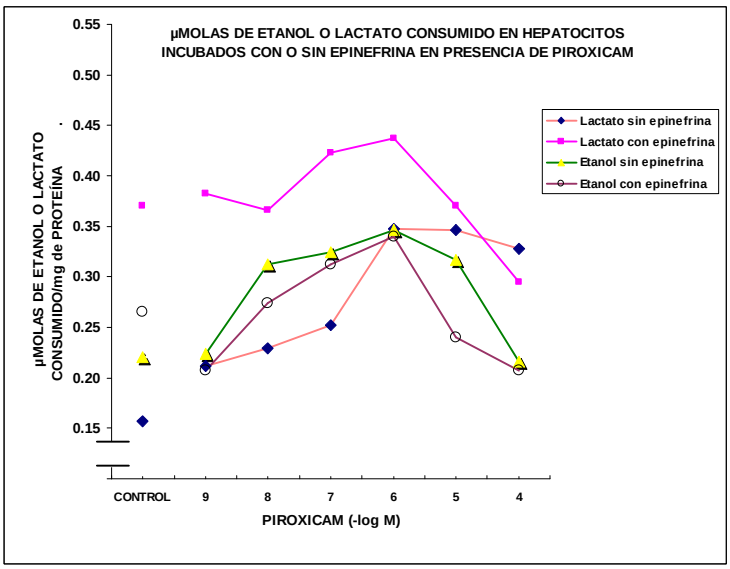
En el artículo se describen los detalles de las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos *in vitro* con hepatocitos aislados (grupo **C**), se tomó lo equivalente a 10-15 mg de proteína de células aisladas, se incubaron por una hora con etanol 50 mM, otros con lactato 50 mM, y ante cantidades crecientes de piroxicam ($1x10^{-9}$ a $1x10^{-4}$ M), en presencia o no de epinefrina ($1x10^{-6}$M).

Los datos obtenidos se presentaron en tres figuras gráficas en el artículo original (Figs. 1, 2 y 3). Dichas figuras se presentan aquí en nuevas gráficas que permiten una mejor visión panorámica en donde sólo se ve la tendencia de los efectos obtenidos con las moléculas empleadas, los datos de los errores estándar están en el artículo original. Así en función de la concentración de piroxicam se graficaron los cambios en relación al consumo de sustratos, a la poza de TAG y a la cantidad de TBARS producido respectivamente (Figs. 9, 10 y 11)

CONSUMO DE SUSTRATO. Los datos de la gráfica presentada en la Fig.1 del artículo se reacomodaron y se presentan en la Fig. 9 en donde se observa que los hepatocitos que consumieron más sustrato fueron los incubados con lactato y epinefrina, con concentraciones de piroxicam de $1x10^{-7}$, y$1x10^{-6}$ M los cuales tuvieron valores que fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos con las otras concentraciones de piroxicam utilizadas.

Los resultados presentados en la figura 9 muestran que el piroxicam, en general, estimula el consumo de etanol, más en ausencia de epinefrina que en su presencia; si bien, a la concentración de piroxicam donde ocurre el mayor consumo de etanol ($1x10^{-6}$ M), dicho consumo es igual en presencia o ausencia de la hormona.

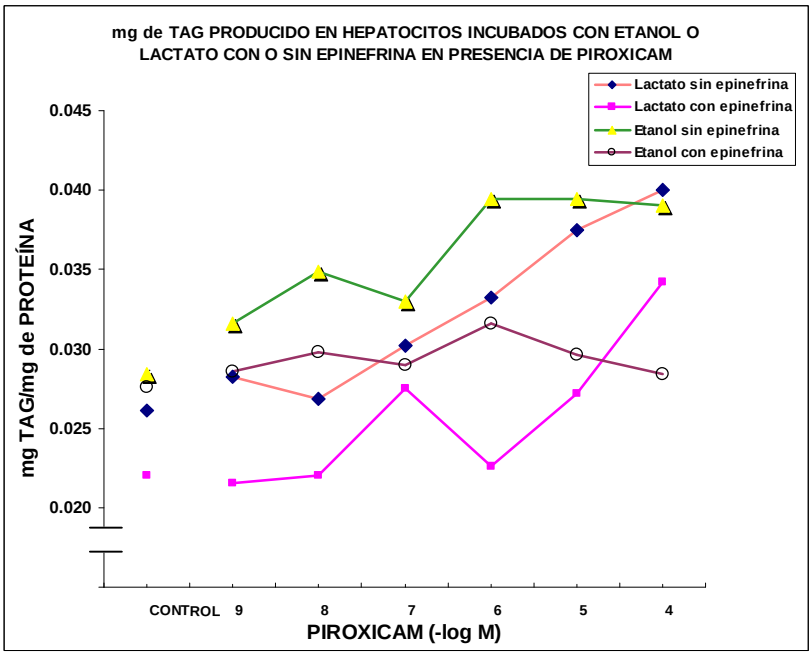
Fig. 9



CONTENIDO DE TRIACILGLICEROLES. Los hepatocitos que tuvieron mayor contenido de TAG fueron los incubados con etanol o lactato, sin epinefrina y a concentraciones altas de piroxicam ($1x10^{-4}$ a $1x10^{-6}$ M). Los hepatocitos que tuvieron una poza con menor contenido de TAG se incubaron con lactato en presencia de epinefrina y a concentraciones bajas de piroxicam ($1x10^{-8}$, y $1x10^{-9}$ M) (Fig. 10). En las células incubadas con etanol y sin epinefrina, el piroxicam muestra una tendencia a aumentar el contenido hepático de TAG, a medida que sube la concentración del AINE en el medio de incubación. Cuando a las células con etanol se añade epinefrina, el piroxicam no muestra ningún efecto. Estos datos contrastan con lo que se observa en el animal íntegro. La

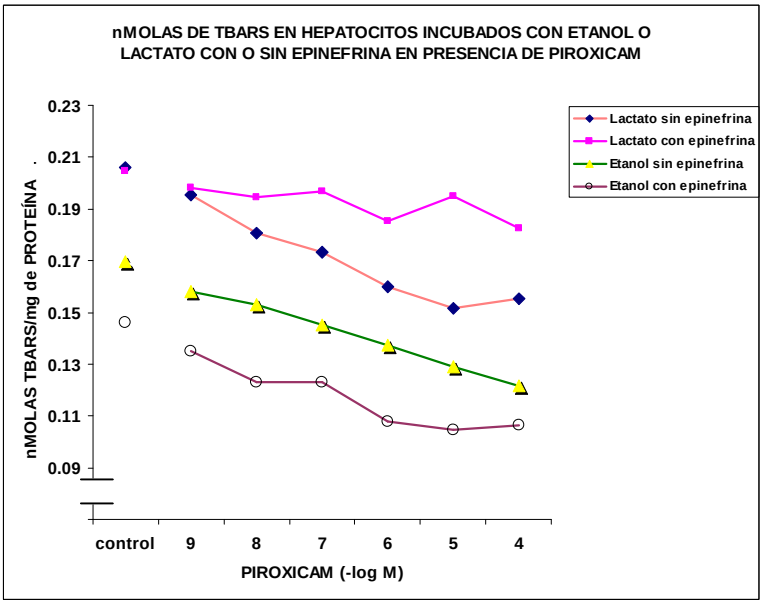
intoxicación con etanol eleva el contenido de TAG hepáticos y la adición de piroxicam ocasiona un retorno a los valores normales (Zentella, 1992, 1993).

Fig. 10



PRODUCCIÓN DE TBARS. La mayor cantidad de TBARS se produjo en los hepatocitos que fueron incubados con lactato ya sea con o sin epinefrina, este aumento fue inversamente proporcional a la cantidad de piroxicam añadido (fig.11). Por otro lado, la menor producción de TBARS por el efecto del piroxicam se observa en los hepatocitos que se incubaron con etanol con epinefrina y con una concentración de $1x10^{-5}$ M de piroxicam. La tendencia más importante en este trabajo es la disminución de los TBARS en función de la concentración de piroxicam usada en los medios de incubación (Fig. 11). El efecto es más claro cuando se usa etanol como sustrato.

Fig. 11



La comparación de los datos obtenidos con el piroxicam en relación con los efectos deletéreos del etanol en los 2 modelos usados, *in vivo* e *in vitro*, nos muestra similitudes y diferencias interesantes. Entre las similitudes se observa una actividad en la oxidación del etanol, más clara *in vivo* (Fig. 3 de Zentella et al., 1992) que *in vitro* (Fig. 9, concentración de piroxicam $1x10^{-6}$ M). Otra similitud de efectos, de interés para los objetivos de este trabajo, es la capacidad del piroxicam para abatir la producción de TBARS debidas a la presencia y oxidación del etanol, incluso también observada para el lactato en ausencia de epinefrina (Fig. 11). La diferencia más importante en los resultados, al comparar los dos modelos, es la relación con la poza de TAG que ya se hizo notar con antelación. Adicionalmente en el experimento llama la atención que la oxidación del lactato genere más TBARS que la del etanol (Fig. 11), tal como podría esperarse a partir de la abundante información sobre la capacidad del etanol para producir TBARS *in vivo* (Di Luzio y Stege 1977; Dianzani, 1985; Cederbaum, 1989; Comporti, 1978; Zentella, 1992, 1993, 1994b).

ELSEVIER

European Journal of Pharmacology 317 (1996) 225–229

ejp

Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes

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

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

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

Abstract

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

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

1. Introduction

Ethanol is the most extensively toxic compound consumed by humans (Williams et al., 1988; Multi-authorial, 1990). Ninety percent of people drink alcohol, 40–50% of men have temporary ethanol-induced problems, and 10% of men and 3–5% of women develop pervasive ethanol-related problems (alcoholism). Even light drinking may adversely interact with other medications and temporary heavier drinking can exacerbate most medical illnesses (Schuckit and Irwin, 1988). Acute ethanol intoxication is an unresolved therapeutic episode: means to ameliorate the temporary toxic actions of high doses of ethanol are absent in the medical armamentarium. Thus compounds with a potential protective effect against the acute metabolic actions of ethanol deserve additional study. Previous data from our laboratory (Zentella de Piña et al., 1992, 1993) have shown that some nonsteroidal anti-inflammatory drugs partially prevent the increase in liver triacylglycerides and thiobarbituric acid-reactive substances, the latter measured as an indication of cellular oxidative stress (Bondy and Pearson, 1993). Both substances are produced during acute intoxication of fasted rats with ethanol. In addition, one of the anti-inflammatory drugs tested, namely piroxicam, consistently produced a decrease in the levels of blood ethanol in comparison with those of control animals (Zentella de Piña et al., 1992). The aim of this work was to study the effect of piroxicam on the 3 studied indicators – triacylglycerides, thiobarbituric acid-reactive substances and ethanol consumption – in a simpler biological system, such as isolated rat liver cells, in order to facilitate the study of the actions of these nonsteroidal anti-inflammatory drugs, compounds which are extensively used in clinical medicine (Insel, 1990).

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

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

0014-2999/96/$15.00 Copyright © 1996 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

combined action of epinephrine and the anti-inflammatory compounds.

2. Materials and methods

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

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

3. Results

The consumption of lactate or ethanol by the isolated hepatocytes is presented in Fig. 1. As expected, in the absence of piroxicam, epinephrine stimulated the utilization of lactate ($P < 0.05$) but not ethanol in hepatocyte cells obtained from fasted rats. Piroxicam alone increased, in a dose-dependent fashion, the consumption of lactate, this increase being significant when the concentration of the anti-inflammatory drug reached 10^{-4} M ($P < 0.05$) and 10^{-3} M ($P < 0.01$), compared to the values recorded without piroxicam. Simultaneous addition of epinephrine and piroxicam resulted in an apparent mutual antagonism of the effects of the compounds. Individual values varied widely and the effect was not statistically significant. Similarly, piroxicam alone increased ethanol consumption; the response was dose-dependent from 10^{-5} M to 10^{-4} M ($P < 0.05$ for 10^{-4} M). The actions of the anti-inflammatory drug on ethanol utilization were the same in hepatocytes incubated in the presence of epinephrine, but the increase was not statistically significant (Fig. 1).

The content of triacylglycerides at the end of the 60-min incubation was similar in hepatocytes incubated with lactate or ethanol, with or without epinephrine (Fig. 2). Independent of the presence or absence of epinephrine, piroxicam produced a dose-dependent rise in the pool of triacylglycerides: the difference between the triacylglyceride content of cells incubated with lactate without piroxicam vs. that of cells incubated with 10^{-3} or 10^{-4} M piroxicam was significant at $P < 0.05$; for cells incubated with ethanol without piroxicam and those incubated with 10^{-4} M piroxicam the difference was significant at $P < 0.05$, with 10^{-3} M piroxicam the difference was significant ($P = 0.021$), and with 10^{-4} piroxicam the difference was significant also ($P = 0.014$). The differences in triacylglyceride content were significant by analysis of vari-

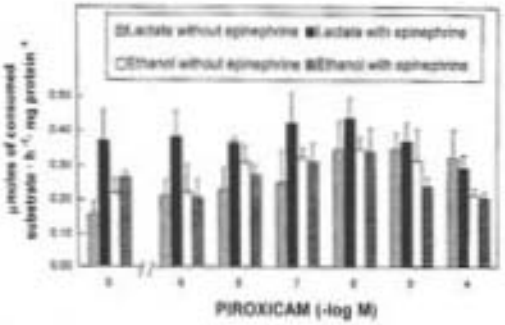


Fig. 1. Effect of piroxicam, in the absence or in the presence of 1×10^{-4} M epinephrine, on the consumption of lactate or ethanol by isolated hepatocytes. Isolated rat liver cells, equivalent to 10–15 mg of protein, were incubated under continuous shaking in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, supplemented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

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

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

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

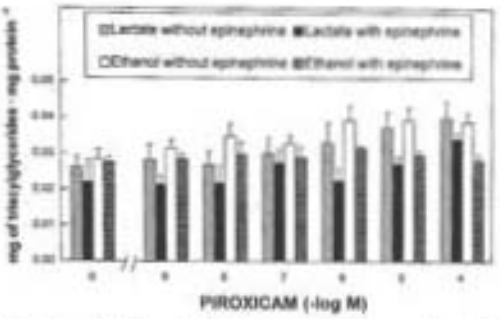


Fig. 2. Effect of piroxicam, in the absence or in the presence of 1×10^{-4} M epinephrine, on the pool of triacylglycerides in isolated hepatocytes incubated with lactate or ethanol. Experimental conditions and symbols are as described in Fig. 1.

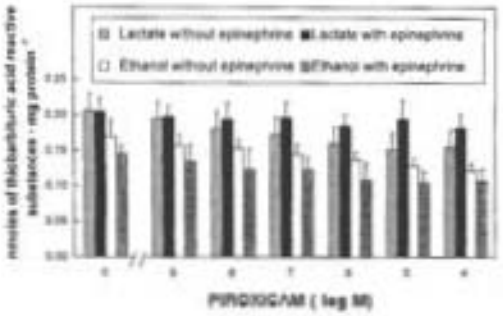


Fig. 3. Effect of piroxicam, in the absence or in the presence of 1×10^{-4} M epinephrine, on the content of thiobarbituric acid-reactive substances in isolated hepatocytes incubated with lactate or ethanol. Experimental conditions and symbols are as described in Fig. 1.

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

4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

References

Bernt, E. and I. Gutmann, 1974, Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD, in: Methods of Enzymatic Analysis, 2nd edn., ed. H.U. Bergmeyer (Verlag Chemie-Academic Press, New York, NY) p. 1399.

Berry, M.N. and D.S. Friend, 1969, High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study, J. Cell Biol. 43, 506.

Bondy, S.C. and K.R. Pearson, 1993, Ethanol induced oxidative stress and metabolic status, Alcohol. Clin. Exp. Res. 17, 651.

Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72, 248.

Brand, M.D. and M.P. Murphy, 1987, Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells, Biol. Rev. 62, 141.

Brodie, B.B. and R.P. Maickel, 1963, Role of the sympathetic nervous system in drug-induced fatty liver, Ann. NY Acad. Sci. 104, 1059.

Carlson, L.A., J. Ekberg and B. Hagstedt, 1965, Some physiological and clinical implications of lipid mobilization from adipose tissue, in: Handbook of Physiology-Adipose Tissue, eds. A.E. Renold and G.F. Cahill (American Physiological Society, Washington, DC) p. 643.

Di Luzio, N.R., 1963, Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants, Physiologist 6, 169.

Gottfried, S.P. and B. Rosenberg, 1973, Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triacylglycerides, Clin. Chem. 19, 1077.

Guinzberg, F.R., I. Lagana, A. Zentella, R. Guzmán and E. Piña, 1987,

Effect of adenosine and inosine on urea genesis in hepatocytes, Biochem. J. 245, 371.

Gutmann, I. and A.W. Wahlefeld, 1974, L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD, in: Methods of Enzymatic Analysis, 2nd edn., ed. H.V. Bergmeyer (Verlag Chemie-Academic Press, New York, NY) p. 1464.

Insel, P.A., 1990, Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents; drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout, in: Goodman and Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edn., eds. A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies and P. Taylor (Pergamon Press, New York, NY) p. 638.

Johnson, A.G., T.V. Nguyen and R.O. Day, 1994, Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis, Ann. Intern. Med. 121, 289.

Kaplan, H.B., H.S. Edelson, H.M. Korchak, W.P. Given, S. Abramson and G. Weissmann, 1984, Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on human neutrophil functions in vitro and in vivo, Biochem. Pharmacol. 33, 371.

Levy, K.J., 1976, A multiple range procedure for independent correlations, Educ. Psychol. Meas. 36, 27.

Meijer, A.J., G.M. Van Woerkom, J.R. Williamson and J.M. Tager, 1975, Rate-limiting factors in the oxidation of ethanol by isolated rat liver cells, Biochem. J. 150, 205.

Miranda, J.E., C. Jolley, H. Holubec, D. Earnest, I.G. Sipes and M.D. Ramírez-González, 1995, Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (AINES) on Kupffer cell function (Kc), Gac. Med. Mex. 131, 78.

Multi-authorial, 1990, Secretaría de Salud, Sistema Nacional de Encuestas de Salud, Encuesta Nacional de Adicciones, Alcohol, México, Secretaría de Salud.

Schuckit, M.A. and M. Irwin, 1988, Diagnosis of alcoholism, Med. Clin. N. Am. 72, 1133.

Williams, G.D., B.F. Grant, F.S. Stinson, T.S. Zobeck, S.S. Aitken and J. Noble, 1988, Trends in alcohol-related morbidity and mortality, Public Health Rep. 103, 592.

Wills, E.D., 1969, Lipid peroxide formation in microsomes. The role of non-haem iron, Biochem. J. 113, 325.

Zar, J.H., 1984a, Multisample hypotheses: the analysis of variance, in: Biostatistical Analysis, 2nd edn. (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ) p. 143.

Zar, J.H., 1984b, Multiple comparisons. The Tukey test, in: Biostatistical Analysis, 2nd edn. (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ) p. 186.

Zenteña de Piña, M., A Hernández-Tobías, Y. Saldaña-Balmori, A. Díaz-Reinoso and E. Piña, 1992, Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug, FEBS Lett. 298, 123.

Zenteña de Piña, M., Y. Saldaña-Balmori, A. Hernández-Tobías and E. Piña, 1993 Non-steroidal anti-inflammatory drugs lower ethanol mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances, Alcohol Clin. Exp. Res. 17, 1228.

5.- Riveros-Rosas H, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Saldaña-Balmori Y, Julián-Sánchez A, Saavedra-Molina A, Piña E. (1999). Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes. Eur J Pharmacol. 380(1):49-59.

Los datos presentados en el artículo anterior (Saldaña-Balmori *et al.,* 1996) exhiben un antagonismo en hepatocitos aislados entre la epinefrina y el piroxicam, en este trabajo se estudian algunas respuestas metabólicas de los hepatocitos incubados con ambos compuestos, la epinefrina y el piroxicam.

Por su parte la epinefrina estimula el consumo de lactato y etanol, estimula la liberación hepática de glucosa a partir de lactato pero no a partir del etanol, y no tiene efecto sobre el contenido celular de TAG. A su vez, y en forma dosis dependiente el piroxicam estimula el consumo de lactato y etanol, estimula el contenido de TAG y no cambia la liberación de glucosa de los hepatocitos. El antagonismo entre las acciones de la epinefrina y el piroxicam se observan en el caso de la estimulación en la liberación de glucosa hepática a partir del lactato que estimula la epinefrina y lo impide el piroxicam. Además la epinefrina bloquea la acción del piroxicam de aumentar el contenido de los TAG hepáticos a partir de lactato y etanol. Los resultados aquí resumidos constituyen el primer reporte de células aisladas sobre un antagonismo entre la epinefrina y el piroxicam.

Los AINEs en general, además de inhibir a la ciclooxigenasa, de bloquear la síntesis de prostaglandinas y con ello disminuir la inflamación, pueden, tener múltiples funciones entre otras, las relacionadas con los sistemas de transducción de señales (Abramson *et al*, 1990; Earnest *et al.*, 1992), inhibir el consumo de Ca^{2+} en neutrófilos (Abramson *et al*, 1985) e incrementar el nivel intracelular de AMPc (Weissmann *et al,* 1987).

ELSEVIER

European Journal of Pharmacology 380 (1999) 49–59

ejp

www.elsevier.nl/locate/ejphar

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

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

[a] *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. Postal 70159, Mexico, DF, 04510, Mexico*
[b] *Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, 58030, Mexico*

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

Abstract

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

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

1. Introduction

The nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) comprise one of the most employed therapeutic agents. In 1984, nearly one in seven Americans was treated with a NSAID (Clive and Stoff, 1984), and in 1986, 100 million prescriptions were written for these drugs (Langman, 1988). Their effectiveness to reduce prostaglandin-mediated fever, pain, and swelling, has been attributed to their ability to inhibit the cyclooxygenase, prostaglandin H synthase (Vane, 1971; Ferreira and Vane, 1974; Abramson et al., 1985). However, these drugs have a wide spectrum of biological effects, many of which are determined by other mechanism independent of cyclooxygenase inhibition (Weissmann et al., 1987; Abramson and Weissmann, 1989; Brooks and Day, 1991; Cronstein and Weissmann, 1995; Cashman, 1996). Among these, several reports pointed out modifications on the components of signal transductions systems, a property that may account for diverse effects on membrane-dependent processes. Thus, NSAIDs can modify membrane viscosity, uncoupling receptor signaling events that depend upon the state of membrane fluidity (Abramson et al., 1990); interfere with GTP/GDP exchange at the α-subunit of regulatory G protein (Abramson et al., 1991, 1994); block the pertussis toxin-dependent ADP-ribosylation of the G protein in purified neutrophil

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

0014-2999/99/$ - see front matter © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0014-2999(99)00521-X

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

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

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

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

It is noteworthy that in spite of the previous reports showing piroxicam effects on hepatic glucose metabolism (Dorronsoro de Cattoni and Battellino, 1992; Salgueiro-Pagadigorria et al., 1996a), the influence of this therapeutic agent on the hepatic metabolic responses to epinephrine has not been yet analyzed.

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

2. Materials and methods

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

Once isolated, liver cells, equivalent to 10–15 mg protein, were incubated for 60 min at 37°C with continuous shaking in Krebs-Ringer bicarbonate buffer: 120 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 12 mM $NaHCO_3$, 1.2 mM $CaCl_2$, adjusted to pH 7.4, in an atmosphere of O_2:CO_2 (95%:5%). The incubation media was supplemented with 50 mM sodium lactate pH 7.4, or 50 mM ethanol as substrates, in the absence or in the presence of epinephrine (10^{-6} M) and piroxicam (10^{-9}–10^{-4} M).

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

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

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

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

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

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

3. Results

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

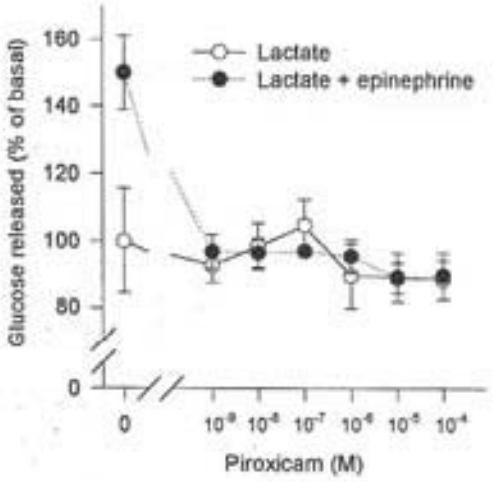


Fig. 1. Effect of different concentrations of piroxicam on glucose synthesis from lactate in rat hepatocytes incubated with 10^{-6} M epinephrine. The isolated cells were incubated as described in Section 2, using 50 mM sodium lactate (pH 7.4) as substrate; (●) in the presence of epinephrine and (○)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

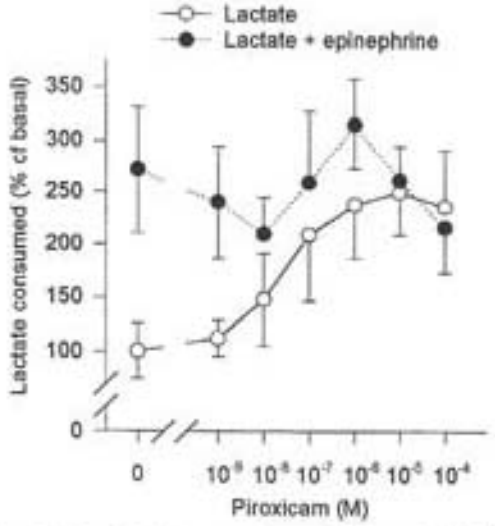


Fig. 2. Effect of different concentrations of piroxicam and 10^{-6} M epinephrine on lactate consumption in isolated rat hepatocytes. The cells were incubated 1 h as described in Section 2 with 50 mM sodium lactate as substrate; (●) in the presence of epinephrine and (○) in the absence of epinephrine.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

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

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

The exposure to piroxicam alone increases, on a dose-dependent basis, the content of triacylglycerides in isolated rat hepatocytes incubated for 60 min with 50 mM lactate (Fig. 3). The highest stimulation (51%) was observed in the presence of 10^{-4} M piroxicam, but the effect was statistically significant from 10^{-5} M piroxicam ($P < 0.05$). This finding agrees with previous results from our laboratory, with an in vivo system, where rats treated for 4 to 8 h with piroxicam (10 mg/kg body weight) exhibited a 15% to 25% increase in liver triacylglycerides content, but without statistical significance (Zentella de Piña et al., 1992).

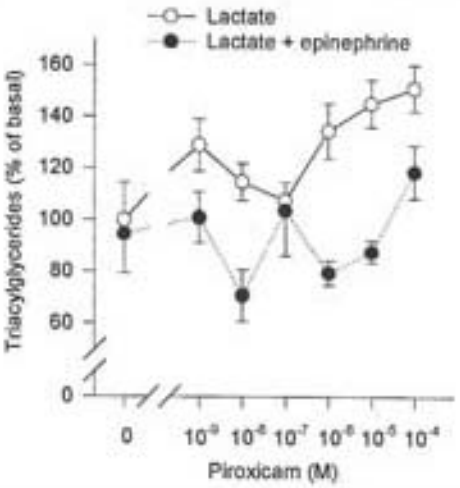


Fig. 3. Effect of different concentrations of piroxicam and 10^{-8} M epinephrine on triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. The cells were incubated 1 h as described in Section 2 using 50 mM sodium lactate as substrate; (●) in the presence of epinephrine and (○) in the absence of epinephrine. Each point represents the mean ± S.E.M. ($n = 5$–7). The basal triacylglycerides content after 1 h of incubation was 29.4 ± 4.3 μg triacylglycerides/mg of protein.

Otherwise, the triacylglycerides content of the isolated rat hepatocytes was not modified by 1-h incubation with 10^{-8} M epinephrine, using 50 mM lactate as substrate (Fig. 3). This result agrees with previous reports indicating that epinephrine does not affect cellular triacylglycerides content in liver (Brindle and Ontko, 1986). However, it can be observed that the piroxicam effect on triacylglycerides content was attenuated by epinephrine, showing again a mutual antagonism in the effect of both compounds.

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

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

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

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

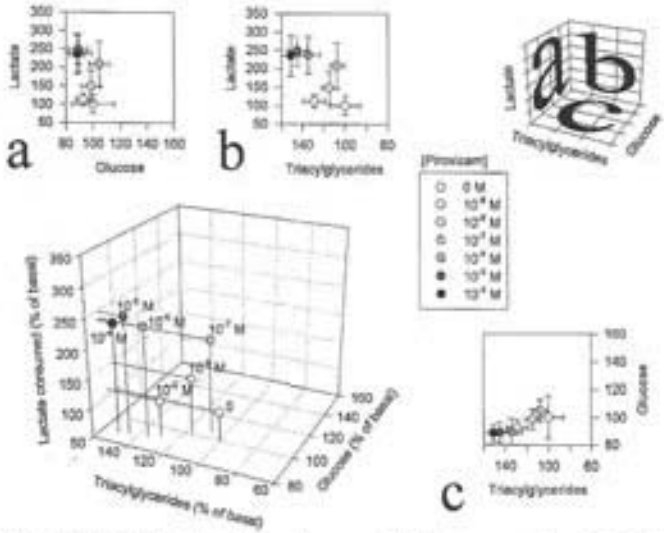


Fig. 4. Three-dimensional plot of (10^{-8}–10^{-4} M) piroxicam effect on glucose production, lactate consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. The inserted bidimensional plots (a–c) show lateral views of the three-dimensional plot. Each point represents the mean, with the S.E.M. bar showed in the bidimensional plots. A guide to read the bidimensional projections is included at the upper right. Piroxicam concentrations are shown with a gray scale: data without piroxicam are showed in white, and with piroxicam in different gray tones; the coordinates origin in the three-dimensional plot is located at the front in relation to the viewer. Figs. 4 and 5 maintain the same scales for easier comparisons.

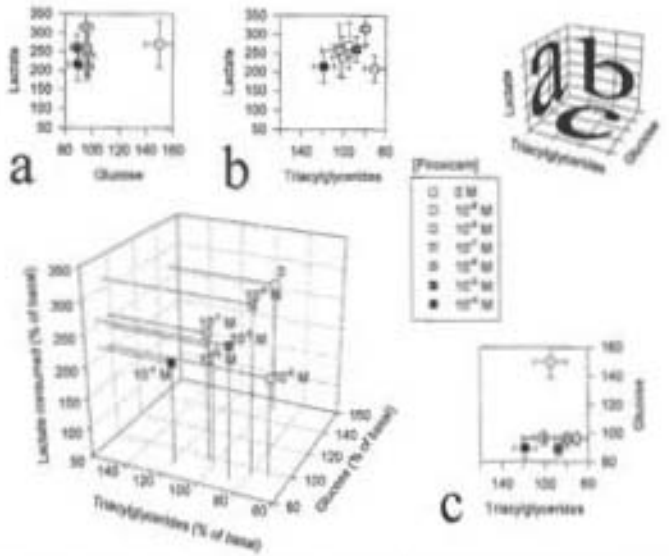


Fig. 5. Three-dimensional plot of 10^{-6} M epinephrine plus (10^{-9}–10^{-4} M) piroxicam effect on glucose release, lactate consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. The inserted bidimensional plots (a–c) show lateral views of the three-dimensional plot. Data are presented as in Fig. 4, and maintain the same scales for easier comparisons.

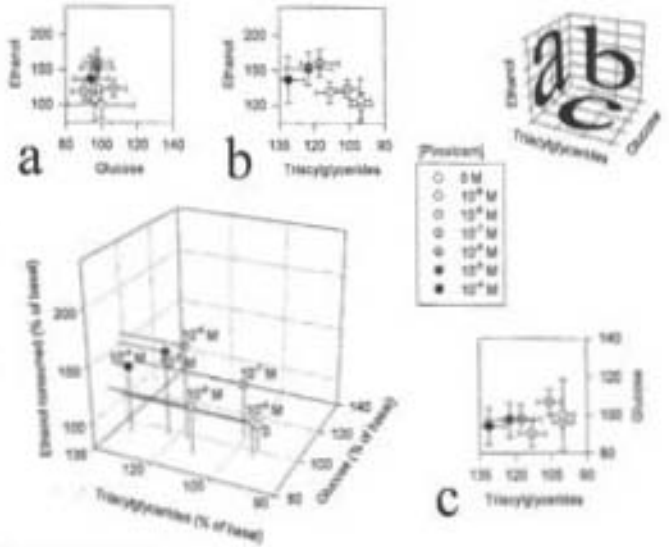


Fig. 6. Three-dimensional plot of (10^{-9}–10^{-4} M) piroxicam effect on glucose release, ethanol consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. Cells were incubated as described in Section 2 replacing lactate by 50 mM ethanol as substrate. The inserted bidimensional plots (a–c)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

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

$c = 328.5 \pm 49.6$ (percent triacylglycerides content)

and the obtained regression coefficient (r^2) is equal to 0.923 ($P < 0.01$).

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

On the other hand, the uptake of lactate is stimulated by epinephrine and it is used for glucose synthesis (see white square in Fig. 5); when piroxicam is added to this system with epinephrine, the uptake of lactate remains elevated but it is not channelled toward glucose synthesis (see gray squares in Fig. 5), neither toward triacylglycerides synthesis, since the stimulation in triacylglycerides content promoted by piroxicam is blocked by epinephrine; therefore, the stimulation of an alternative metabolic pathway must be considered. This last possibility is supported by the lost of correlation between triacylglycerides content, lactate consumption and glucose release observed with the simultaneous presence of epinephrine and piroxicam. Thus, the regression coefficient for fitting these last data to Eq. (1) is $r^2 = 0.07$, which strengthens the point that under the experimental conditions described, another metabolic fate of lactate should be enhanced, for instance, liver respiration. Furthermore, epinephrine promotes mitochondrial oxygen consumption coupled to ATP synthesis (Taylor et al., 1986; Breton et al., 1987; Korzeniewski and Froncisz, 1992; Garcia et al., 1997).

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

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

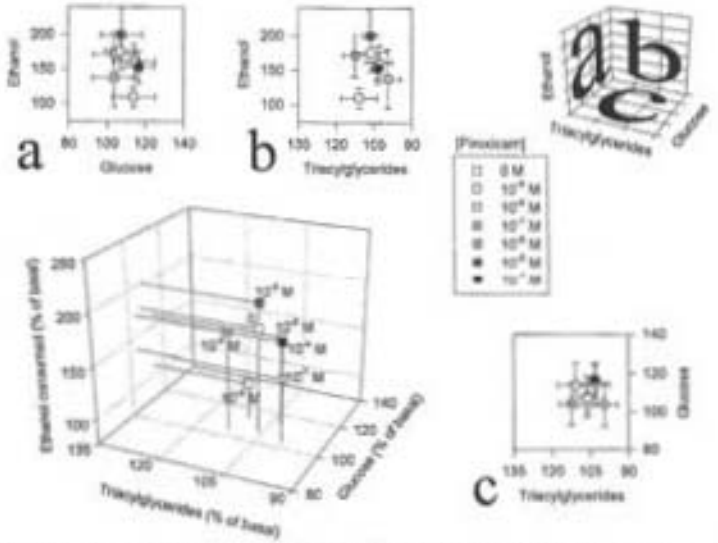


Fig. 7. Three-dimensional plot of 10^{-5} M epinephrine plus (10^{-5}–10^{-4} M) piroxicam effect on glucose release, ethanol consumption and triacylglycerides content in isolated rat hepatocytes. Cells were incubated as described in Section 2 replacing lactate by 30 mM ethanol as substrate. The inserted bidimensional plots (a–c) show lateral views of the three-dimensional plot. Data are presented as in Fig. 4. Figs. 6 and 7 maintain the same scales for easier comparisons.

$m_2 = -0.73 \pm 0.49$ (percent triacylglycerides content/percent glucose release)

$c = 124.1 \pm 50.7$ (percent triacylglycerides content)

and $r^2 = 0.838$ ($P < 0.02$)

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

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

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

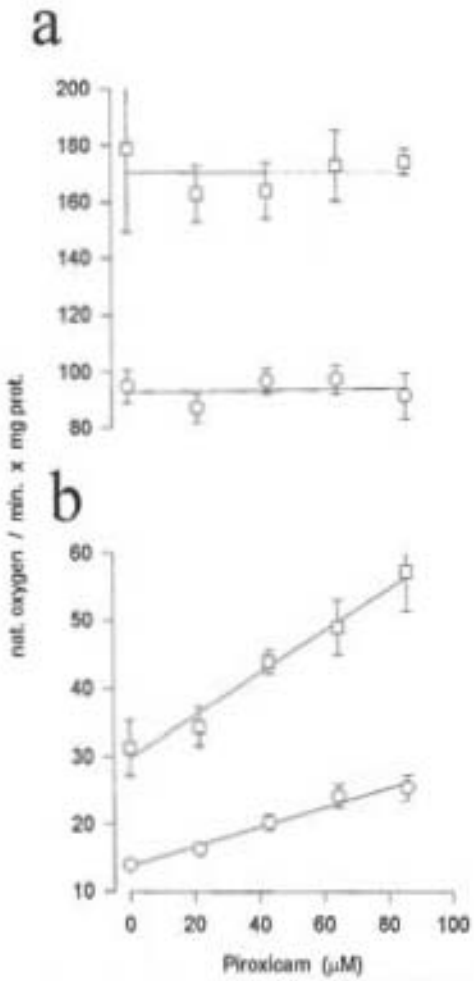


Fig. 8. Effect of piroxicam on oxygen consumption by isolated rat liver mitochondria. Mitochondria were isolated as described in Section 2. Mitochondria (2 mg protein) were added to an incubation mixture containing 260 mM mannitol, 3.3 mM phosphate-tris, 2.6 mM $MgCl_2$, 3.3 mM KCl, 0.44 mM EGTA, and 4.3 mM TES, pH 7.4; in addition, 6.6 mM succinate or 3.3 mM glutamate plus 3.3 mM malate, were added as substrates. Respiration was stimulated with 410 nmol ADP (state 3). (a) ADP-stimulated oxygen consumption (state 3) with succinate (□), or glutamate plus malate (○) as substrates. (b) Resting oxygen consumption (state 4) with succinate (□), or glutamate plus malate (○) as substrates. Each point represents the mean ± S.E.M. ($n = 4$).

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

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

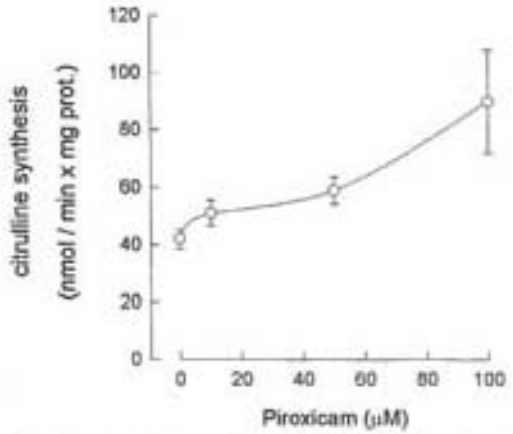


Fig. 9. Effect of piroxicam on citrulline synthesis in isolated rat liver mitochondria. Mitochondria (4.5 mg protein) were isolated as described in Section 2 and incubated with: 5 mM KH_2PO_4, 15 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 16 mM $KHCO_3$, 1 mM EDTA, 10 mM succinate, 10 mM L-ornithine, 10 mM NH_4Cl, 4 μg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

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

4. Discussion

In more integrated experimental models, other NSAIDs showed also an antagonism with the activation of metabolic pathways by catecholamines. Thus, indomethacin and salicylate decrease epinephrine- and glucagon-induced glycogenolysis in vivo (Wheeler and Epand, 1975; Ganguli et al., 1979; Miller et al., 1983, 1985), and naproxen inhibits glycogenolysis stimulated by norepinephrine in perfused rat liver (Nascimento et al., 1995). However, an explanation of this antagonism becomes particularly difficult in the in vivo experiments since NSAIDs modify the plasma levels of hormones, such as insulin, glucagon and epinephrine (Bybee et al., 1978; Metz and Robertson, 1980). Hence, the use of isolated hepatocytes seems to be the suitable model to explore, in deep, the antagonism of epinephrine and piroxicam. Such antagonism probably is unrelated to the ability of NSAIDs to inhibit prostaglandin synthesis because prostaglandins produce a similar effect: inhibit hepatic glucagon- and epinephrine-stimulated glycogenolysis in isolated rat hepatocytes (Wheeler and Epand, 1975; Brass and Garrity, 1985; Brass et al., 1987; Brass and Garrity, 1990; Okumura and Saito, 1990; Okumura et al., 1988a,b).

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

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

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

Acknowledgements

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

References

Abramson, S.B., Weissmann, G., 1989. The mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. Arthritis Rheum. 32, 1–9.

Abramson, S., Korchak, H., Ludwig, R., Edelson, H., Haines, K., Levin, R.I., Herman, R., Rider, L., Kimmel, S., Weissmann, G., 1985. Modes of action of aspirin-like drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 7227–7231.

Abramson, S.B., Cherksey, B., Gude, D., Leszczynska-Piziak, J., Philips, M.R., Blau, L., Weissmann, G., 1990. Nonsteroidal antiinflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. Studies in human neutrophils and liposomes. Inflammation 14, 11–30.

Abramson, S.B., Leszczynska-Piziak, J., Haines, K., Rediman, J., 1991. Non steroidal anti-inflammatory drugs. effects on a GTP binding protein within the neutrophil plasma membrane. Biochem. Pharmacol. 41, 1567–1573.

Abramson, S.B., Leszczynska-Piziak, J., Clancy, R.M., Philips, M., Weissmann, G., 1994. Inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs (NSAIDS): requirement for assembly of heterotrimeric G proteins in bilayer phospholipid. Biochem. Pharmacol. 47, 563–572.

American Academy of Family Physicians, 1997. Number of drugs mentioned in office visits to selected specialties by age of patient and the twenty most frequently named drugs: United States, 1992. http://www.aafp.org/family/facts/033.html, 14-4-1997.

Baños, G., Reyes, P.A., 1989. A comparative study of the effect of ten non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) upon some mitochondrial and platelet functions. Int. J. Biochem. 21, 1387–1394.

Bernt, E., Gutmann, I., 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD$^+$. In: Bergmeyer, H.V. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 3, 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, New York, pp. 1499–1502 (translated from the 3rd German edition).

Berry, M.N., Friend, D.S., 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J. Cell. Biol. 43, 506–520.

Bonsalski, J.S., Hirata, F., Clark, M.A., 1986. Aspirin inhibits phospholipase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 139, 113–121.

Boyde, T.R.C., Rahemtulla, M., 1980. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline using diacetyl monoxime. Anal. Biochem. 107, 424–431.

Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Brass, E.P., Garrity, M.J., 1985. Effect of E-series prostaglandins on cyclic AMP-dependent and -independent hormone-stimulated glycogenolysis in hepatocytes. Diabetes 34, 291–294.

Brass, E.P., Garrity, M.J., 1990. Structural specificity for prostaglandin effects on hepatocyte glycogenolysis. Biochem. J. 267, 59–62.

Brass, E.P., Alford, C.E., Garrity, M.J., 1987. Inhibition of glucagon-stimulated cAMP accumulation and fatty acid oxidation by E-series prostaglandins in isolated rat hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta 930, 122–126.

Bremer, J., Osmundsen, H., 1984. Fatty acid oxidation and its regulation. In: Numa, S. (Ed.), New Comprehensive Biochemistry, Vol. 7: Fatty Acid Metabolism and Its Regulation. Elsevier, Amsterdam, pp. 113–154 (Neuberger, A., van Deenen, L.L.M. — Series Eds.).

Breton, L., Clot, J.P., Bouriannes, J., Baudry, M., 1987. L'adrenaline active les phosphorylations oxydatives des mitochondries hepatiques de rat par la mise en jeu des recepteurs alpha 1. C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil. 181, 242–248.

Brindle, N.P., Ontko, J.A., 1986. Suppression of triglyceride secretion by epinephrine in isolated rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 191–197.

Brindley, D.N., 1988. What factors control hepatic triacylglycerol accumulation in alcohol abuse?. Biochem. Soc. Trans. 16, 251–253.

Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M., Avery, G.S., 1984. Piroxicam. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy. Drugs 28, 292–323.

Brooks, P.M., Day, R.O., 1991. Nonsteroidal antiinflammatory drugs — differences and similarities. N. Engl. J. Med. 324, 1716–1725.

Bybee, D.E., Broadie, T.R., Georges, K.P., Fletcher, J.R., Diaz, M.J., O'Brien, J.T., 1978. Indomethacin induced augmentation of insulin and glucagon release (Abstract). Diabetes 27, 157.

Cashman, J.N., 1996. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. Drugs 52, 13–23, Suppl. 5.

Chambers, J.P., Waterman, A.E., Livingston, A., 1995. The effects of opioid and α_2 adrenergic blockade on non-steroidal anti-inflammatory drug analgesia in sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 18, 161–166.

Clive, D.M., Stoff, J.S., 1984. Renal syndromes associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. N. Engl. J. Med. 310, 563–572.

Cervera, S., García-Sáinz, J.A., 1982. Vasopressin and angiotensin II stimulate ureogenesis through increased mitochondrial citrulline production. Life Sci. 31, 2493–2498.

Crunkhorn, B.N., Weissmann, G., 1995. Targets for antiinflammatory drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35, 449–462.

Daniell, H.B., Webb, J.G., Wallis, T., Oates, J.E., Gaffney, T.E., 1988. Inhibitors of prostaglandin synthesis reverse the effects of chronic beta-receptor blockade to attenuate adrenergic neurovascular transmission in dogs. J. Cardiovasc. Pharmacol. 12, 300–307.

De Leeuw, P., 1996. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hypertension: the risks in perspective. Drugs 51, 179–187.

Dorrronzoro de Cattoni, S., Battellino, L.J., 1992. Hepatic glycogen depletion in fed female rats induced by piroxicam. Acta Physiol., Pharmacol. Ther. Latinoam. 42, 13–26.

Durao, V., Pinto, M.M., Gonsalves, L.M.P., 1977. Modification of antihypertensive effect of beta-adrenoceptor-blocking agents by inhibition of endogenous prostaglandin synthesis. Lancet 2, 1005–1007.

Earnest, D.L., Hixson, L.J., Alberts, D.S., 1992. Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: potential for cancer chemoprevention. J. Cell. Biochem. Suppl. 161, 156–166.

Ebel, D.L., Rhyner, A.R., Stohl, E., Tipping, R., 1986. Effect of Clinoril (sulindac, MSD), piroxicam and placebo on the hypotensive effect of propranolol in patients with mild to moderate essential hypertension. Scand. J. Rheumatol. Suppl. 62, 41–48.

Fales, F.W., 1963. Glucose (enzymatic). Stand. Methods Clin. Chem. 4, 101–112.

Ferreira, S.H., Vane, J.R., 1974. New aspects of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Annu. Rev. Pharmacol. 14, 57–73.

Frantz, B., O'Neill, E.A., 1995. The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. Science 270, 2017–2019.

Frölich, J.C., 1997. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. Trends Pharmacol. Sci. 18, 30–34.

Gangoli, S., Sperling, M.A., Freese, C., Christensen, R., 1979. Inhibition of glucagon-induced hepatic glucose production by indomethacin. Am. J. Physiol. 236, E318–E365.

García, M.V., Hernandez-Bercianos, R., Lopez-Medavilla, C., Orfao, A., Medina, J.M., 1997. cAMP and Ca^{2+} involvement in the mitochondrial response of cultured fetal rat hepatocytes to adrenaline. Exp. Cell Res. 237, 405–409.

Gonzalez-Manchon, C., San, J.M., Ayuso, M.S., Parrilla, R., 1988. Characterization of the alpha-adrenergic stimulation of hepatic respiration. Arch. Biochem. Biophys. 265, 258–266.

Gottfried, S.P., Rosenberg, B., 1973. Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triglycerides. Clin. Chem. 19, 1077–1078.

Guinzberg, R., Laguna, I., Zenalla, A., Guzman, R., Pina, E., 1987. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. Biochem. J. 245, 371–374.

Gutmann, I., Wahlefeld, A.W., 1974. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD$^+$. In: Bergmeyer, H.V. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 3, 2nd edn. Verlag Chemie Wein-

heim/Academic Press, New York, pp. 1464–1468 (translated from the 3rd German edition).
Halestrap, A.P., 1989. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. Biochim. Biophys. Acta 973, 355–382.
Halestrap, A.P., Quinlan, P.T., Armston, E., Whipps, D.E., 1985. Mechanisms involved in hormone signal transduction across the mitochondrial membrane. Biochem. Soc. Trans. 13, 659–663.
Jandel Scientific, 1994. SigmaStat for Windows Ver. 1.0, Statistical Software: User's Manual. Jandel, San Rafael, CA, USA.
Johnson, A.G., Nguyen, T.V., Day, R.O., 1994. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. Ann. Intern. Med. 121, 289–300.
Kankaanranta, H., Lauttala, M., Kinnunen, O., Moilanen, E., 1996. Inhibition by fenamates of calcium influx and proliferation of human lymphocytes. Br. J. Pharmacol. 119, 487–494.
Korzeniewski, B., Froncisz, W., 1992. Theoretical studies on the control of the oxidative phosphorylation system. Biochim. Biophys. Acta 1102, 67–75.
Krebs, H.A., Freedland, R.A., Hems, R., Stubbs, M., 1969. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. Biochem. J. 112, 117–124.
Langman, M.J., 1988. Ulcer complications and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am. J. Med. 84, 15–19.
McDougall, P., Markham, A., Cameron, I., Sweetman, A.J., 1983. The mechanism of inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by the non-steroidal anti-inflammatory agent diflunisal. Biochem. Pharmacol. 32, 2595–2598.
Metz, S.A., Robertson, R.P., 1980. Prostaglandin synthesis inhibitors reverse α-adrenergic inhibition of acute insulin response to glucose. Am. J. Physiol. 239, E490–E500.
Miller, J.D., Ganguli, S., Sperling, M.A., 1983. Prostaglandin synthesis inhibitors impair hepatic glucose production in response to glucagon and epinephrine stimulation. Diabetes 32, 439–444.
Miller, J.D., Ganguli, S., Artal, R., Sperling, M.A., 1985. Indomethacin and salicylate decrease epinephrine-induced glycogenolysis. Metabolism 34, 148–153.
Minguito, F.E., Santos, A.C., Uyemura, S.A., Jordani, M.C., Curti, C., 1996. In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 334, 303–308.
Nascimento, E.A., Yamamoto, N.S., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., 1995. Naproxen inhibits hepatic glycogenolysis induced by Ca(2+)-dependent agents. Gen. Pharmacol. 26, 211–218.
Okumura, T., Saito, K., 1990. Effect of prostaglandins on glycogenesis and glycogenolysis in primary cultures of rat hepatocytes — a role of prostaglandin D2 in the liver. Prostaglandins 39, 525–540.
Okumura, T., Sago, T., Saito, K., 1988a. Pertussis toxin blocks an inhibition of hormone-stimulated glycogenolysis by prostaglandin E2 and its analogue in cultured hepatocytes. Prostaglandins 36, 463–475.
Okumura, T., Sago, T., Saito, K., 1988b. Effect of prostaglandins and their analogues on hormone-stimulated glycogenolysis in primary cultures of rat hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta 958, 179–187.
Petrescu, I., Tarba, C., 1997. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. Biochim. Biophys. Acta 1318, 385–394.
Pilbeam, C.C., Fall, P.M., Alander, C.B., Raisz, L.G., 1997. Differential effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultured bone cells. J. Bone Miner. Res. 12, 1198–1203.
Pilkis, S.J., Granner, D.K., 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu. Rev. Physiol. 54, 885–909.
Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., 1988. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu. Rev. Biochem. 57, 755–783.
Pimentel-Velazquez, L., Ramirez-Gonzalez, M.D., Zentella de Piña, M., Piña, E., 1996. Piroxicam inhibits epinephrine-induced stimulation of glycerol production in isolated rat adipocytes. Proc. West. Pharmacol. Soc. 39, 31–32.
Quinlan, P.T., Halestrap, A.P., 1986. The mechanism of the hormonal activation of respiration in isolated hepatocytes and its importance in the regulation of gluconeogenesis. Biochem. J. 236, 789–800.
Radack, K., Deck, C., 1987. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with blood pressure control in hypertensive patients?. J. Gen. Intern. Med. 2, 108–112.
Rajman, L., Jones, M.E., 1976. Purification, composition and some properties of rat liver carbamyl phosphate synthetase (ammonia). Arch. Biochem. Biophys. 175, 270–278.
Raisz, L.G., Simmons, H.A., Fall, P.M., 1989. Biphasic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandin production by cultured rat calvariae. Prostaglandins 37, 559–565.
Reichert, P.H., Taylor, W.M., Bygrave, F.L., 1982. Studies on alpha-adrenergic-induced respiration and glycogenolysis in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 257, 1906–1912.
Riendeau, D., Charleson, S., Cromlish, W., Mancini, J.A., Wong, E., Guay, J., 1997. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. Can. J. Physiol. Pharmacol. 75, 1088–1095.
Rey, H.K., Bissonnette, M., Frawley, B.P.J., Wali, R.K., Nimbriela, S.M., Earnest, D., Brasitus, T.A., 1995. Selective preservation of protein kinase C-zeta in the chemoprevention of azoxymethane-induced colonic tumors by piroxicam. FEBS Lett. 366, 143–145.
Ragnhd, H.E., 1986. The Norway study: plasma concentrations, efficacy, and adverse events. Am. J. Med. 81, 11–14.
Sacca, L., Vigorito, C., Cicala, M., Corso, G., Sherwin, R.S., 1983. Role of gluconeogenesis in epinephrine-stimulated hepatic glucose production in humans. Am. J. Physiol. 245, E294–E302.
Saldaña-Balmori, Y., Zentella de Piña, M., Guinzberg, R., Rocha-Hernandez, A., Piña, E., 1996. Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. Eur. J. Pharmacol. 317, 225–229.
Salguero-Pagadigorria, C.L., Constantin, J., Bracht, A., Nascimento, E.A., Ishii-Iwamoto, E.L., 1996a. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam on energy metabolism in the perfused rat liver. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 113, 93–98.
Salguero-Pagadigorria, C.L., Kelmer-Bracht, A.M., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., 1996b. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam on rat liver mitochondria. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 113, 85–91.
Schneider, W.C., Hogeboom, G.H., 1950. Intracellular distribution of enzymes: V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenate. J. Biol. Chem. 183, 123–128.
Siess, E.A., 1983. Influence of isolation media on the preservation of mitochondrial functions. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 364, 279–290.
Spence, J.D., 1986. The arthritic patient with hypertension: selection of an NSAID. Scand. J. Rheumatol. Suppl. 62, 36–40.
Sugano, T., Shiota, M., Tanaka, T., Miyamae, Y., Shimada, M., Oshima, N., 1990. Intracellular redox state and stimulation of gluconeogenesis by glucagon and norepinephrine in the perfused rat liver. J. Biochem. (Tokyo) 87, 153–166.
Taylor, W.M., Van de Pol, E., Bygrave, F.L., 1986. On the stimulation of respiration by alpha-adrenergic agonists in perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 155, 319–322.
Tokeshita, Y., Lee, S., Ui, M., 1977. In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol. 26, 2101–2106.
Van den Berg, G., Noorts, W.T., 1978. Effects of anti-inflammatory 2-aryl-1,3-indandiones on oxidative phosphorylations in rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol. 24, 819–821.
Vane, J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature 231, 232–235.
Vaughan, C.W., 1998. Enhancement of opioid inhibition of GABAergic

synaptic transmission by cyclo-oxygenase inhibitors in rat periaqueductal grey neurones. Br. J. Pharmacol. 123, 1479–1481.

Watkins, J., Abbott, E.C., Hensby, C.N., 1980. Attenuation of the hypotensive effect of propranolol and thiazide diuretics by indomethacin. Br. Med. J. 281, 702–705.

Weissmann, G., Korchak, H., Ludewig, R., Edelson, H., Haines, K., Levin, R.I., Herman, R., Rider, L., Kimmel, S., Abramson, S., 1987. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: how do they work?. Eur. J. Rheumatol. Inflammation 8, 6–17.

Wheeler, G.E., Epand, R.M., 1975. Prostaglandin E_2: anomalous effects on glucose production in rat liver. Mol. Pharmacol. 11, 335–339.

Wong, D.G., Spence, J.D., Lamki, L., Freeman, D., McDonald, J.W., 1986. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on control of hypertension by beta-blockers and diuretics. Lancet 1, 997–1001.

Yang, L.Y., Kuksis, A., Myher, J.J., Steiner, G., 1996. Contribution of de novo fatty acid synthesis to very low density lipoprotein triacylglycerols: evidence from mass isotopomer distribution analysis of fatty acids synthesized from [2H6]ethanol. J. Lipid Res. 37, 262–274.

Yu, B.Y., Cronholm, T., 1997. Coupling of ethanol metabolism to lipid biosynthesis: labelling of the glycerol moieties of *sn*-glycerol-3-phosphate, a phosphatidic acid and a phosphatidylcholine in liver of rats given [1,1-2H2]ethanol. Biochim. Biophys. Acta 1344, 165–170.

Zentella de Piña, M., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., Riveron-Rosas, H., Piña, E., 1989. Effects of moderate chronic ethanol consumption on rat liver mitochondrial functions. Alcohol 6, 3–7.

Zentella de Piña, M., Hernandez-Tobias, A., Saldaña-Balmori, Y., Diaz-Belmont, A., Piña, E., 1992. Biochemical ethanol effects afflicted by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Lett. 298, 123–125.

10. DISCUSIÓN

El manejo medicamentoso de la intoxicación humana con etanol continúa siendo un reto para los médicos y los investigadores en el área de la salud. Desde luego que la prevención es la indicación más acertada, pero ya una vez que el individuo se ha intoxicado con las bebidas alcohólicas, es fundamental buscar alternativas de tratamiento. Por lo tanto, existe un continuado interés de ensayar distintos tratamientos y diferentes medicamentos para la mejoría de los pacientes intoxicados de manera aguda con etanol. En este gran marco en el que se ubica el propósito de esta tesis.

Existían tres motivos por los cuales se inició, a principios de la década de los 90, el estudio de los AINEs para tratar de paliar las acciones tóxicas del etanol en el tejido hepático. El primer motivo es la acción anti-inflamatoria de este grupo de compuestos, que actuarían ante la inflamación hepática ocasionada por el etanol *per se* y por un conjunto de efectos colaterales consecuentes a la afectación de otros tejidos por la presencia del etanol en el organismo. El segundo motivo fue un hallazgo clínico fortuito: la administración crónica de piroxicam a un paciente de artritis reumatoide y alcoholismo, reveló una mejoría en su cuadro de alcoholismo con el tratamiento del AINE en cuestión (Díaz-Belmont y Escotto, 1987). El tercer motivo fue la mejoría que se observó en animales de laboratorio intoxicados con CCl_4 cuando se les administró piroxicam (Díaz-Belmont *et al*., 1990).

Por no ser el tema principal de la tesis, en la misma está ausente la vasta información existente de los AINEs en general, y de la aspirina en particular, sobre la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (Vane, 1971; Famaey, 1997). La idea general es que como consecuencia de la inhibición de las ciclooxigenasas por los AINEs se impide la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, los cuales promueven el proceso inflamatorio. En esta tesis se le da mayor prioridad a la acción tóxica que ocasiona el etanol en el hígado, a través de la generación de ERO –que inducen la lipoperoxidación y son medidas como TBARS– y a las acciones deletéreas promovidas por ese exceso de las ERO. También se incluye el estudio del depósito excesivo de TAG en el hígado debido a la intoxicación alcohólica. Este indicador se incluyó porque al coincidir en la célula hepática una elevación de ambas entidades químicas se aumentará la posibilidad de que las ERO

actúen sobre los TAG, y debido a la naturaleza química multiplicadora del proceso de lipoperoxidación, la lesión hepática se amplifique.

En general, se obtuvieron resultados más satisfactorios con el uso de los AINEs frente a la intoxicación alcohólica con el modelo *in vivo*. En dicho modelo y como era de esperarse por la información disponible en la literatura internacional, el etanol produjo un aumento en los niveles sanguíneos de etanol, un aumento en los niveles de TBARS en el hígado como indicadores de la poza de ERO, un aumento en los valores hepáticos de TAG (Zentella de Piña *et al*., 1992, 1993, 1994b; Pérez-Tapia *et al*., 1996) y una disminución en el contenido de glutatión total y en particular en la forma reducida de glutatión (Zentella de Piña *et al*., 1994b). Uno de los resultados contundentes en esta tesis es que la administración de los 5 AINEs empleados en estos trabajos, modificaron favorablemente los indicadores de la lesión tóxica promovida por la intoxicación alcohólica.

Los resultados relativos a la cifra de etanol en la sangre son los únicos que no fueron uniformes con el uso de los AINEs empleados. Mientras que con aspirina y el piroxicam disminuyen la cantidad de etanol en sangre, con naproxén sólo a las 8 horas hubo unos valores altos de etanol, con nimesulide la cantidad de etanol en sangre se mantuvo alta de 4 a 8 horas de tratamiento y disminuyó importantemente a las 12. Finalmente, la dipirona elevó los niveles de etanol a las 4 y 8 horas a valores más altos que ninguno de los AINEs estudiados (Zentella de Piña *et al*., 1992, 1993). La interpretación que se le dio al hecho de que con aspirina y piroxicam bajen más, y más rápido los niveles sanguíneos de etanol (Zentella de Piña *et al*., 1992, 1993) es que estos AINEs fueron capaces de acelerar la oxidación del etanol. Existen datos previos de las limitaciones que existen en el hígado para explicar el por qué de la oxidación del etanol en los mamíferos es un proceso lento (Riveros-Rosas *et al*., 1997). En consecuencia, el hallazgo de una aceleración en la oxidación del etanol tiene importancia intrínseca para entender mejor el catabolismo de una molécula que no puede ser considerada un nutrimento normal. Además, si se logra una desaparición más rápida del etanol en el organismo, puede argüirse que ése puede ser el motivo suficiente para explicar un menor efecto tóxico del etanol. El estudio de las modificaciones en la velocidad de oxidación del etanol en el hígado de la rata y en preparaciones semi-purificadas de la deshidrogenada alcohólica por la acción de los AINEs es una de las líneas de trabajo que se generaron como consecuencia de nuestra

observación original. Por otra parte, las modificaciones que promueven los distintos AINEs en los niveles de etanol en sangre, y por ende en su velocidad de oxidación, que como se acaba de mencionar son distintas, no ayudan a explicar el mecanismo por el cual todos los AINEs estudiados cambian los otros indicadores de toxicidad. En otras palabras, los niveles de etanol en sangre no parecen determinantes, ni están directamente asociados a las acciones benéficas de los AINEs frente al efecto tóxico del etanol en el hígado de los animales intoxicados. Los cinco AINEs estudiados revierten de manera estadísticamente significativa los valores elevados de TAG y TBARS ocasionados por la intoxicación alcohólica. Ahora bien, en relación con las cifras y estudios sobre el glutatión, el único AINE probado fue el piroxicam y este AINE revierte las disminuciones en glutatión total y GSH que ocasiona el etanol en las ratas. Estudios más recientes han mostrado que el principal motivo por el que el etanol disminuye el glutatión en el hígado es por que activa su eflujo hacia la sangre y el piroxicam previene completamente dicho aumento en el eflujo (Hernández Vázquez, 2009).

Este conjunto de datos presentados por todos los AINEs estudiados, que revierten al menos 3 indicadores de toxicidad hepática ocasionada por la ingesta de etanol, son suficientes para sugerir la recomendación de tratar a los enfermos agudamente intoxicados con bebidas alcohólicas, con el uso racional y dosis terapéuticas elevadas de algunos AINEs. Es obvio que no puede recomendarse la prescripción de ningún AINE si el paciente tiene contraindicaciones precisas para recibirlos. Es más, probablemente los efectos de al menos un AINE, el piroxicam, pueda recomendarse para paliar las acciones de otros tóxicos hepáticos como el CCl_4 (Zentella de Piña *et al*., 1997) e incluso en cualquier tipo de intoxicación hepática. Nótese además, que los efectos benéficos del piroxicam ante la intoxicación etílica no se limitan al hígado, sino que se extienden a otros tejidos como el sistema nervioso, tal como se muestra en una más de nuestras publicaciones (Pérez-Tapia *et al*., 1996).

Aún se carece de información suficiente en cuanto al o los mecanismos moleculares de que se valen los AINEs para revertir los efectos tóxicos causados por el etanol en el hígado. Los resultados de los experimentos *in vitro* en donde un sistema menos complejo solo integrado por células de la glándula hepática y el medio en el cual se incubaron, en comparación con el organismo completo, hicieron posible obtener resultados en algunos

de esos mecanismos moleculares y abrieron caminos para continuar avanzando. Un problema aún mal resuelto en los experimentos con hepatocitos aislados es la selección adecuada de un sustrato oxidable control. Si los hepatocitos experimentales se incuban con una concentración de etanol de 50 mM ¿qué deben contener como sustrato las células controles contra las cuales se harían las comparaciones? Nótese que las condiciones y concentraciones de los dos lotes deberían de mantenerse iguales y solo en uno de ellos debería de existir el etanol como sustrato oxidable. Sin embargo al incluir 50 mM de etanol en un grupo de células se modificaría la osmolaridad (300 miliosmoles de sales más 50 miliosmoles de etanol), la cantidad de energía que se liberaría con la oxidación del etanol sería 29.22 kjoules/gramo de etanol, y por último la presencia del sustrato llamado etanol. ¿Qué se tiene que añadir en la muestra control para mantener la osmolaridad y las calorías iguales a las de la muestra con etanol, y solo entonces, el otro sustrato diferente al etanol?

Finalmente se decidió usar 50 mM de lactato en las muestras control. Vale la pena hacer notar que con ello no se logró el objetivo deseado, la osmolaridad fue un poco mayor en la muestra conteniendo lactato debido a la cantidad de sodio que hubo de añadirse a la muestra con lactato con el fin de mantener el pH de 7.4, además de que la concentración del Na^+ fue mayor en aquellas muestras en donde se añadió. Por otra parte la disponibilidad de energía fue también un 20% mayor para las muestras con lactato que para las que contenían etanol. La principal ventaja del lactato en comparación con otros posibles sustratos (por ejemplo la glucosa o el glicerol) es que el metabolismo del lactato, al igual que el del etanol, se inicia con una oxidación inmediata, catalizada por deshidrogenasas con idénticos cofactores, mientras que la oxidación de glucosa o glicerol requieren de una fosforilación inicial catalizada por cinasas dependientes de ATP. Parece importante hacer notar los retos tenidos con el sustrato oxidante sustituto del etanol, puesto que, como se hace notar a continuación se tienen algunos resultados cuya interpretación se dificulta.

En los hepatocitos aislados el consumo de lactato fue sistemáticamente mayor que el consumo de etanol (Fig. 1 en el artículo 4 y Figs. 4-7 en el artículo 5). Además la epinefrina añadida a los hepatocitos aislados estimuló el consumo de lactato más que el de etanol (Fig. 1 en el artículo 4 y Figs. 5 en el artículo 5). Se estimuló también la

liberación de glucosa a partir de lactato pero no de etanol (Figs. 5 y 7 en el artículo 5) y no tuvo efecto sobre el contenido de TAG (Fig. 2 en el artículo 4 y Figs. 5 y 7 en el artículo 5). Por su parte el piroxicam, en los mismos hepatocitos aislados, estimuló el consumo de lactato y etanol (Fig. 1 en el artículo 4 y Figs. 4 y 6 en el artículo 5), aumentó la poza de TAG a partir de lactato y etanol (Fig. 1 en artículo 4 y Figs. 4 y 6 en el artículo 5) y no modificó la liberación de glucosa por el hígado ni con lactato ni con etanol (Figs. 4 y 6 en el artículo 5). Al incluir epinefrina y piroxicam en el medio de incubación de los hepatocitos, el piroxicam bloqueó la estimulación de la liberación de glucosa promovida por la epinefrina (Fig. 5 en el artículo 5). Por su lado la epinefrina bloqueó el aumento en la poza de TAG promovida por el piroxicam (Fig. 7 en el artículo 5). La promoción en el consumo de sustratos que manifestaron la epinefrina y el piroxicam no fueron ni bloqueados ni sumados (Figs. 5 y 7 en el artículo 5). Lo más rescatable de todo este cúmulo de información es que ambos compuestos, epinefrina y piroxicam, estimulan el consumo de ambos sustratos, lo cual se comprueba en el caso del piroxicam por su capacidad de aumentar el consumo de O_2 en mitocondrias en reposo, pero no la estimula en mitocondrias activadas por ADP, lo que sugiere que el piroxicam posee una actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa (Fig. 8 en el artículo 5), (Mingatto *et al*., 1996), (Salgueiro-Pagadigorria *et al*., 1996). Por lo tanto el mecanismo por el cual el piroxicam estimula la oxidación de lactato y etanol es probablemente debido a que desacopla la fosforilación oxidativa y así promueve la oxidación de sustratos en la mitocondria de los hepatocitos.

Una acción más que se estudió para el piroxicam fue la de analizar la posibilidad de que impidiera, dada su acción desacoplante sobre la fosforilación oxidativa, las funciones mitocondriales dependientes del ATP. Se ensayó el efecto del piroxicam sobre la citrulinogénesis, una función de la mitocondria hepática que requiere cantidades importantes de ATP. El piroxicam estimuló la citrulinogénesis (Fig. 9 del artículo 5). Por lo tanto, el efecto desacoplador del piroxicam no impide la función mitocondrial dependiente de ATP, lo cual se puede relacionar directamente con otra función que requiere de ATP y que estimula el piroxicam, la síntesis de TAG. En efecto, el piroxicam por su acción sobre la mitocondria, activa al menos dos mecanismos la síntesis hepática de TAG: aumenta la oxidación de etanol y favorece las funciones mitocondriales y celulares que requieren ATP. El resultado es el aumento en la síntesis de TAG a nivel celular.

El aumento observado en la síntesis de TAG en presencia de etanol y piroxicam en los hepatocitos aislados contrasta fuertemente con los datos observados *in vivo*: el piroxicam y los otros AINEs empleados en animales intoxicados con etanol ocasionan una importante disminución en los niveles de TAG, elevados a causa del etanol, y que son observables en el hígado de los animales.

En su momento se consideraron dos hipótesis que en combinación ayudaron a explicar las diferencias anotadas. Por un lado, la acción de la epinefrina sobre los hepatocitos aislados muestra que la epinefrina bloquea la acción del piroxicam y eleva la síntesis de TAG y facilita la conversión de más sustratos oxidados en glucosa; una situación similar podría ocurrir *in vivo* en vista de que la intoxicación con etanol estimula la liberación de la hormona epinefrina (Anton, 1965). La otra hipótesis se enfocó al tejido adiposo; la epinefrina elevada en sangre por acción del etanol (Antón, 1965), activa la lipólisis en el tejido adiposo, eleva la concentración de ácidos grasos no esterificados (ácidos grasos libres en el plasma) los que inundan al hígado que los capta y así contribuye de manera importante a elevar la poza hepática de TAG. La hipótesis se ensayó experimentalmente y los datos fueron confirmatorios y concluyentes: los AINEs en el tejido adiposo inhiben la lipólisis estimulada por epinefrina y por AMPc (Pimentel-Velázquez et al., 1996; Zentella de Piña et al., 2002, 2007a, 2008). Es importante establecer que fueron los datos reportados en esta serie de trabajos los que motivaron la hipótesis aquí anotada y llevaron a los resultados indicados.

En relación con el estrés oxidativo promovido por el etanol, los AINEs han demostrado, *in vivo* e *in vitro* en hígado, en sistema nervioso central (Pérez-Tapia et al., 1996) y más recientemente en eritrocitos (Zentella de Piña *et al*., 2007b) que disminuyen el indicador más estudiado del estrés oxidativo, los TBARS. No se descarta que dicha acción de los AINEs sea mediada, al menos parcialmente, por su efecto inhibitorio sobre las ciclooxigenasas (Vane, 1971; Famaey, 1997; Frölich JC, 1997) La inhibición de dichas enzimas disminuiría la presencia de agentes pro-inflamatorias generadores de ERO.

A esta importante acción de los AINEs se pueden añadir otras posibilidades, una se refiere a la menor presencia de TAG en el hígado de animales tratados con etanol y

AINEs; la menor disponibilidad de TAG en el hígado se correlaciona directamente con la capacidad de generar TBARS (Terrazos-Luch *et al*., 1997). Esto es, el hecho de disminuir la presencia de TAG hepático disminuye la posibilidad de generar TBARS. Otra posibilidad incluye el hecho reportado para la aspirina (Castrejón *et al*., 1996) y en el laboratorio se amplió para el caso del piroxicam (Castrejón *et al*., 1997) de que ambos son atrapadores de ERO y por ese mecanismo disminuye la generación de TBARS.

11. CONCLUSIONES

Si bien falta más por hacer, los resultados presentados en estos trabajos permiten proponer el uso de los AINEs en el manejo medicamentoso de las intoxicaciones agudas con etanol, e incluso en otras condiciones de intoxicación hepática. No se hace la misma recomendación para la situación de intoxicaciones crónicas con etanol o con otros tóxicos, en este último caso se ha de tener presente que los AINEs tienden a disminuir la coagulación sanguínea y que los enfermos crónicos del hígado manifiestan con gran frecuencia problemas de coagulación. En suma, se puede concluir que tanto en células aisladas como en homogenizado de hígado, los AINEs estudiados contribuyen a controlar el estrés oxidativo promovido por la acción del etanol.

12. PERSPECTIVAS

Se propone iniciar un estudio doble ciego, controlado, a realizarse con pacientes encamados en hospitales, que presenten un cuadro de intoxicación aguda del hígado (preferentemente con etanol) sin problemas de coagulación y que sean tratados con terapia de soporte (líquidos, glucosa, etc.) y uno de los AINEs de última generación que son los menos tóxicos.

13. REFERENCIAS

Abramson S, Korchak H, Ludewig R, Edelson H, Haines K, Levin RI, Herman R, Rider L, Kimmel S, Weissmann G. (1985) Model of action of aspirin-like drugs. Proc Natl Acad Sci. 82: 7227-7231.

Abramson SB, Cherksey B, Gude D, Leszczynska-Piziak J, Phillips MR, Blau L, Weissmann G. (1990) Nonsteroidal antiinflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. Studies in human neutrophils and liposomes. Inflammation 14:11-30.

Aebi HE. (1974) Catalase. En Methods of enzymatics analysis. Bergmeyer HU, (Ed) Vol 3. Verlang Chemie, Alemania, pp 273-286.

Agarwal DP, Harada S, Goedde HW. (1981) Racial differences in biological sensitivity to ethanol: the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase isozymes. Alcohol Clin Exp Res. 5(1):12-16.

Akerboon TPM, Sies H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods in Enzymol. William B Jakob (Ed), Vol 77, Academic Press Inc, NY. pp 373-382.

Albano E, French SW, Ingelman-Sundberg M. (1999) Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. Front Biosci. 4:D 533-540.

Albano E, Tomasi A, Goria-Gatti L, Dianzani MU. (1988) Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. Chem Biol Interact. 65(3):223-234.

Albano E. (2006) Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Proc Nutr Soc. 65(3):278-290.

Albano E. (2008) Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. Mol Aspects Med. 29(1-2):9-16.

Anton AH (1965) Ethanol and urinary catecholamines in man. Clin Pharmacol Ther. 6:462-469.

Babior BM. (2002) The leukocyte NADPH oxidase. Isr Med Assoc J. 4(11):1023-1024.

Baraona E, Lieber CS. (1998) Alcohol and lipids. Recent Dev Alcohol. 14:97-134.

Barry RE, McGivan JD. (1985) Acetaldehyde alone may initiate hepatocellular damage in acute alcoholic liver disease. Gut. 26(10):1065-1069.

Basu-Modak S, Lüscher P, Tyrrell RM. (1996) Lipid metabolite involvement in the activation of the human heme oxygenase-1 gene. Free Radic Biol Med. 20(7):887-897.

Bernt E, Gutmann I. (1974) Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD+. En Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, HU (Ed) Vol.3 2nd edn. Verlag Chemie Weinheim/Academic press, NY. pp 1499-1502.

Berry MN, Friend DS. (1969) High-yield preparation of isolated liver parenchymal cells. J Cell Biol. 43:506-520.

Berson A, Cazanave S, Descatoire V, Tinel M, Grodet A, Wolf C, Feldmann G, Pessayre D. (2006) The anti-inflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2-phenoxymethane-sulfoanilide), uncouples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. J Pharmacol Exp Ther. 318(1):444-454.

Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem J. 128(3):617-630.

Bradford MM. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.

Buege JA, Aust SD. (1978) Microsomal lipid peroxidation. Meth Enzymol. Vol 52, pp 302-310.

Bus JS, Aust SD, Gibson JE. (1974) Superoxide-and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. Biochem Biophys Res Commun. 58(3):749-755.

Butler JM Jr, Maling HM, Horning MG, Brodie BB. (1961) The direct determination of liver triglycerides. J Lipid Rev. 2:95-96.

Cahill A, Cunningham CC, Adachi M, Ishii H, Bailey SM, Fromenty B, Davies A. (2002) Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. Alcohol Clin Exp Res. 26(6):907-915.

Capone ML, Tacconelli S, Di Francesco L, Sacchetti A, Sciulli MG, Patrignani P. (2007) Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 82(1-4):85-94.

Carrico RJ, Deutsch HF. (1970) The presence of zinc in human cytocuprein and some properties of the apoprotein. J Biol Chem. 245(4):723-727.

Casey CA, Kragskow SL, Sorrell MF, Tuma DJ. (1989) Ethanol-induced impairments in receptor-mediated endocytosis of asialoorosomucoid in isolated rat hepatocytes: time course of impairments and recovery after ethanol withdrawal. Alcohol Clin Exp Res. 13(2):258-263.

Castrejón SM, Blodú OJL, Muñoz PE, Zentella de PM, Piña GE, Gleason VR. (1996) Spin.trapping studies on the effects of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID'S) on hydroxyl and hydroxyethil free radicas *in vitro*. Res Comm in Phermacol Toxicol. 1:289-299.

Castrejón SM, Zentella de PM, Piña GE, Blodú OJL, Muñoz PE, Gleason VR. (1997) Effects of piroxicam on two *in vitro* free radical producction systems (phenylhydraxine autooxidation and Fenton reaction). Res Comm in Phermacol Toxicol. 2:261-267.

Cederbaum AI, Lieber CS, Beattie DS, Rubin E. (1975) Effect of chronic ethanol ingestion on fatty acid oxidation by hepatic mitochondria. J Biol Chem. 250(13):5122-5129.

Cederbaum AI. (1989) Oxygen radical generation by microsomes: Role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. Free Radic Biol Med. 7(5):559-567.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci (USA). 99(21):13926-13931.

Clot P, Parola M, Bellomo G, Dianzani U, Carini R, Tabone M, Aricò S, Ingelman-Sundberg M, Albano E. (1997) Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rat hepatocytes exposed to alcohol. Gastroenterology. 113(1):265-276.

Comporti M, Benedetti A, Chieli E. (1973) Studies on the in vitro peroxidation of liver in ethanol-treated rats. Lipids. 8:4498-4502.

Comporti M. (1978) Ethanol-induced liver injury. En Biomedical Mechanisms of Liver Injury. Slater TF (Ed.) Academic Press, London. pp 469-516.

Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. (2008) Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease. Rev Esp Enferm Dig. 100(3):156-163.

Consejo Nacional contra las Adicciones. (CONADIC) Observatorio Mexicano en Tabaco, Alcohol y otras Drogas. (2003). Secretaría de Salud, México. 2004.

Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. (1991) Improved fluorometric determination of malonaldehyde. Clin Chem. 37(7):1273-1275.

Crabb DW, Bosron WF, Li TK. (1983) Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: application to predicting alcohol elimination rates in vivo. Arch Biochem Biophys. 224(1):299-309.

Crouse JR, Gerson CD, DeCarli LM, Lieber CS. (1968) Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man. J Lipid Res. 9(4):509-512.

Das SK, Vasudevan DM. (2007) Alcohol-induced oxidative stress. Life Sci. 81(3):177-187.

Di Luzio NR, Hartman AD. (1967) Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ethanol-induced fatty liver. Fed Proc 26:1436-1442.

Di Luzio NR, Stege TE. (1977) The role of ethanol metabolites in hepatic lipid peroxidation. En Alcohol and the Liver. Fisher MM and Rankin JG (Eds.) Plenum Press, NY. pp 455-462.

Di Luzio NR. (1963) Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants. Physiologist. 6:169-173.

Dianzani MU. (1985) Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. Alcohol Alcohol. 20(2):161-173.

Díaz Belmont A, Escotto Velázquez J. (1987) Uso de los antiinflamatorios no esteriodes. Simpósio sobre hepatitis alcohólica. Gaceta Médica de México. 13:143-145.

Díaz Belmont PA, Zentella de Piña M, Rodriguez L, Piña E. (1990) Role of nonsteroidal anti-inflammatory drug in the acute liver injury. Clin Res. 38(2):533 A.

Díaz-Cruz A, Guinzberg R, Guerra R, Vilchis M, Carrasco D, García-Vázquez FJ, Piña E. (2007). Adrenaline stimulates H_2O_2 generation in liver via NADPH oxidase. Free Radic Res. 41(6):663-672.

Dodge JT, Cohen G, Kayden HJ, Phillips GB. (1967) Peroxidative hemolysis of red blood cells from patients with abetalipoproteinemia (acanthocytosis). J Clin Invest. 46(3):357-368.

Dormandy TL. (1978) Free-radical oxidation and antioxidants. Lancet. 1(8065):647-650.

Draper HH, McGirr LG, Hadley M. (1986) The metabolism of malondialdehyde. Lipids. 21(4):305-307.

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. (1993) A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic Biol Med. 15(4):353-363.

Earnest DL, Hixson LJ, Alberts DS. (1992) Piroxicam and other cycooxigenase inhibitors: potential for cancer chemoprevention. J Cell Biochem. Suppl 161:156-166.

Famaey JP. (1997) In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: an overview Inflamm Res. 46(11):437-446.

Figueroa M, Guercio M, Paiva A, Lares M, Hong A. (2006) Efecto de la dipirona sobre la agregación plaquetaria. Archivos Venezolanos de Farmacologia y Terapeútica. 25(1):39-44.

Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. (1990) High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. N Engl J Med. 322(2):95-99.

Fridovich I. (1978) The biology of oxygen radicals. Science. 201(4359):875-880.

Frölich JC. (1997) A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of ciclooxigenasa isoenzymes. Trends Pharmacol Sci. 18:30-34

Gaines KC, Salhany JM, Tuma DJ, Sorrell MF. (1977) Reaction of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins. FEBS Lett. 75(1):115-119.

Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn W O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. Science. 119: 623-626.

Giuliano F, Warner TD. (1999) Ex vivo assay to determine the cyclooxygenase selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Br J Pharmacol. 126(8):1824-1830.

Goldstein BD, Buckley RD, Cardenas R, Balchum OJ. (1970) Ozone and vitamin E. Science. 169(945):605-606.

Gonzalez FJ. (2005) Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. Mutat Res. 569(1-2):101-110.

Goodman DW, Deykin D. (1963) Fatty acid ethyl ester formation during ethanol metabolism in vivo. Proc Soc Exp Biol. 113:65-67.

Gottfried SP, Rosenberg B. (1973) Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triglycerides. Clin Chem. 19(9):1077-1078.

Griswold DE, Adams KL. (1999) Constitutive Cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. Med Res Rev. 16, 181-206.

Grunnet N. (1973) Oxidation of acetaldehyde by rat-liver mitochondria in relation to ethanol oxidation and the transport of reducing equivalents across the mitochondrial membrane. Eur J Biochem. 35(2):236-243.

Guinzberg R, Laguna I, Zentella A, Guzmán R, Piña E. (1987) Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. Biochem J. 245:371-374.

Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. (1993) Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. Biochem Mol Biol Int. 29:263-270.

Gutmann I, Wahlefeld AW. (1974) L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD^+. En Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, HU (Ed) Vol.3 2^{nd}. edn. Verlag Chemie Weinheim/Academic press, NY pp 1464-1468.

Gutteridge JM, Stocks J, Dormandy TL. (1974) Thiobarbituric acid-reactive substances derived from autoxiding linoleic and linolenic acids. Anal Chim Acta. 70: 107-111.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). The biomedical significance of lipid peroxidation. En Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford. pp 263.

Handler JA, Thurman RG. (1985) Fatty acid-dependent ethanol metabolism. Biochem Biophys Res Commun. 133(1):44-51.

Harada S, Agarwal DP, Geodde HW. (1985) Aldehyde dehydrogenase polymorphism and alcohol metabolism in alcoholics. Alcohol. 2:391-392.

Harada S, Agarwal DP, Goedde HW. (1978) Isozyme variations in acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3) in human tissues. Hum Genet. 44(2):181-185.

Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz Muñoz M, García-Sáinz JA, Chagoya de Sánchez V. (1984) Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. Biochem Pharmacol. 33(16):2599-2604

Hernández-Muñoz R, Caballeria J, Baraona E, Uppal R, Greenstein R, Lieber CS. (1990) Human gastric alcohol dehydrogenase: Its inhibition by H_2-receptor antagonists, and its effect on bioavailability of ethanol. Alcohol Clin Exp Res. 14:946-950.

Hernández Vázquez A de J. (2009) Mecanismo de acción de los AINE's sobre la poza de glutatión en hepatocitos tratados con etanol. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM.

Higuchi S, Muramatsu T, Murayama M, Hayashida M.(1994) Association of structural polymorphism of the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. Biochem Biophys Res Commun. 204(3):1199-205.

Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, Renner B, Zolk O, Fromm MF, Brune K. (2007) Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. FASEB J. 21(10):2343-2351.

Hoek JB, Taraschi TF. (1988) Cellular adaptation to ethanol. Trends in Biochemical Sciences. 13:269-274.

Hoffman RS, Goldfrank LR. (1989) Ethanol-associated metabolic disorders. Emerg Med Clin North Am. 7(4):943-961.

Hohlfeld T, Zimmermann N, Weber AA, Jessen G, Weber H, Schrör K, Höltje HD, Ebel R. (2008) Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis. J Thromb Haemost. 6(1):166-173.

Höög J, Brandt M, Hedberg JJ, Stromberg P. (2001) Mammalian alcohol dehydrogenase of higher classes: analyses of human ADH5 and rat ADH6. Chem Biol Interact. 130-132(1-3):395-404.

Horn T, Chistofferson P, Henriksen JH. (1987) Alcoholic liver injury: defenestration in non-cirrhotic liver--a scanning electron microscopic study. Hepatology. 7:77-82.

Janero DR. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med. 9(6):515-540.

Jennett RB, Tuma DJ, Sorrell MF. (1980) Effect of ethanol and its metabolites on microtubule formation. Pharmacology. 21(5):363-368.

Ji B, Masubuchi Y, Horie T. (2001) A possible mechanism of naproxen-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. Pharmacol Toxicol. 89(1):43-48.

Johansson I, Ingelman-Sundberg M. (1985) Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. FEBS Lett. 183(2):265-269.

Keiding S, Christensen NJ, Damgaard SE, Dejgård A, Iversen HL, Jacobsen A, Johansen S, Lundquist F, Rubinstein E, Winkler K. (1983) Ethanol metabolism in heavy drinkers after massive and moderate alcohol intake. Biochem Pharmacol. 32(20):3097-3102.

Keilin D, Hartree EF. (1945) Properties of catalase. Catalisis of coupled oxidation of alcohol. Biochem J. 39:273-301.

Kenney WC. (1982) Acetaldehyde adducts of phospholipids. Alcohol Clin Exp Res. 412-416.

Kera Y, Ohbora Y, Komura S. (1988) The metabolism of acetaldehyde and not acetaldehyde itself is responsible for in vivo ethanol-induced lipid peroxidation in rats. Biochem Pharmacol. 37(19):3633-3638.

Kiessling KH, Lindgren L, Standber B, Tobe U. (1964) Electron microscopic study of liver mitochondria from human alcoholics. Acta Medica Scand. 176:595-598.

Kiessling KH, Tobe U. (1964) Degradation of liver mitochondria in rats after prolonged alcohol consumption. Experimental Cell Res. 33:350-354.

Kim JD, Yu BP, McCarter RJ, Lee SY, Herlihy JT. (1996) Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defences. Free Radic Biol Med. 20(1):83-88.

Kono H, Rusyn I, Yin M, Gäbele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. (2000) NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. J Clin Invest. 106(7):867-872.

Koop DR. (1992) Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. FASEB J. 6(2):724-730.

Kosugi H, Kojima T, Kikugawa K. (1993) Characteristics of the thiobarbituric acid reactivity of human urine as a possible consequence of lipid peroxidation. Lipids. 28(4):337-343.

Krebs HA, Perkins JR. (1970) The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. Biochem. J. 118:635-644.

Lane BP, Lieber CS. (1966) Ultraestructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. Am J of Pathology. 49:593-604.

Langin D. (2006) Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. C R Biol. 329(8):598-607.

Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torreilles J. (1998) Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. Ann Biol Clin (Paris). 56(3):305-319.

Lieber CS. (1982) Ethanol and lipid disorders, including fatty liver, hyperlipidemia and atherosclerosis. En Medical Disorders of Alcoholism: Pathogenesis and Treatment. CS Lieber, (Ed), WB Saunders, Philadelphia. pp 141-177.

Lieber CS. (1997) Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clin Chim Acta. 257(1):59-84.

Lieber CS. (2004) Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progresion to inflammation and fibrosis. Alcohol. 34(1):9-19.

Lieber CS, DeCarli LM, Schmid R. (1959) Effects of ethanol on fatty acid metabolism in liver slices. Biochim Biophys Res Comun. 1:302-306.

Lieber CS, deCarli LM. (1968) Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding. Science. 162:917-918.

Lieber CS, DeCarli LM. (1970) Quantitative relationship between the amount of dietary fat and the severity of the alcoholic fatty liver. Am J Clin Nutr. 23:474-478.

Lieber CS, deCarli LM. (1974) An experimental model of alcohol feeding and liver injury in the baboom. J of Med Primatology. 3:153-163.

Lieber CS, Jones DP, deCarli LM. (1965) Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. J Clin Invest. 44:1009-1021.

Lindros KO, Oshino N, Parrilla R, Williamson JR. (1974) Characteristics of ethanol and acetaldehyde oxidation on flavin and pyridine nucleotide fluorescence changes in perfused rat liver. J Biol Chem. 249(24):7956-7963.

Loschen G, Flohé L, Chance B. (1971) Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria. FEBS Lett. 18(2):261-264.

Maddrey WC. (1988) Alcoholic hepatitis: clinicopathologic features and therapy. Semin Liver Dis. 8(1):91-102.

Maickel RP, Beaven MA, Brodie BB. (1963) Implications of uptake and storage of norepinephrine by sympathetic nerve endings. Life Sci. 12:953-958.

Martínez Sánchez G. (2005) Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. Rev Cubana Farm. 39:3.

May HE, McCay PB. (1968) Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. I. Nature of the lipid alterations. J Biol Chem. 243(9):2288-2295.

McCord JM, Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 244(22):6049-6055.

Meade EA, Smith WL, DeWitt DL. (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Biol Chem. 268(9):6610-6614.

Menzel DB. (1970) Toxicity of ozone, oxygen, and radiation. Annu Rev Pharmacol. 10:379-394.

Mingatto FE, Santos AC, Uyemura SA, Jordani MC, Curti C. (1966) In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. Arch Biochem Biophys. 334:303-308.

Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. (1994**)** Selelectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxigenase. Proc Natl Acad Sci. USA. 90:11693-11697.

Morgan ET, Koop DR, Coon MJ. (1983) Comparison of six rabbit liver cytochrome P-450 isozymes in formation of a reactive metabolite of acetaminophen. Biochem Biophys Res Commun. 112(1):8-13.

Muramatsu M, Kuriyama K, Yuki T, Ohkuma S. (1981) Hepatic lipogenesis and mobilization of peripheral fats in the formation of alcoholic fatty liver. Jpn J Pharmacol. 31(6):931-940.

Needleman P, Isakson PC. (1997) The discovery and function of COX-2. J Rheumatol Suppl. 49:6-8.

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowith JB. (1986) Arachidonic acid metabolism. Annu Rev Biochem. 55:69-102.

Negoro M, Wakabayashi I. (2004) New simple method for purification of class I alcohol dehydrogenase. Alcohol and Alcoholism 39(3):178-182.

Niemelä O, Parkkila S, Bradford B, Iimuro Y, Pasanen M, Thurman RG. (2002) Effect of Kupffer cell inactivation on ethanol-induced protein adducts in the liver. Free Radic Biol Med. 33(3):350-355.

Nomura F, Lieber CS. (1981) Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes: enhancement after chronic alcohol consumption. Biochem Biophys Res Commun. 100(1):131-137.

Nordmann R, Ribière C, Rouach H. (1987) Involvement of iron and iron-catalyzed free radical production in ethanol metabolism and toxicity. Enzyme. 37(1-2):57-69.

Nordmann R, Ribière C, Rouach H. (1990) Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. Alcohol Alcohol. 25(2-3):231-237.

Nossaman BD, Baber SR, Nazim MM, Waldron PR, Hyman AL, Kadowitz PJ. (2007) Acetaminophen, phenacetin and dipyrone do not modulate pressor responses to arachidonic acid or to pressor agents. Pharmacology. 80(4):249-260.

O'Connor, N, Dargan PI, Jones AL. (2003) Hepatocellular damage from non-steroidal anti-inflammatory drugs. Q J Med. 96:787-791.

Ong MM, Wang AS, Leow KY, Khoo YM, Boelsterli UA. (2006) Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous Sod2(+/-) mice. Free Radic Biol Med. 40(3):420-429.

Oshino N, Jamieson D, Sugano T, Chance B. (1975) Optical measurement of the catalase-hydrogen peroxide intermediate (compound I) in the liver of anaesthetized rats and its implication to hydrogen peroxide production *in situ*. Biochemical Journal. 46:67-77.

Palmer TN. (1989) The biochemistry of alcohol and alcohol abuse. Sci Prog. 73(289 Pt 1):1-15.

Palmer TN, Cook EB y Drake PG. (1991) Alcohol abuse and fuel homeostasis. En Alcoholism A molecular perspective. Palmer TN (Ed). Plenum Press, London-NY pp 223-235.

Pérez-Tapia E, Saldaña-Balmori Y, Zentella-De Piña M, Ramírez-González MD, Piña-Garza E. (1996) Piroxicam and tenoxicam effects on ethanol-induced lipid peroxidation in brains of CD-1 male mice. Proc West Pharmacol Soc. 39:77-79.

Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K. (2007) Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. Br J Pharmacol. 151(4):494-503.

Pignon JP, Bailey NC, Baraona E, Lieber CS. (1987) Fatty acid-binding protein: a major contributor to the ethanol-induced increase in liver cytosolic proteins in the rat. Hepatology. 7(5):865-871.

Pimentel-Velázquez I, Ramírez-González MD, Zentella de Piña M, Piña E. (1996) Piroxicam inhibits epinephrine-induced stimulation of glycerol production in isolated rat adipocytes. Proc West Pharmacol Soc 39:31-32.

Piña E, Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA, Zentella de Piña M. (2003) ¿Es Tóxico el alcohol? En Mensaje Bioquímica Vol XXVII. Flores Herrera O, Riveros-Rosas H, Sosa Peinado A y Vázquez Contreras E. (Eds), UNAM, México. pp 121-146.

Plaa GL, Witschi H. (1976) Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 16:125-141.

Preedy VR, Peters TJ. (1988) Acute effects of ethanol on protein synthesis in different muscles and muscle protein fractions of the rat. Clin Sci (Lond). 74(5):461-461.

Rainsford KD. (2007) Anti-inflammatory drugs in the 21st Century. Subcell Biochem. 42:3-27.

Raz A, Needleman P. (1990) Differential modification of cyclo-oxygenase and peroxidase activities of prostaglandin endoperoxidase synthase by proteolytic digestion and hydroperoxides. Biochem J. 269(3):603-607.

Recknagel RO. (1967) Carbon tetrachloride hepatotoxicity Pharmacol Rev. 19: 145-208.

Reitz RC. (1975) A possible mechanism for the peroxidation of lipids due to chronic ethanol ingestion. Biochim Biophys Acta. 380(2):145-154.

Rezende RM, França DS, Menezes GB, dos Reis WG, Bakhle YS, Francischi JN. (2008) Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyrone in a rat model of inflammatory pain. Br J Pharmacol. 153(4):760-768.

Ristow H, Obe G. (1978) Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister-chromatid exchanges in human cells. Mutat Res. 58(1):115-119.

Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Piña E. (1997) Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. Arch of Med Res. 28(4):453-471.

Riveros-Rosas H, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Saldaña-Balmori Y, Julián-Sánchez A, Saavedra-Molina A, Piña E. (1999). Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes. European J Pharmacology. 380:49-59.

Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. (1997) Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. Hepatology. 25(2):351-355.

Rubin E, Beattie DS, Toth A, Lieber CS. (1972) Structural and functional effects of ethanol on hepatic mitochondria. Federation Proceeding. 31:131-140.

Rubin E, Lieber CS, Alvares AP, Levin W, Kuntzman R. (1971) Ethanol binding to hepatic microsomes: Its increase by ethanol consumption. Biochemistry Pharmacology. *20*:229-231.

Rubin E, Lieber CS. (1972) Ethanol metabolism in the liver. En Progress in Liver Diseases, Vol. 4. Popper H, Schaffner F (Eds.) Grune and Stratton. NY, pp 549-566.

Saldaña-Balmori Y, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Rocha-Hernández A, Piña E. (1996) Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated hepatocytes. European J Pharmacology. 317:225-229.

Salgueiro-Pagadigorria CL, Kelmer-Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL. (1996) Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam on rat liver mitochondria. Comp Biochem Physiol., Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol. 113:85-91.

Samuelsson B. (1972) Biosynthesis of prostaglandins. Fed Proc. (5):1442-1450.

Savolainen MJ, Baraona E, Lieber CS. (1987) Acetaldehyde binding increases the catabolism of rat serum low-density lipoproteins. Life Sci. 40(9):841-846.

Sevanian A, Hochstein P. (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. Annu Rev Nutr. 5:365-390.

Shelmet JJ, Reichard GA, Skutches CL, Hoeldtke RD, Owen OE, Boden G. (1988) Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat, and protein oxidation and insulin resistance. J Clin Invest. 81(4):1137-1145.

Sies H, Cadenas E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 311(1152):617-631.

Sies H. (1986). Oxidative stress: Introductory remarks. En Oxidative Stress. Sies H. (Ed.) Academic Press, USA. pp. 1-8.

Siew C, Deitrich RA, Erwin VG. (1976) Localization and characteristics of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases. Arch Biochem Biophys. 176(2):638-649.

Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W. (1987) Free radical mechanisms in relation to tissue injury. Proc Nutr Soc. 46(1):1-12.

Slater TF, Sawyer BC. (1971) The stimulatory effects of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Inhibitory effects of free-radical scavengers and other agents. Biochem J. 123(5):823-828.

Solomon LR. (1988) Effects of acetaldehyde on human red cell metabolism: evidence for the formation of enzyme inhibitors. Clin Chim Acta. 175(3):249-265.

Sorrell MF, Tuma DJ. (1985) Hypothesis: alcoholic liver injury and the covalent binding of acetaldehyde. Alcohol Clin Exp Res. 9(4):306-309.

Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM. (1981) Acetaldehyde adducts with haemoglobin. J Clin Invest. 67(2):361-369.

Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. (2005) Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. Biochem Biophys Res Commun. 338(1):677-686.

Sunethra Atukorala TM, Duggleby RG, Nixon PF. (1988) Effects of acetaldehyde upon catalysis by human erythrocyte transketolase. Biochem Pharmacol. 37(10):2100-2101.

Szkudelski T, Bialik I, Szkudelska K. (2004) Adipocyte lipolysis, hormonal and metabolic changes in ethanol-drinking rats. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 88(7, 8):251-258.

Tappel AL. (1979) Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation. En Biochemical and clinical aspects of oxygen. Caughey WS (Ed) Academic Press, NY.

Tephly TR, Tinelli F y Watkins WA. (1969) Alcohol metabolisms-role of microsomal oxidation *in vivo*. Science. 166:627-628.

Terrazos-Luch J, Corona-García S, Zentella-de Piña M, Ramirez-González MD, Piña-Garza E. (1997) Butylated hydroxytoluene prevents hepatic damage induced by food oil. Proc West Pharmacol Soc. 40:97-99.

Thomas HV, Mueller PK, Lyman RL. (1968) Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. Science. 159(814):532-534.

Thurman RG. (1998) Alcoholic liver injury involve activation of Kupffer cells by endotoxin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 275:G 605-611.

Van Antwerpen P, Nève J. (2004) In vitro comparative assessment of the scavenging activity against three reactive oxygen species of non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxicam and sulfoanilide families. Eur J Pharmacol. 496(1-3):55-61.

Vane JR. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol. 231(25):232-325.

Vane JR. (2000) The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. J Physiol Pharmacol. 51(4 Pt 1):573-586.

Vane JR, Botting RM. (2003) The mechanism of action of aspirin. Thromb Res. 110(5-6):255-258.

Vignais PV. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. Cell Mol Life Sci. 59(9):1428-1459.

Virgen Díaz S. (2006) Participación del etanol en el incremento de la liberación de especies reactivas del oxígeno en membranas de hepatocito de rata. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM. pp 10-11.

Wheeler MD y Thurman RG. (2003) Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. Journal of Biological Chemistry 278:8335-8441.

Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE, Gäbele E, Rusyn I, Yamashina S, Froh M, Adachi Y, Iimuro Y, Bradford BU, Smutney OM, Connor HD, Mason RP, Goyert SM, Peters JM, Gonzalez FJ, Samulski RJ, Thurman RG. (2001) The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. Free Radic Biol Med. 31(12):1544-1549.

Weissmann G, Korchak H, Ludewig R, Edelson H, Haines K, Levin RI, Herman R, Rider L, Kimmel S, Abramson S. (1987) Non-steroidal anti-inflammatory drugs: how do they work? Eur J Rheumatol inflammation. 8:6-17.

Wills ED. (1969) Lipid peroxide formation in microsomes. General considerations. Biochem J. 113(2):315-324.

Yagi K. (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem Med. 15(2):212-216.

Yamamoto S. (1991**)** **“**Enzymatic" lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenases. Free Radic Biol Med. 10(2):149-159.

Yokoyama H, Horie T, Awazu S. (1995) Oxidative stress in isolated rat hepatocytes during naproxen metabolism. Biochem Pharmacol. 49(7):991-996.

You M, Crabb DW. (2004) Recent advances in alcoholic liver disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287(1):G1-6.

Zentella de Piña M, Hernández-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A, Piña E. (1992) Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Letters. 298(2-3):123-125.

Zentella de Piña M, Saldaña-Balmori Y, Hernández-Tobías A, Piña E. (1993) Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. Alcohol Clin Exp Res. 17(6):1228-1232.

Zentella de Piña M, Corona García S, Saldaña Balmori Y. (1994a) Toxicidad del oxígeno: Papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. Bol Eduq Bioq (BEB 94). 13(3):87-93.

Zentella de Piña M, Corona S, Rocha-Hernández AE, Saldaña Balmori Y, Cabrera G, Piña E. (1994b) Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. Life Sciences. 54(19):1433-1439.

Zentella de Piña M, Castell-Rodríguez A, Saldaña-Balmori Y, Rocha-Hernández A, Ramírez-González MD, Cárabez-Trejo A, Piña-Garza E. (1997) Effect of piroxicam on carbon tetrachloride-induced liver injury. Proc West Pharmacol Soc. 40:91-93.

Zentella de PM, Vázquez-Meza H, Piña-Zentella G, Pimentel L, Piña E (2002) Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine- and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes. J Pharm Pharmacol. 54(4):577-582.

Zentella de Piña M, Vázquez-Meza H, Agundis C, Pereyra MA, Pardo JP, Villalobos-Molina R, Piña E. (2007a) Inhibition of cAMP-dependent protein kinase A: a novel cyclooxygenase-independent effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in adipocytes. Auton Autacoid Pharmacol. 27(2):85-92.

Zentella de Piña M, Sandoval-Montiel A, Serrano-Alessandri L, Montalvo-Jave E, Zentella-Dehesa A, Piña E. (2007b) Ethanol-mediated oxidative changes in blood lipids and proteins are reversed by aspirin-like drugs. Arch Med Res. 38(3):269-275.

Zentella de Piña M, Vázquez-Meza H, Pardo JP, Rendón JL, Villalobos-Molina R, Riveros-Rosas H, Piña E. (2008). Signaling the signal, cyclic AMP-dependent protein kinase inhibition by insulin-formed H_2O_2 and reactivation by thioredoxin. J Biol Chem**.** 283(18):12373-12386.

Proc. West. Pharmacol. Soc. 39: 77-79 (1996)

Piroxicam and Tenoxicam Effects on Ethanol-Induced Lipid Peroxidation in Brains of CD-1 Male Mice

E. PÉREZ-TAPIA, Y. SALDAÑA-BALMORI, M. ZENTELLA-DE PIÑA*, M.D. RAMÍREZ-GONZÁLEZ[1] & E. PIÑA-GARZA

Departamentos de Bioquímica y [1]Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Ethanol is a pyschoactive drug with a long history of use involving multiple areas of culture with economic, social, cultural and biological reprecussions. Alcoholism is one of the most common pathologies in the world, but despite its importance, the mechanisms involved in ethanol-induced disease processes are still unclear. Current interest is focussed on the possible role of an excessive production of free radicals [1].

The brain is susceptible to oxidative stress due to its high lipid concentration and its poor antioxidant defenses [2,3]. Hypnosis is one effect of ethanol in the central nervous system, and lethality is another, the former occurring with an immediate onset and the latter following several hours after ethanol administration. The underlying mechanisms are unknown. In this work, we studied the extent of whole brain lipid peroxidation in caused by ethanol (BLPO) in mice as an indication of the damage caused by a mechanism mediated by free radicals. We followed the time-course of BLPO on those time intervals at which hypnosis (HYP) and lethality (LET) are observed.

It has been demonstrated that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) can attenuate ethanol-induced lipid peroxidation in rat liver [4]. Tenoxicam (TEN) and piroxicam (PIR) are two NSAIDs of the oxicam group that have been shown to modify the incidence, duration and latency of hypnosis [5]. Thus, ethanol-induced BLPO has been measured following treatment with TEN and PIR to examine if these NSAIDs can also attenuate lipid peroxidation in brain.

MATERIALS AND METHODS: We used CD-1 male mice (25-30 g body weight) bred at the university farm. Mice were caged 6 per box (acrylic boxes with iron mesh tops and wood shaving, cleaned daily) and given food and water ad libitum. On the day of the experiment at 9 a.m., ethanol (4 g/kg; ip) was given simultaneously with either oxicam (5 mg/kg; sc) or saline solution (0.9% NaCl). Injection volume was 0.1 ml/10 g body weight. Piroxicam (PIR; Feldene®), tenoxican (TEN, Tilcotil®) and ethanol were diluted in doubly distilled water. The doses of ethanol and the oxicams, as well as the time points for decapitation of mice, were selected according to previous studies in Taconic mice [5]. At the doses selected, the expected ethanol-induced HYP was 95% within the first 3 min, while LET was 12% within the first 12 h. Control groups received only saline solution, PIR or TEN, and were treated as the other experimental groups.

The effects of PIR and TEN on ethanol-induced BLPO were studied only 8 h after drug treatment, asthis is the time point when maximal BLPO was measured in this work for the effect of ethanol

Table 1. Effect of piroxicam (PIR) and tenoxicam (TEN) on ethanol-induced hypnosis (HYP) and lethality (LET) in CD-1 mice

Treatment	%HYP	Latency (s)	Duration (s)	%LET
	24	12	12	12
SAL-ETO	75	95	8185	17
PIR-ETO	90	83	8220	25
TEN-ETO	70	79*	7221*	8

HYP, measured as the loss of the righting reflex, and LET following ethanol (ETO; 4 g/kg, ip) with simultaneous injection of oxicams (PIR or TEN) (5 mg/kg, sc) or saline (SAL. *$p < 0.05$ compared with the SAL-ETO group using analysis of variance followed by a Student t test.

alone. Only those animals that survived at 6 h were used for biochemical determinations. The whole mice brain was excised after craniectomy, kept on ice, and immediately homogenized in 20 ml of doubly distilled water. The samples were processed by the thiobarbituric acid reactive substances technique (TBARS) as described by Zeimlis *et al.* [4]. The protein content of brain was measured by the Bradford technique [6] in order to express the data as nmol TBARS per mg of brain protein. Determinations were done in duplicate and the average was used for calculations. Data are reported as mean ± SEM for at least 12 pharmacological and biochemical measurements. The results obtained were analyzed using Epistat. A p value lower than 0.05 was considered significant.

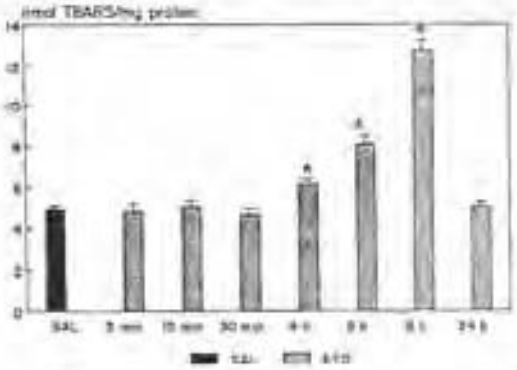


Figure 1. Time-course for the effect of ethanol (ETO) on brain lipoperoxidation (BLPO) in CD-1 male mice. The animals were decapitated and BLPO (nmol TBARS/mg brain protein) was measured as described in METHODS at the time indicated following 4 g/kg, ip, of ETO. Vertical bars indicate means ± SEM estimated for at least 10 duplicate measurements. *$p < 0.05$ compared with the control group (SAL, treated with 0.9% NaCl) by analysis of variance.

RESULTS: HYP was observed only in the groups treated with ethanol: saline-ethanol (75%), PIR-ethanol (90%) and TEN-ethanol (70%). No HYP was observed in any of the control groups (saline-saline, PIR-saline and TEN-saline). Only TEN significantly decreased the onset and duration of ethanol-induced HYP (Table 1).

As shown in Figure 1, ethanol decreased BLPO in a time-dependent manner that returned to baseline levels by 24 h after ethanol injection. The maximal level measured occurred 8 h after ethanol, when compared with the control group treated with saline (12.69 ± 0.89 vs. 4.91 ± 0.35 nmol TBARS/mg protein; $p < 0.05$). When BLPO was studied 8 h after ethanol, only TEN significantly attenuated the increase in TBARS caused by ethanol (15.27 ± 0.39 vs. 8.64 ± 0.63 nmol TBARs/mg protein; $p < 0.05$) (Fig. 2). We also observed that PIR alone significantly increased BLPO when compared with the saline-treated control group (6.92 ± 0.28 vs. 12.63 ± 0.85 nmol TBARS/mg protein; $p < 0.05$). TEN alone had no effect on BLPO at the time point and dose used here (Fig. 2).

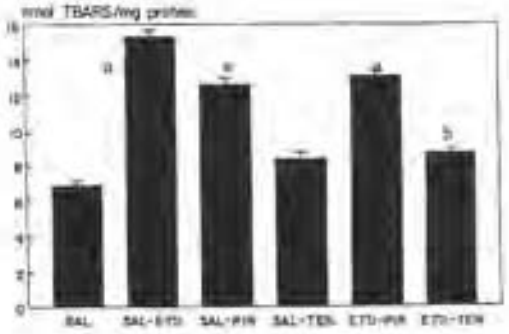


Figure 2. Effect of pirinixate (PIR) and tenidap (TEN) on ethanol (ETO)-induced brain lipoperoxidation (nmol TBARS/mg brain protein). Mice were decapitated 8 h following drug treatment as indicated. More details as in legends of Table 1 and Figure 1. (a) $p < 0.05$ compared with the control group (SAL-SAL); and (b) $p < 0.05$ compared with the group treated with ETO (SAL-ETO).

DISCUSSION: The data shown in Figure 1 indicate that ethanol-induced BLPO occurs with a time course that follows the presence of the lethal and not the hypnotic response caused by ethanol. So we could propose that the underlying biochemical mechanisms triggered by ethanol to produce HYP and LET are different. It is not difficult to envisage the massive BLPO as responsible for death associated with the acute ingestion of high doses of ethanol.

On the other hand, for the ethanol-induced HYP there may be two possible explanations: first, ethanol must reach the brain in order to trigger HYP. This suggestion finds strong support in several reports such as the existence of a specific neural membrane receptor [7]; a previous report from our laboratory [8] where we observed that HYP diminishes when oxidative metabolism of ethanol is enhanced; or the changes caused by ethanol in several biochemical indicators of CNS function, such as the concentrations of Ca^{2+} [9,10], K^+ [11], and second messengers [12], as well as changes in noradrenergic mechanisms [13]. Furthermore, catalase oxidizes ethanol in the brain to acetaldehyde [14,15], and this could be responsible for the HYP [14-17].

Regarding the possible role of BLPO in the ethanol-induced LET, it is worth mentioning that hepatic lipoperoxidation also reaches a maximal level several hours after ethanol administration [18]. It is likely, therefore, that

generalized lipoperoxidation could be one of the most important contributing factors associated with the lethal effects of ethanol. Under those circumstances in which animals survive the first 24 h following ethanol intoxication, it is evident that the antioxidant defenses must undergo extensive mobilization.

Results with oxicams show that TEN can significantly attenuate ethanol-induced BLPO. There is no significant difference between the control (saline-treated group) and TEN-ethanol group (Fig. 2). This observation is in agreement with the lower incidence of LET in the group that received TEN (Table 1). TEN also had a significant effect on the latency and duration of HYP, and this effect may be relate either to an increase of ethanol metabolism or to the inhibition of prostaglandin synthesis, as discussed in previous reports from our laboratory [5,8].

By contrast, PIR alone had a significant effect on BLPO. When given simultaneously with ethanol, however, their oxidative effects were not additive (12.63 $\pm$ 0.85 vs. 13.11 $\pm$ 0.23 TBARS/mg protein for saline-PIP and ethanol-PIR, respectively). This result may indicate that the mechanism responsible for the increase in BLPO becomes saturated at the dose and time studied here. The lack of an affect of PIR on ethanol-induced BLPO is in agreement with the absence of modification of other ethanol-induced responses.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Dr. Alma Rocha for her valuable comments. Supported by DGAPA IN-210094 UNAM and Programa AFINES UNAM.

REFERENCES

1. Lieber CS: Alcohol Clin Exp Res 15: 573 (1991).
2. Nordman R, Ribiere C & Rouach H: Free Rad Biol Med 12: 219 (1992).
3. Sinet P, Heikkila R & Cohen GJ: Neurochemistry 34: 1421 (1990).
4. Zentella M, Saldana Y, Hernandez A & Pina E: Alcohol Clin Exp Res 17: 1228 (1993).
5. Ramirez D, Zentella M, Pina E et al: Can J Physiol Pharm 72 (Suppl 1): 269 (1994).
6. Bradford M: Anal Biochem 72: 248 (1976).
7. Chaoying L, Peoples RW & Weight FF: Proc Natl Acad Sci 91: 8200 (1994).
8. Vazquez L, Miranda S, Perez E, Rodriguez C, Rivera A, Allende F, Ruiz R, Lorenzana M & Ramirez MD: Proc West Pharmacol Soc 39: 329 (1993).
9. Iqbal Z & Sze P: Neurochem Res 19: 475 (1994).
10. Daniell LC & Phillips JJ: Alcohol Clin Exp Res 18: 1474 (1994).
11. Osmanovic SS & Shefner SA: J Pharmacol Exp Therap 271: 134 (1994).
12. Costa LG: Neurotoxicology 15: 19 (1994).
13. Seppala T, Indanpaan-Heikkila JJ, Stromberg C & Mattila MJ: Life Sci 55: 245 (1994).
14. Aragon CM, Rogan F & Amit Z: Biochem Pharmacol 44: 93 (1992).
15. Aragon CM, Stotland LM & Amit Z: Alcohol Clin Exp Res 15: 165 (1991).
16. Tsukamoto H, Kaergae IT et al: Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Ison 25: 429 (1990).
17. Aragon CM, Spivak K & Amit Z: Pharmacol Biochem Behav 39: 55 (1991).
18. Zentella M, Hernandez A, Saldana Y & Pina E: FEBS Lett 298: 123 (3992).

Proc. West. Pharmacol. Soc. 40: 91-93 (1997)

Effect of Piroxicam on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury

MARTHA ZENTELLA DE PIÑA*[1], ANDRES CASTELL-RODRÍGUEZ[2], YOLANDA SALDAÑA-BALMORI[1], ALMA ROCHA-HERNÁNDEZ[1], MARIA DOLORES RAMÍREZ-GONZALEZ[3], ALFONSO CÁRABEZ-TREJO[3], & ENRIQUE PIÑA-GARZA[1]

Departments of [1]Biochemistry, [2]Tissue and Cell Biology, and [3]Pharmacology, Faculty of Medicine, National University of Mexico. P.O.Box 70-159, Mexico City 04510, Mexico

The administration of carbon tetrachloride (CCl_4) is an experimental model widely used to study liver injury and its eventual prevention. The hepatotoxic action of CCl_4 involves several biochemical alterations including the generation of free radicals and subsequent lipid peroxidation. A heterogeneous group of molecules, most of them showing lipid antioxidant properties, prevent deleterious effects of CCl_4 in liver [1-4]. Previous studies in our laboratory have shown that piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), can prevent the hepatic lipid peroxidation caused by ethanol [5] and some authors have reported that piroxicam can inhibit the production of superoxide radicals [6,7]. Hence in this work we studied the effect of piroxicam on the CCl_4-induced hepatic lipid peroxidation and on three other indicators of liver damage: the increase of the activity in serum alanine transferase, the liver content of triacylglycerides and the presence of ballooned hepatocytes.

MATERIALS AND METHODS: Male Wistar rats (200-250 g body weight) used in this work were bred at the animal house of the Faculty, fed with Purina rat chow and water *ad libitum*, and kept under a regular light-dark cycle (10:14 h) in acrylic cages with wood shaving.

Animals were randomly distributed in four groups and fasted 16 h before receiving any treatment. The rats were treated as follows: Control (2 ml of corn oil/po and 0.1 ml of water/100 g body weight/po); CCl_4 (2.5 ml/kg/po of carbon tetrachloride diluted in 2 ml of corn oil, and 0.1 ml of water/100 g body weight/po); Piroxicam (2 ml of corn oil/po and 0.1 ml of an aqueous solution of Feldene/100 g body weight/po, to provide a dose of 10 mg/kg of piroxicam); CCl_4 plus piroxicam-treated rats received first the solution of Feldene as indicated above and immediately after received CCl_4 diluted in corn oil. For histology studies additional groups of rats were treated with 0.5, 1.0 and 1.5 ml of CCl_4/po, diluted in 2 ml of corn oil.

All the experimental animals were decapitated 12 or 24 h after treatment. Trunk blood was collected and the liver was excised immediately and kept on ice. From the same hepatic lobule, approximately 5 cubic mm were separated for histopathological studies. The remaining liver was processed within the following hour for measuring the content of triacylglycerides (TAG) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS).

Biochemical determinations. Liver homogenates were prepared in double distilled water (1:9, w:v). TBARS and TAG were measured following the methods described by Zentella *et al.* [5] and Gottfried *et al.* [8], respectively. TBARS and TAG are expressed per mg of protein, as measured by the method of Bradford, using bovine serum albumin as standard [9]. The activity of serum alanine transferase (SALT) was measured according to the method of Frankel [10] within 3 days of obtaining the samples.

Liver histology. Three separate liver samples of 5 cubic mm were fixed in Carnoy fixative. Sections 5 to 6 µm thick were stained with hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff reaction (PAS). The quantitative analysis of liver damage, assessed by the presence of ballooned degeneration of hepatocytes, was done by randomly choosing ten hexagonal lobules in each liver section. The distance between the central vein and the periportal area was divided into three parts per lobule so as to define the centrilobular, mid-zonal and periportal areas. Cells with balloon degeneration were counted in each lobule using a 40X objective with a micrometer-calibrated grid.

Lethality was monitored over a period of 72 h following drug treatments.

Statistical analysis. Results are expressed as the mean ± SE. Comparisons were made by analysis of variance followed by Student's t test or Chi square test when appropriate. A significant difference is accepted with $p < 0.05$.

RESULTS:

Lethality. Carbon tetrachloride (2.5 ml/kg/po) caused 100 % lethality within 72 h of treatment. The group of rats treated simultaneously with piroxicam (10 mg/kg/po) and CCl_4 (n = 12 rats) exhibited 30% lethality ($p < 0.05$, when compared with the CCl_4-treated group). Piroxicam significantly decreased by 70% the CCl_4-induced lethality.

Biochemical indicators of liver damage. As illustrated in Table 1, CCl_4 caused a significant increase ($p < 0.05$) in the liver content of SALT activity (13.7 and 8.8 fold), TBARS (3.2 and 2.2 fold), and TAG (2.6 and 3.3 fold) at 12 and 24 h, respectively. The simultaneous administration of piroxicam caused a significant reduction ($p < 0.05$) of the CCl_4-associated effect on SALT activity (68.6 and 71.2%), TBARS (75.4 and 33.6%) and TAG (47.6 and 37.0%) at 12 and 24 h, respectively. Piroxicam alone had a significant effect on SALT activity only at 12 h after treatment. This effect was not observed at 24 h. Piroxicam alone had no significant effects on hepatic TBARS and TAG. These results indicate that piroxicam significantly decreases the CCl_4-induced hepatotoxic action.

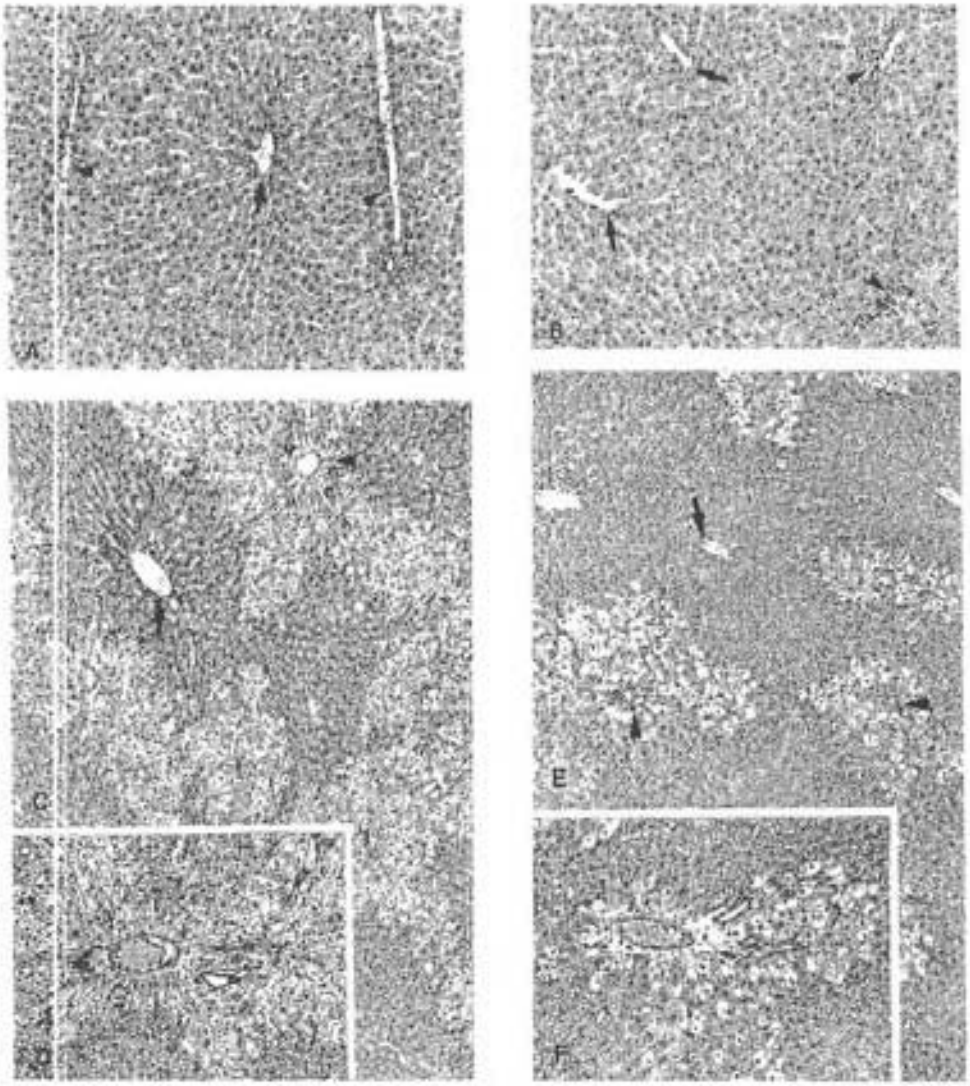


Figure 1. Micrographs of rat liver sections stained with hematoxylin-eosin. A: control rat liver. Normal hepatocytes around the central veins can be observed as well as in portal areas; B: Liver section of a rat treated with piroxicam (10 mg/kg/po) showing normal structure of hepatocytes and veins; C: Liver section of a rat treated with CCl_4 (2.5 ml/kg/po). Note the extensive ballooned cell degeneration around portal areas and hepatocytes with microdroplets, probably of lipids; D: Micrograph of rat liver treated with CCl_4 showing a portal area with ballooned cells, most of them with pyknotic nucleus. The mid-zonal hepatocytes also present steatosis; E: Liver section of a rat treated with CCl_4 plus piroxicam. Note the lower amount of ballooned cells by comparison with micrograph C. However, mid-zonal hepatocytes also exhibit microdroplets; F: Magnification of a rat treated with piroxicam and CCl_4. Note the decreased liver damage in relation to the liver section showed in D.

Table 1. Effect of piroxicam on the CCl_4-induced biochemical alterations in serum and liver

Biochemical indicator	Time after treatment	Control	CCl_4	Piroxicam	CCl_4 plus piroxicam
‡ALT (mU/ml)	12 h	56 ± 4 (5)	768 ± 194* (3)	116 ± 26* (5)	241 ± 45** (5)
	24 h	42 ± 2 (7)	372 ± 72* (5)	57 ± 3 (4)	107 ± 9** (4)
TBARS (nmol/mg protein)	12 h	1.9 ± 0.3 (8)	6.1 ± 0.8* (8)	1.5 ± 0.4 (5)	1.5 ± 0.2** (5)
	24 h	4.4 ± 0.4 (7)	9.8 ± 1.3* (11)	3.4 ± 0.6 (10)	6.5 ± 0.9** (9)
TAG (mg/mg protein)	12 h	0.8 ± 0.2 (5)	2.1 ± 0.3* (5)	0.8 ± 0.2 (5)	1.1 ± 0.2** (5)
	24 h	0.8 ± 0.2 (4)	2.7 ± 0.5* (4)	0.6 ± 0.1 (4)	1.7 ± 0.4** (4)

‡ALT: serum transferase activity; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TAG: triacylglycerides. The figures given indicate the mean value ± SEM calculated for the number of rats per group indicated in parenthesis. The comparisons were made by Student's t test and were: *$p < 0.05$ compared with the control group; **$p < 0.05$ compared with the CCl4-treated group.

Histological findings. Figure 1 includes micrographs of rat liver sections stained with hematoxylin-eosin. The location of the ballooned cell degeneration of the hepatocytes - i.e. in the periportal zone (or Zone 1 of Rappaport, where the higher concentration of oxygen is expected to occur), was observed always in those animals treated with different doses of CCl_4 (0.5, 1.0, 1.5 and 2.5 ml/kg/po) given either by sc, ip or orogastric routes. The quantitative analysis of the histology data indicate that simultaneous treatment with piroxicam (10 mg/kg/po) leads to a significant reduction in the number of ballooned cell degeneration of the hepatocytes (151.6 ± 19.0 vs. 46.2 ± 14.2 cells per square mm, $p < 0.05$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS: Piroxicam is a nonsteroidal anti-inflammatory drug which can effectively attenuate the hepatotoxicity of ethanol [5] and, as shown in this work, can also attenuate the CCl_4-induced hepatic damage as measured with clinical (data on lethality), biochemical (see Table I) and histological parameters (see Figure 1).

As our data stand today, they do not provide insight on the mechanism by which piroxicam has a protective action on the effect of CCl_4. From our histological data, protection seems strongly dependent on the presence of high concentrations of oxygen, as indicated by the restricted location of the lesions to the periportal zones. Whether free radicals generated during the metabolism of CCl_4 are involved, as shown for the protective action of adenosine [1], or whether it is related to a process mediated by modifications in the metabolism of prostaglandins or CCl_4 itself [11], are issues to be resolved.

The observation reported here may be of clinical relevance considering that NSAIDS, like piroxicam, are a group of drugs heavily prescribed in clinical practice. Our data indicate that piroxicam (10 mg/kg; po) can significantly attenuate the toxicity of CCl_4. This dose of piroxicam is much higher than the recommended clinical dose of 20 mg/day. However, following a single oral administration of 20 mg of piroxicam, the concentration that can be attained in plasma is within 1 to 10 mg/liter. If we consider that piroxicam has a long half-life (over 50 h), it would be expected that after treatment for several days the circulating levels would be higher [11]. Nowadays the administration of NSAIDS are not contraindicated in patients undergoing surgery, irrespective of whether they will be under halogenated anesthetics (such as halothane), which is known to cause liver injury strongly dependent on the concentration of oxygen. Whether the interaction of piroxicam and halogenated anesthetics may be detrimental or beneficial for the postoperative evolution of patients deserves further studies.

ACKNOWLEDGEMENTS: The work was supported by DGAPA IN-213695. We thank Ma. Luisa Rodriguez and Francisco Pasantes for technical assistance.

REFERENCES

1. Chagoya de SV, Hernández-MR *et al.*: J Biochem Tox 10:41 (1995).
2. Recknagel RO: Life Sci 33:401 (1983).
3. Lemoine O, Lablie C *et al.*: Biochem Pharmacol 39:2027 (1990).
4. Marchesi CS, McLean GS & Plaa G: Biochem Pharm 20:869 (1971).
5. Zentella de P M, Saldaña-B Y *et al.*: Alcohol Clin Exp Res 17:1228 (1993).
6. French IK, Hurst SS *et al.*: J Rheumatol 14:1018 (1987).
7. Miranda S S, Jolley C *et al.*: Gac Med Mex 131:78 (1995).
8. Butler WM, Maling HM *et al.*: J Steroid Res 2:95 (1961).
9. Bradford M: Anal Biochem 72:248 (1976).
10. Reitman S & Frankel SA: Am J Clin Path 28:56 (1956).
11. Insel PA. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th Ed. New York, 1996. Pages: 640-641.