



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Fisiología Celular

INFLUENCIA DEL LACTATO EN EL METABOLISMO DE ETANOL

TESIS

Que opta por el grado de:
Doctor en Ciencias Bioquímicas

Presenta:
Daniel Villalobos García

Director de Tesis:
Dr. Rolando Hernández Muñoz
Instituto de Fisiología Celular

Miembros del Comité Tutor:
Dr. Jesús Adolfo García Sáinz
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una educación gratuita de calidad.

Al Dr. Rolando E. Hernández Muñoz por su confianza, asesoría y apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por sus comentarios y apoyo a lo largo del proyecto.

Al Instituto de Fisiología Celular por la oportunidad brindada.

Al Jurado del Examen Doctoral: Dr. Antonio Peña Díaz, Dra. Marina Macías Silva, Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía, Dr. Héctor Riveros Rosas y Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez por sus comentarios y observaciones realizadas para enriquecer este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, U.N.A.M.

Abreviaturas

2H3: 2-hidroxibut-3-inoato

4-MP: 4-metilpirazol

ADH: alcohol deshidrogenasa

AK: adenilato cinasa

ALDH: aldehído deshidrogenasa

AOA: aminooxiacetato

AT: aminotriazol

CYP 2E1: citocromo p450 2E1

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

G3P: glicerol-3-fosfato

KCN: cianuro de potasio

LDH: lactato deshidrogenasa

LOx: lactato oxidasa

MEOS: microsomal ethanol oxidizing system

SD: succinato deshidrogenasa

SDH: sorbitol deshidrogenasa

SOV: ortovanadato de sodio

TBA: ácido tiobarbitúrico

Indice	Página
1.- Resumen	7
2.- Introducción	9
3.- Hipótesis	15
4.- Objetivo general	15
5.- Objetivos particulares	15
6.- Materiales y métodos	15
6.1.- Sustratos e inhibidores	15
6.2.- Animales y técnica de incubación	15
6.3.- Aislamiento de los hepatocitos	17
6.4.- Cuantificación de metabolitos	17
6.5.- Fraccionamiento del hígado	18
6.6.- Ensayos enzimáticos	19
6.6.1.- Uricasa	19
6.6.2.- Succinato deshidrogenasa	20
6.6.3.- Catalasa	20
6.6.4.- Adenilato Cinasa	20
6.7.- Cirugía y canulación	20
6.8.- Administración de sustratos	20
6.9.- Toma de muestra de sangre	21
6.10.- Análisis estadístico	21
7.- Resultados y discusión	21
7.1.- Efecto del lactato	21
7.2.- Discusión del efecto del lactato	27
7.3.- Perspectivas del efecto del lactato	30
7.4.- Resultados del efecto fructosa	31
7.5.- Discusión del efecto fructosa	36
7.6.- Perspectivas del efecto fructosa	43
8.- Referencias	47

Abstract: Previous studies show that lactate stimulates the hepatic metabolism of ethanol. In this work, we found that liver slices metabolized ethanol at a rate of 4.1 $\mu\text{moles/h/g-wet weight}$, however, the addition of lactate (10 mM) doubled the rate. 4-methylpyrazol (4-MP), an alcohol dehydrogenase (ADH) inhibitor, did not inhibit the lactate stimulation, suggesting that this enzyme is not involved in the oxidation of ethanol. Furthermore, 2-hydroxybut-3-ynoate (an inhibitor of alpha-hydroxyacid oxidases), completely inhibited the lactate stimulation. This suggests that this enzyme (also called lactate oxidase) is generating the necessary H_2O_2 for catalase to increase its activity.

To determine the source of the produced H_2O_2 , the liver was fractionated into its subcellular components and those fractions were incubated in the presence of ethanol and lactate. It was observed that the cytoplasm and the peroxisomes were the main source of the H_2O_2 produced from lactate, and that the increased rate of ethanol oxidation by lactate depends on catalase. In conclusion, the H_2O_2 necessary to increase the oxidation of ethanol comes from the cytoplasm and peroxisomes, and it is produced from lactate by lactate oxidase.

Previous studies showed that fructose stimulates the hepatic metabolism of ethanol, which is known as the fructose effect. The literature suggests that an increase in the consumption of ATP due to the synthesis of glucose from fructose stimulates the oxidation of NADH in the respiratory chain, allowing a faster dissociation of the ADH-NADH complex; however, there are studies suggesting that this hypothesis is incorrect.

In this study, we tested the effect of fructose, and also other sugars such as tagatose and sorbose (due to the similarity in their metabolism) in the metabolism of ethanol in rat hepatocytes as well as in vivo.

In both in vitro and in vivo experiments, fructose and sorbose significantly increased the oxidation of ethanol (over 60% in both cases). However, tagatose did not show any effect. The stimulation by both fructose and sorbose was accompanied by an increase in the production of both glycerol and sorbitol, but only with fructose was there a significant increase in the production of glucose. In conclusion, these results show that the reduction of glyceraldehyde to glycerol and fructose to sorbitol (both processes consume NADH), respectively, what increases the elimination of ethanol.

1.- **Resumen:** Estudios previos muestran que el lactato estimula el metabolismo hepático de etanol. En este trabajo encontramos que las rebanadas de hígado metabolizaron el etanol a una tasa de 4.1 μ moles/h/g-peso húmedo, sin embargo, la adición de lactato (10 mM) duplicó su metabolismo. El 4-metilpirazol (4-MP), un inhibidor de la alcohol deshidrogenasa (ADH), no inhibió la estimulación por lactato, sugiriendo que esta enzima no está involucrada. El aminotriazol (un inhibidor de la catalasa), inhibió por completo la estimulación por el lactato, sugiriendo que esta enzima está involucrada en la oxidación del etanol. Además, el 2-hidroxibut-3-inoato (un inhibidor de las alfa-hidroxiácido oxidasas), inhibió completamente la estimulación del metabolismo de etanol por lactato. Esto sugiere que esta enzima (también llamada lactato oxidasa) está generando el H_2O_2 necesario para que la catalasa incremente su actividad.

Para determinar el origen del H_2O_2 producido, el hígado se fraccionó en sus componentes subcelulares y las fracciones se incubaron en presencia de etanol y lactato. Se observó que el citoplasma y los peroxisomas son los principales productores de H_2O_2 en presencia de lactato, y que la aceleración de la oxidación de etanol por lactato depende de la catalasa. En conclusión, el H_2O_2 necesario para incrementar la oxidación de etanol proviene del citoplasma y de los peroxisomas, y se produce a partir de lactato por la lactato oxidasa.

Estudios previos demostraron que la fructosa estimula el metabolismo hepático de etanol, lo que se conoce como el efecto fructosa. La literatura sugiere que un

incremento en el consumo de ATP debido a la síntesis de glucosa a partir de fructosa estimula la oxidación de NADH en la cadena respiratoria, permitiendo que el complejo ADH-NADH se disocie con mayor velocidad; sin embargo, hay estudios que sugieren que esta hipótesis es incorrecta. En este estudio probamos el efecto de la fructosa, y también otros azúcares como la tagatosa y la sorbosa (esto debido a su metabolismo similar) en el metabolismo del etanol en hepatocitos de rata, así como en rata *in vivo*.

En experimentos *in vitro* e *in vivo*, la fructosa y la sorbosa incrementaron significativamente la oxidación del etanol (más de 60% en ambos casos). Sin embargo, la tagatosa no mostró ningún efecto. La estimulación por fructosa y sorbosa se acompañó de un incremento en la producción de glicerol y sorbitol, pero sólo con la fructosa hubo un incremento importante en la glucogénesis. En conclusión, estos resultados muestran que es la reducción del gliceraldehído (derivado del metabolismo de fructosa) a glicerol y de la fructosa a sorbitol (ambos procesos consumen NADH), respectivamente, lo que permite un incremento en la eliminación de etanol.

2.- Introducción

El metabolismo del etanol en el hígado implica su oxidación a acetaldehído y posteriormente a ácido acético; ambas reacciones se acompañan por la reducción de NAD^+ a NADH . La primera reacción (catalizada por la alcohol deshidrogenasa, ADH) ocurre en el citoplasma, es reversible, y se favorece la formación de etanol y NAD^+ . Para favorecer la reacción en el sentido directo, el acetaldehído debe eliminarse continuamente, generalmente siendo oxidado a acetato (por las aldehído deshidrogenasas, ALDH), lo que impide que se alcance el equilibrio químico. Esta segunda reacción ocurre en el citoplasma y principalmente en la mitocondria, es exérgica e irreversible, por lo que el posterior metabolismo del acetato es irrelevante para la velocidad a la que se lleva a cabo la oxidación del etanol [1,2].

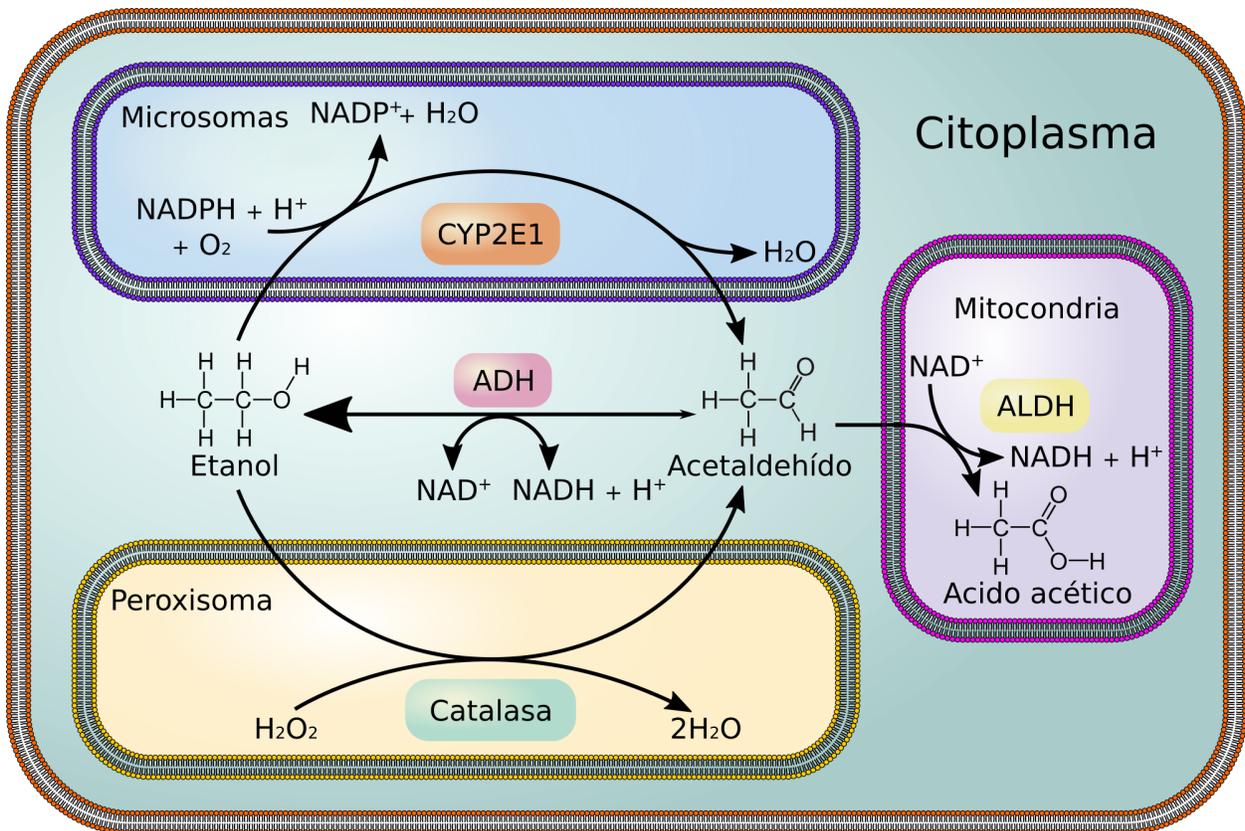


Figura 1. Hay tres enzimas que oxidan el etanol: alcohol deshidrogenasa (ADH), Citocromo p450 2E1 (MEOS) y catalasa.

La tasa de oxidación del etanol es constante, ya que, en general, las isoformas de la ADH tienen una K_M muy baja para el etanol (alrededor de 1mM) [2]. Existen otras vías para oxidar al etanol: la vía MEOS (Microsomal Ethanol Oxidizing System), localizada en el retículo endoplásmico, y la vía de la catalasa, ubicada en los peroxisomas. El MEOS es una vía alterna del metabolismo de etanol que requiere del citocromo p450 2E1, oxida el etanol a acetaldehído acompañado de la oxidación de NADPH a NADP⁺ y la reducción del O₂ a H₂O. El MEOS es una vía de poca importancia en condiciones normales, ya que se requiere su inducción por la ingesta crónica de alcohol, por lo que no es relevante en sujetos experimentales que nunca han ingerido etanol. La vía de la catalasa tiene poca importancia en el hígado y sólo tiene relevancia en el cerebro. Esto deja a la alcohol deshidrogenasa como la enzima que determina la tasa del metabolismo hepático del etanol [1,2] (figura 1).

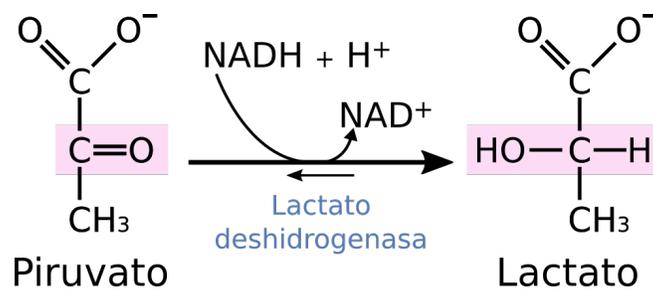


Figura 2. La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la conversión del piruvato a lactato. La reacción es reversible y se favorece la formación de lactato y NAD⁺.

Ya que la ADH y la ALDH no son enzimas reguladas alostéricamente, el metabolismo del etanol causa que la relación $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ de la célula disminuya de un valor de 800 a alrededor de 300. La incapacidad de restaurar la proporción original se debe a que el exceso de NADH sobrepasa las necesidades energéticas de la célula, y debido a esto la $[\text{NAD}^+]$ se mantendrá baja mientras haya etanol en el sistema [2,3]. Como un efecto inmediato, la célula consume NADH a través de la LDH para reducir al piruvato a lactato (figura 2); esto causa un incremento en la relación $[\text{lactato}]/[\text{piruvato}]$. Asimismo, el exceso de acetato genera una gran cantidad de acetil-CoA, la cual inhibe alostéricamente a la piruvato deshidrogenasa y activa a la piruvato carboxilasa. La piruvato deshidrogenasa es además inhibida por el NADH. Adicionalmente, el NADH

también inhibe alostéricamente a la isocitrato deshidrogenasa y a la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Todos estos factores en conjunto bloquean la glucólisis, el ciclo de Krebs y el metabolismo del lactato [2,4,5].

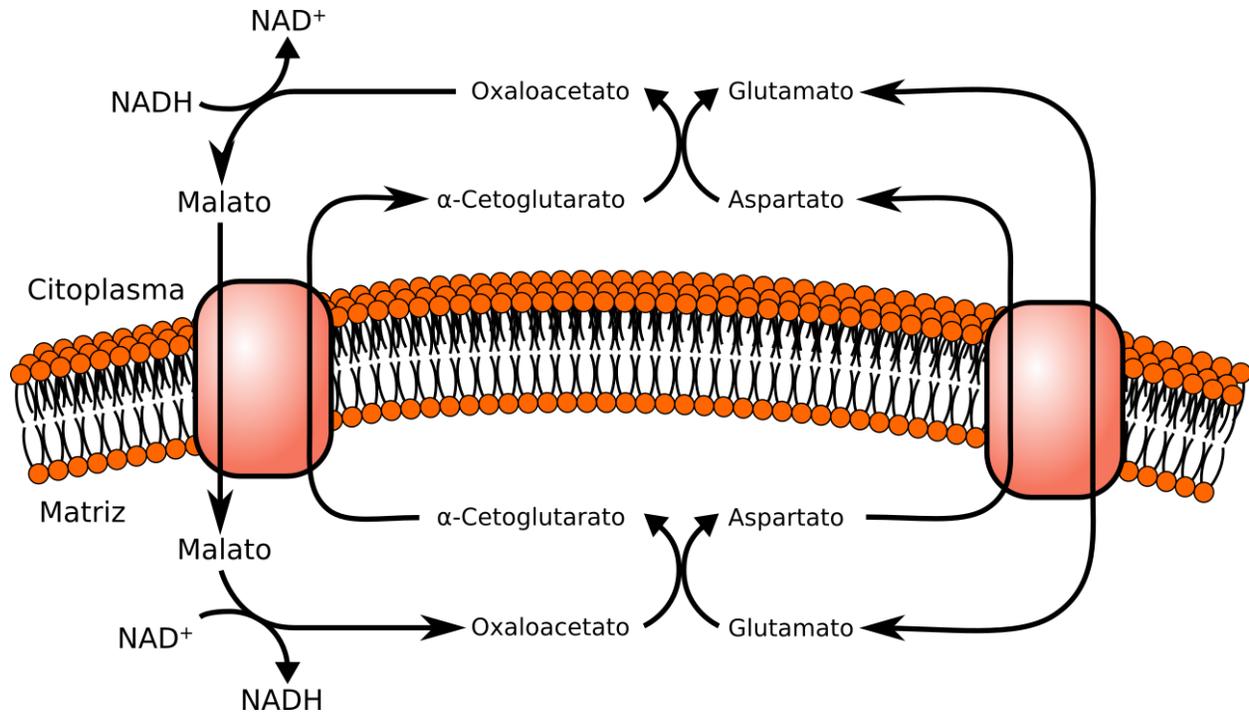


Figura 3. El transportador malato-aspartato transporta el poder reductor del NADH hacia el interior de la mitocondria. Este transportador es necesario ya que la membrana interna mitocondrial es impermeable al NADH.

En los animales, el metabolismo de etanol ocurre principalmente en el hígado. Es bien sabido que la reacción que cataliza la ADH es limitada por la disociación entre la enzima y el NADH [1,3,4,5]. Esto sugiere que la tasa de oxidación del NADH, la cual ocurre principalmente a través de la cadena respiratoria, es lo que determina la tasa global del metabolismo de etanol [1].

La fructosa es el único compuesto conocido que puede acelerar el metabolismo del etanol in vivo en humanos, y de aumentar la velocidad hasta en más de 100%. El aumento en la tasa del metabolismo del etanol causado por la adición de fructosa se conoce ya por varias décadas [6]. Este efecto se ha demostrado en hepatocitos aislados, rebanadas de hígado e hígado perfundido de todos los mamíferos en los que

se ha experimentado [7,8,9]; pero sólo en humanos se ha demostrado que el efecto existe in vivo, tanto al ingerir fructosa como administrarla por vía intravenosa. Inicialmente se consideraba que este efecto era exclusivo de la fructosa, por lo que se le otorgó el nombre de “efecto fructosa”, pero con el tiempo se demostró que otras moléculas (principalmente intermediarios de la glucólisis) también pueden estimular la oxidación del etanol, incluyendo el gliceraldehído, el piruvato y el lactato [4,6,7,8,9,10,11].

HYPOTHESIS:

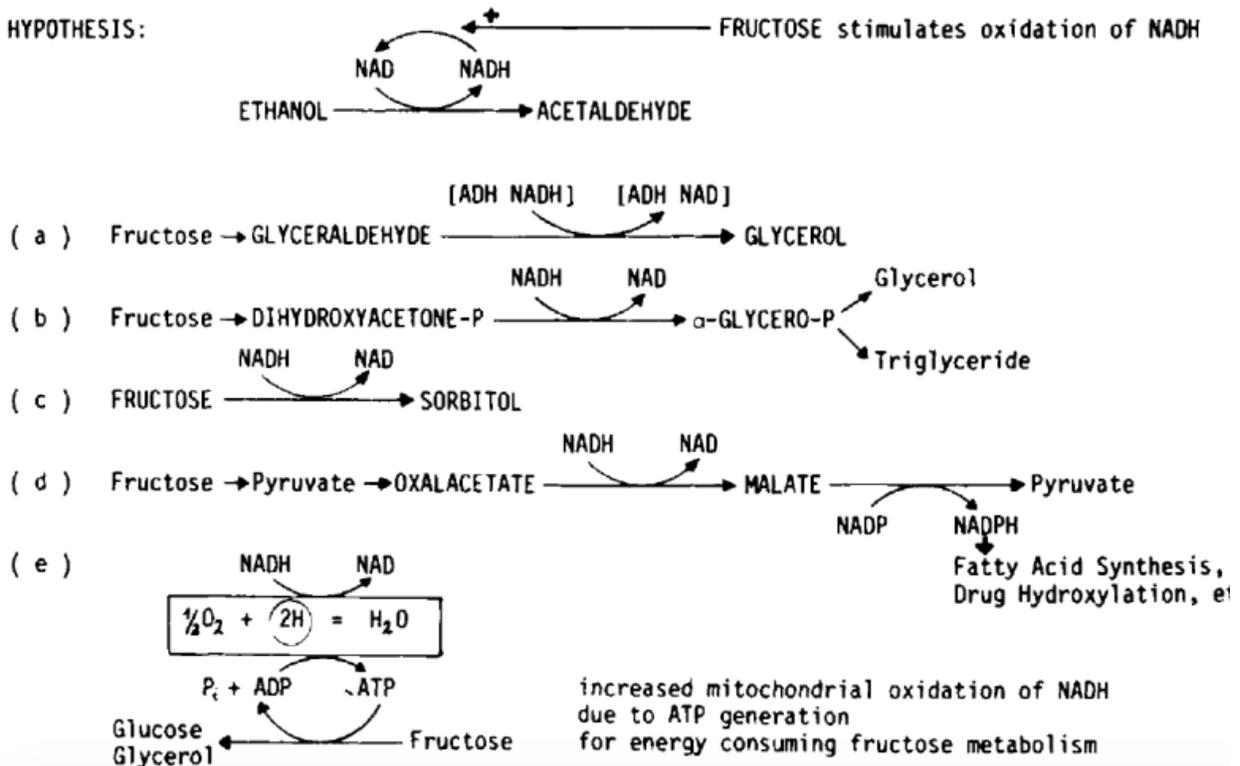


Figura 4. Hay 5 hipótesis propuestas para explicar el efecto fructosa. Todas involucran un aumento en la oxidación del NADH. Fuente: Williamson, Drott & Chance, 1977.

Desde su descubrimiento se han propuesto varias explicaciones para entender el mecanismo del efecto fructosa, pero a pesar de la gran cantidad de años de estudio, no se ha logrado determinar de manera definitiva el mecanismo que explica este efecto [4]. Ya que el paso limitante en el metabolismo del etanol es la disociación del complejo ADH-NADH [1,3,4,5], se considera que el aumento del consumo de NADH (o

la regeneración de NAD⁺) debería ser el mecanismo del efecto fructosa (ver imagen suplementaria 1). Con base en este supuesto, se propusieron varias explicaciones para entender el efecto fructosa como resultado del consumo de NADH [12], resumidas en la figura 4:

a) El gliceraldehído derivado de la fructólisis se reduce por la ADH, consumiendo NADH en el proceso; por lo tanto, se evita el paso limitante de la oxidación del etanol, que es la disociación del complejo ADH-NADH. Sin embargo, el hecho de que la K_M de la alcohol deshidrogenasa sea tan grande para el gliceraldehído ($\approx 11\text{mM}$ en rata y $\approx 100\text{mM}$ en humano [7]), apunta a que esta ruta no podría tener gran relevancia.

b) La dihidroxiacetona fosfato (DHAP) producida durante la fructólisis se reduce a glicerol-3-fosfato por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, consumiendo NADH en el proceso.

c) La reducción de la fructosa a sorbitol es catalizada por la sorbitol deshidrogenasa. En teoría, la síntesis de sorbitol actuaría como un mecanismo para consumir NADH, similar a la función de la LDH al reducir piruvato.

d) El NADH es removido de manera indirecta a través de la reducción de oxaloacetato a malato, y la posterior descarboxilación del malato a piruvato por la enzima málica. En esencia, esta explicación propone que la remoción del NADH se da a expensas de la producción de NADPH; mientras que el NADP⁺ es regenerado por otras vías como la síntesis de ácidos grasos.

e) La síntesis de glucosa a partir de fructosa es un proceso que consume energía en forma de ATP (2 moléculas de ATP por molécula de fructosa). La generación de ADP estimularía la cadena respiratoria, lo que aumentaría la oxidación del NADH.

Adicionalmente, se ha observado que el lactato es también capaz de incrementar el metabolismo del etanol in vivo e in vitro [11,13]. Sin embargo, la oxidación del lactato a

piruvato por la LDH genera NADH, por lo que se esperaría que disminuyera el metabolismo del etanol, ya que el NADH producido inhibiría a la ADH [6]. Esta paradoja ha generado dos hipótesis para explicar la estimulación debida al lactato:

1.- El lactato incrementa la demanda de ATP a través de la glucogénesis, lo que incrementa la tasa de oxidación del NADH en la cadena respiratoria [14,15].

2.- El lactato incrementa la concentración de los componentes del transportador malato-aspartato, lo que incrementa la tasa de transporte de equivalentes reductores a la matriz mitocondrial [13,14].

La tasa de respiración celular es regulada por la necesidad de ATP, que obedece a los niveles de ADP, ATP y fosfato [16]. El aumento en el consumo de ATP causa un aumento en la actividad de la cadena respiratoria y, por lo tanto, un aumento en la oxidación del NADH. Debido a que la síntesis de glucosa a partir de lactato requiere 3 moléculas de ATP por molécula, la primera hipótesis sugiere que esto, en teoría, debería incrementar la oxidación del NADH. Adicionalmente, la glucogénesis consume 1 molécula de NADH, por lo que el NADH generado por la LDH no se acumularía. Por otro lado, si lo que limita a la cadena respiratoria es el transporte de equivalentes reductores a la matriz mitocondrial, entonces un incremento en el consumo de ATP no causaría un aumento en el consumo de NADH. En este caso la limitante sería la actividad del transportador malato-aspartato (figura 3), debido a que la concentración de sus componentes sería insuficiente. La segunda hipótesis sugiere que el lactato se metaboliza en aspartato, malato, glutamato y α -cetoglutarato, incrementando la concentración de estos y a su vez incrementando la actividad del transportador. Para el efecto fructosa, la idea de que un aumento en la actividad de la cadena respiratoria es lo que impulsa el incremento en el consumo de NADH (hipótesis e) es la teoría más aceptada para explicar el fenómeno.

3.- Hipótesis

1.- El lactato estimula la oxidación de etanol por una vía independiente de las alcohol deshidrogenasas, probablemente a través de la catalasa o el MEOS.

2.- La fructosa estimula la oxidación de etanol por un incremento en la oxidación del NADH, muy probablemente a través de un incremento en la síntesis de glucosa.

4.- Objetivo general

Determinar el mecanismo por el cual el lactato y la fructosa estimulan la oxidación del etanol en el hígado de rata.

5.- Objetivos particulares

-Determinar la enzima (catalasa o CYP 2E1) que se activa por el lactato.

-Determinar cómo el lactato activa a esa enzima.

-Determinar cómo la fructosa incrementa la regeneración del NAD⁺.

6.- Materiales y métodos

6.1.- **Sustratos e inhibidores.** El etanol se usó a una concentración de 10 mM en todos los experimentos in vitro y el L-lactato se usó a una concentración de 5, 10 y 20 mM. El aminotriazol (inhibidor de la catalasa) se usó a 10mM y el 4-metilpirazol (4-MP, inhibidor de la alcohol deshidrogenasa) y el 2-hydroxibut-3-inoato (2H3, inhibidor de la lactato oxidasa) se usaron a 1mM. El aminooxiacetato (AOA) se usó a 200 μ M. La fructosa, sorbosa, tagatosa y xilitol fueron usados a una concentración final de 10 mM.

6.2.- **Animales y técnica de incubación.** Se usaron ratas Wistar macho (250-270g) alimentadas y en ayuno de 24h. Se anestesiaron con pentobarbital sódico. Al momento de la muerte el sistema sanguíneo de la rata se perfundió desde el corazón con buffer Krebs frío, para eliminar la sangre del hígado. El hígado se removió rápidamente y se rebanó con un *tissue chopper* (grosor de 0.35 mm). De 510-520 mg de rebanadas de

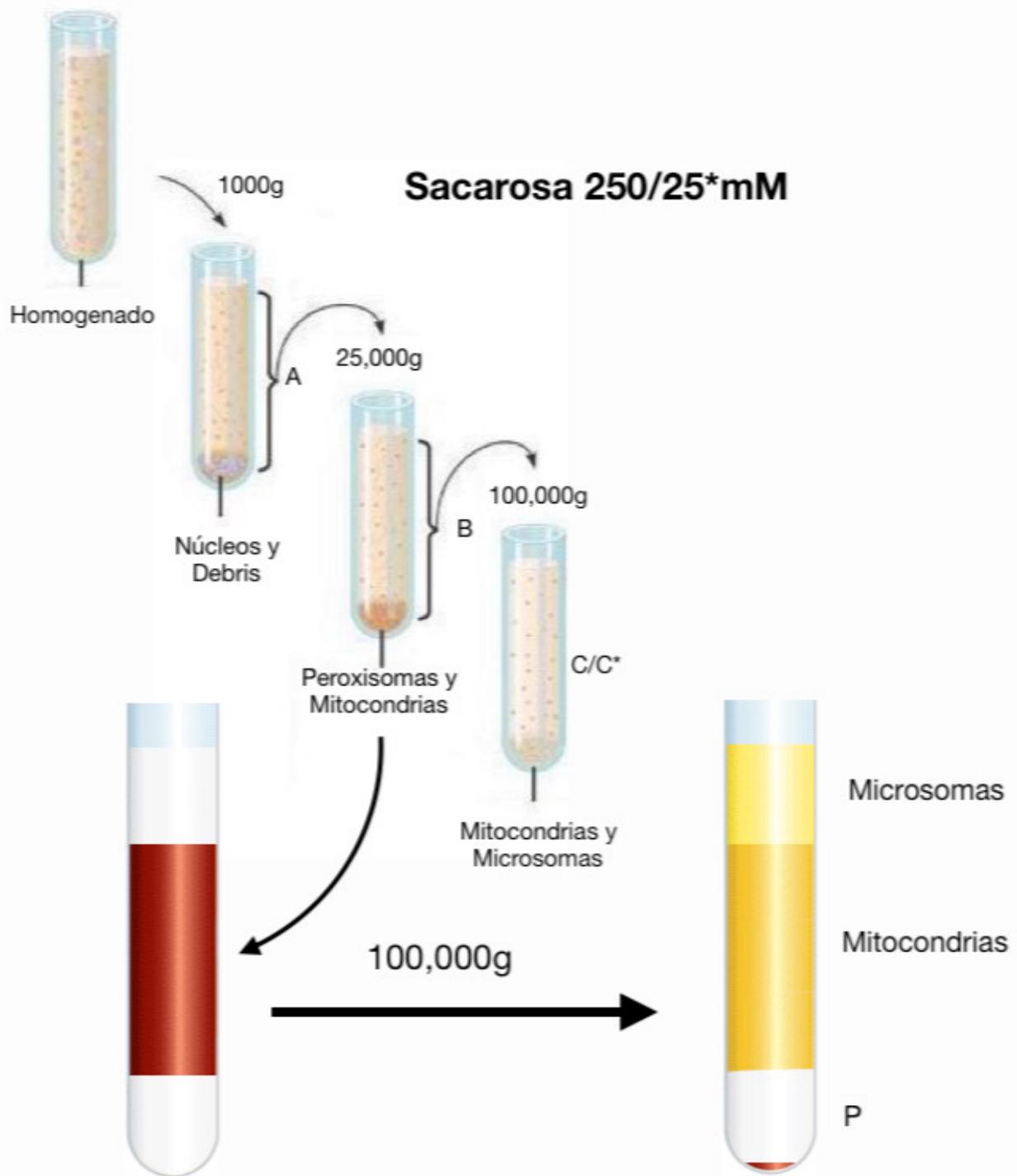


Figura 6. Proceso de fraccionamiento del hígado. El pellet de la fracción B se suspende en el gradiente de iodoxanol para aislar los peroxisomas.
 Fuente: Cell Fractionation: Definition, Steps & Methods." *Study.com*, 10 February 2016, [study.com/academy/lesson/cell-fractionation-definition-steps-methods.html](https://www.study.com/academy/lesson/cell-fractionation-definition-steps-methods.html)

hígado se colocaron en matraces de 25ml con 5ml de solución de Krebs (pH 7.5) conteniendo 10 mM de etanol. Las rebanadas se incubaron en un baño de agua en agitación a 37°C. Después de un periodo de pre-incubación de 30 minutos, se tomó la muestra inicial de sobrenadante y al mismo tiempo se agregó el compuesto experimental a una concentración específica para cada compuesto. A partir del tiempo inicial, se tomaron 160 µl de sobrenadante cada 30 minutos durante un tiempo total de 3 horas. Cada muestra de sobrenadante se desproteinizó con 72 µl de ácido perclórico al 16%.

6.3.- Aislamiento de los hepatocitos. Se usaron ratas macho de 250-270 g. Los hepatocitos se aislaron por perfusión como se describió [17] (figura 5), con un buffer de perfusión compuesto por 123 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.1 mM KH₂PO₄, 1.18 mM MgCl₂, 4.7 mM NaHCO₃, 25 mM HEPES y 15 mM NaOH, pH 7.6. El hígado se perfundió con este amortiguador a 37°C a través de la vena porta y, después de remover la sangre del hígado, se adicionó CaCl₂ a una concentración final de 1.3 mM seguido de colagenasa IV a una concentración final de 26 U/ml, para que de esta manera el calcio active la enzima y esta pueda degradar la matriz extracelular del hígado. Después de disgregar el hígado, los hepatocitos se lavaron cuatro veces en el mismo buffer por centrifugación a 50 x g. Todas las preparaciones mostraron una viabilidad superior al 90% por la prueba de exclusión de azul de tripano [18]. Los hepatocitos (100 mg) se incubaron en 5 ml de amortiguador de perfusión con CaCl₂ y albúmina al 1% a 37°C por 3 horas en presencia de 10 mM de etanol. La fase gaseosa fue aire atmosférico. Durante la incubación, se tomaron 200 µl de suspensión de hepatocitos cada hora y se desproteinizaron con 30 µl de ácido perclórico al 16%.

6.4.- Cuantificación de metabolitos. El etanol se cuantificó enzimáticamente con un espectrofotómetro Beckman en un medio conteniendo 20 µl de NAD⁺ (100 mM), 100 µl de tiosemicarbazida (100 mM) y 20 µl de ADH de levadura (ADH; 2 mg/ml) al cual se agregó 850 µl de buffer de glicina (200 mM, pH 9.0). Se adicionaron 10 µl de extracto perclórico, y después de una incubación de 10 min, se leyó la absorbancia a 340 nm [19]. La glucosa y el glicerol se determinaron con kits comerciales (Spinreact, Gerona,

España). El sorbitol se cuantificó con un kit comercial (Megazyme, Bray, Irlanda). El lactato se determinó enzimáticamente por aparición de NADH como se describió [20].

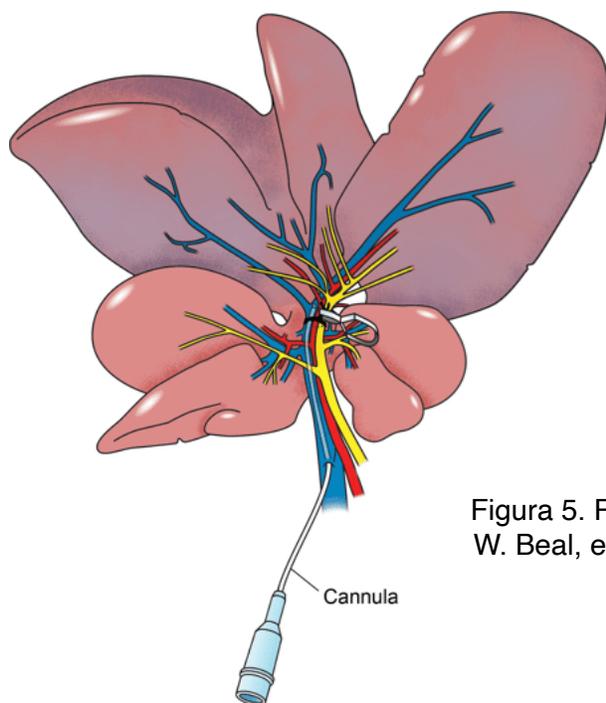


Figura 5. Proceso de perfusión del hígado. Fuente: Eliza W. Beal, et, al. Journal of Visualized Experiments, 2017.

6.5.- Fraccionamiento del hígado. El buffer para homogenizar consiste de sacaros 250 mM, 5 mM de MOPS y 1 mM de EDTA. El hígado se homogenizó y se fraccionó en 4 porciones: A, B, C y P (figura 6). La fracción A fue el sobrenadante resultante de centrifugar el homogenado a 2,000 x g para eliminar los núcleos y residuos; la fracción B fue el sobrenadante resultante de centrifugar la fracción A a 25,000 x g para eliminar los peroxisomas; la fracción C fue el sobrenadante resultante de centrifugar la fracción B a 100,000 x g para eliminar mitocondrias y microsomas, dejando sólo el citosol. El pellet resultante de la centrifugación a 25,000 x g es llamado fracción cruda peroxisomas (CPF), y se usó para aislar los peroxisomas usando un gradiente de iodixanol (fracción P), de acuerdo con las indicaciones del fabricante del kit de aislamiento de peroxisomas (Sigma Chemical Co.). Adicionalmente, también se usó un buffer hipotónico con sacarosa 25 mM para homogenizar el hígado con la intención de romper las membranas de los organelos, y centrifugando a 2,000 x g para eliminar los residuos (igual que la fracción A). Por lo tanto el sobrenadante representó el 100% de

la actividad total de la adenilato cinasa. Para la incubación con etanol y lactato (20 mM), las fracciones A, B y C se diluyeron a una proporción 1:1 con el mismo buffer homogenizador, mientras que la fracción P se diluyó a una concentración de proteína final de 1.3 mg/ml.

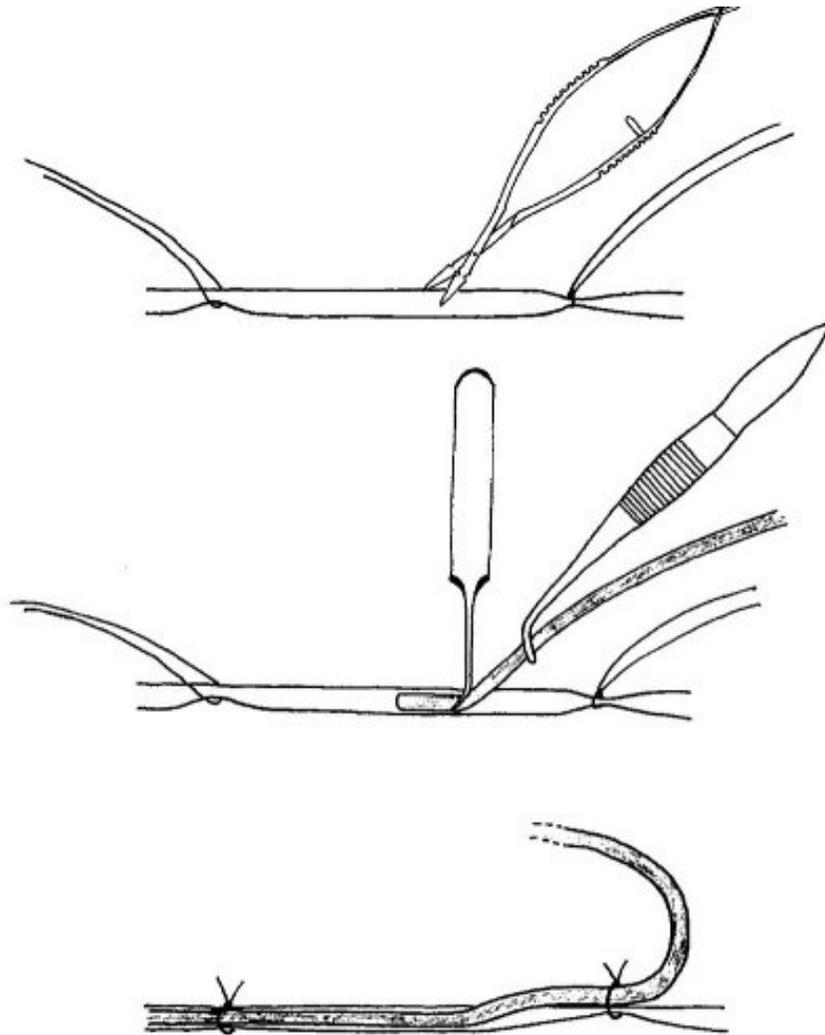


Figura 7. Proceso de canulación de la vena femoral. Fuente: Brian Jespersen et, al. Journal of Visualized Experiments. 2012.

6.6.- Ensayos enzimáticos

6.6.1.- **Uricasa:** la actividad de esta enzima se determinó incubando la fracción a determinar en presencia de 1 mM de urato de potasio por 10 min a 37°C. Se tomaron

muestras cada 2 minutos y el urato restante se midió con un kit en el espectrofotómetro (Spinreact, Gerona, España).

6.6.2.- **Succinato deshidrogenasa:** la actividad se midió a temperatura ambiente en 1.25 ml de buffer de fosfato de potasio 75 mM, pH 7.4; succinato 48 mM; KCN 2 mM; diclorofenolindofenol 0.06 mM (DCPIP) y fenazina metosulfato 1.08 mM. La reacción se inició adicionando 5 μ l de la fracción deseada, y la desaparición del DCPIP oxidado se observó a 600 nm en el espectrofotómetro [21].

6.6.3.- **Catalasa:** la actividad se midió a temperatura ambiente en buffer de fosfato de potasio 75 mM, pH 7.4. La reacción se inició al adicionar 30 mM de H₂O₂. La incubación duró 2 minutos y se midió la desaparición de H₂O₂ en el espectrofotómetro a 240 nm [22].

6.6.4.- **Adenilato cinasa:** la actividad se midió a temperatura ambiente incubando el homogenado (5 μ l) en 1 ml de buffer TEA 100 mM, pH 7.5; 130 mM KCl; 6.2 mM MgSO₄; 1.7 mM glucosa; 0.2 mM NADP; 5 U de hexocinasa y 4 U de G6PD. La reacción se inició adicionando 1.3 mM de ADP. La aparición de NADPH por la oxidación de la glucosa-6-fosfato se determinó en el espectrofotómetro a 340nm [23].

6.7.- **Cirugía y canulación:** Debido a la naturaleza del experimento in vivo, no fue posible usar ratas despiertas ni anestesiadas, por lo que optamos por usar ratas muertas cerebralmente. El procedimiento consistió en anestesiarse a la rata con pentobarbital y realizar una traqueostomía (la cual se describió previamente [24]). Una vez intubada, la rata fue desnucada e inmediatamente conectada a un respirador artificial. Esto asegura que no se despierte ni vaya a morir por un paro respiratorio. Posteriormente la vena femoral se canuló como se describió [25] (Figura 7). La cánula se une a una conexión Luer-Lok hembra.

6.8.- **Administración de sustratos:** El etanol (2 M en salina) se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 8 ml/kg, dejando pasar 20 minutos para que se

distribuyera por todo el cuerpo. Después de tomar la primera muestra, se administró inmediatamente solución salina (para el control) o alguno de los tres azúcares. Los azúcares se administraron a una dosis de 8 milimoles/kg/h disueltos en solución salina. Esta dosis es la misma que ha sido usada en experimentos con humanos [4].

6.9.- Toma de sangre: Se tomaron entre 150 y 160 μ l de sangre, cada 15 minutos de la vena femoral con una jeringa Luer-Lok macho con capacidad de 250 μ l. La jeringa se lavó con solución salina con heparina después de tomar cada muestra para evitar la coagulación. Las muestras se centrifugaron y el plasma se desproteinizó con ácido perclórico (16%), añadiendo 30 μ l de ácido por cada 50 μ l de plasma. El sobrenadante resultante se usó directamente para medir metabolitos. Después de tomar cada muestra, el catéter se enjuagó con una jeringa de insulina conteniendo heparina disuelta en solución salina.

6.10.- Análisis estadístico: Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism, usando Anova de una vía, considerando $p < 0.05$ como significativo.

7.- Resultados y discusión

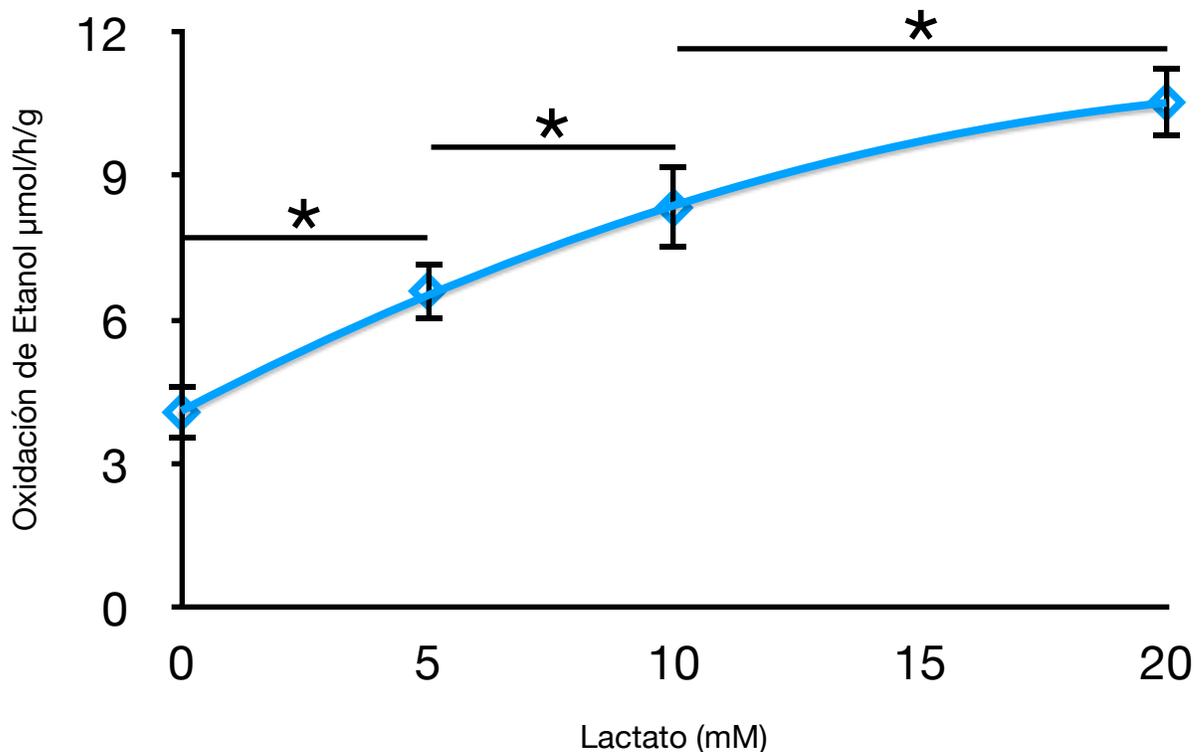
7.1.- Efecto del lactato

Como se muestra en la gráfica 1, el lactato incrementó la oxidación de etanol en las rebanadas de hígado en una relación dependiente de la concentración del lactato. El incremento promedio a 10mM de lactato fue de 4.28 μ mol/h/g en el estado de ayuno. En ausencia de ayuno, la estimulación fue más débil y no se inhibió por 4-metilpirazol (4-MP), que es un potente inhibidor de la ADH (Gráfica 2 A). Esto sugiere que la estimulación por el lactato es independiente de la ADH y por consecuencia, no se puede explicar por las dos hipótesis mencionadas.

Con el fin de determinar el papel de la catalasa, usamos aminotriazol, un inhibidor irreversible de esta enzima. El aminotriazol inhibió por completo la estimulación por lactato en estado de ayuno (gráfica 2 B), lo que sugiere que el mecanismo depende de

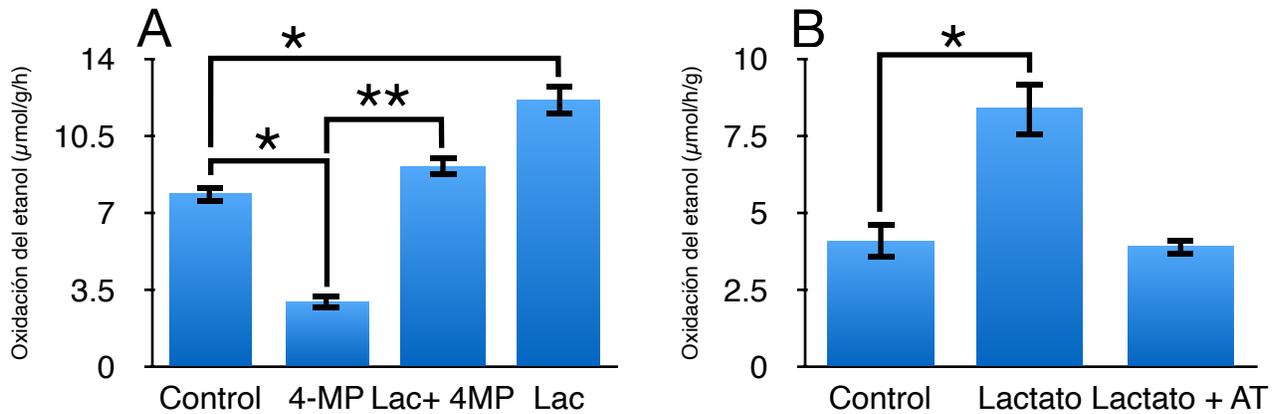
la catalasa y por consiguiente, de la producción de H_2O_2 . En vista de que el lactato parece estimular la oxidación de etanol por la producción de H_2O_2 , ello sugiere que la lactato oxidasa está catalizando la oxidación de lactato a piruvato, produciendo H_2O_2 . Se han reportado dos lactato oxidasas en el hígado de rata: una α -hidroxi ácido oxidasa peroxisomal capaz de oxidar el lactato a piruvato, generando H_2O_2 , reportada por de Duve & Baudhuin [26]; y una L-lactato oxidasa mitocondrial localizada en el espacio intermembranal, reportada por de Bari et al. [27]. Ya que estas son las únicas enzimas capaces de generar H_2O_2 a partir de lactato, nuestra atención se concentró en estos dos organelos.

Gráfica 1. Tasa de oxidación de etanol en rebanadas de hígado dependiente de la concentración de lactato. Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$



Para determinar el origen del H_2O_2 producido, el hígado se homogeneizó en buffer con sacarosa 250 mM y se fraccionó en 4 partes: A (completo, carente de debris y núcleos), B (carente de peroxisomas), C (carente de organelos) y P (peroxisomas purificados). Cada fracción fue incubada en presencia de etanol (10 mM) con o sin lactato (20 mM).

En todas las fracciones se determinó el contenido de peroxisomas, mitocondrias y catalasa, mientras que la fracción C también fue analizada por su contenido de adenilato cinasa (Tabla 1). La uricasa se usó como marcador peroxisomal, la succinato deshidrogenasa como marcador mitocondrial, y la adenilato cinasa como marcador del espacio intermembranal de la mitocondria.



Gráfica 2. Tasa de oxidación de etanol en rebanadas de hígado. En el panel A (sin ayuno) se muestra el efecto del 4-MP en el metabolismo de etanol en presencia o ausencia de lactato. En el panel B (con ayuno) se muestra el efecto del aminotriazol en el metabolismo de etanol en presencia o ausencia de lactato (20 mM). Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$ vs. grupo control (sin adiciones). ** $p < 0.05$ vs. grupo 4-MP

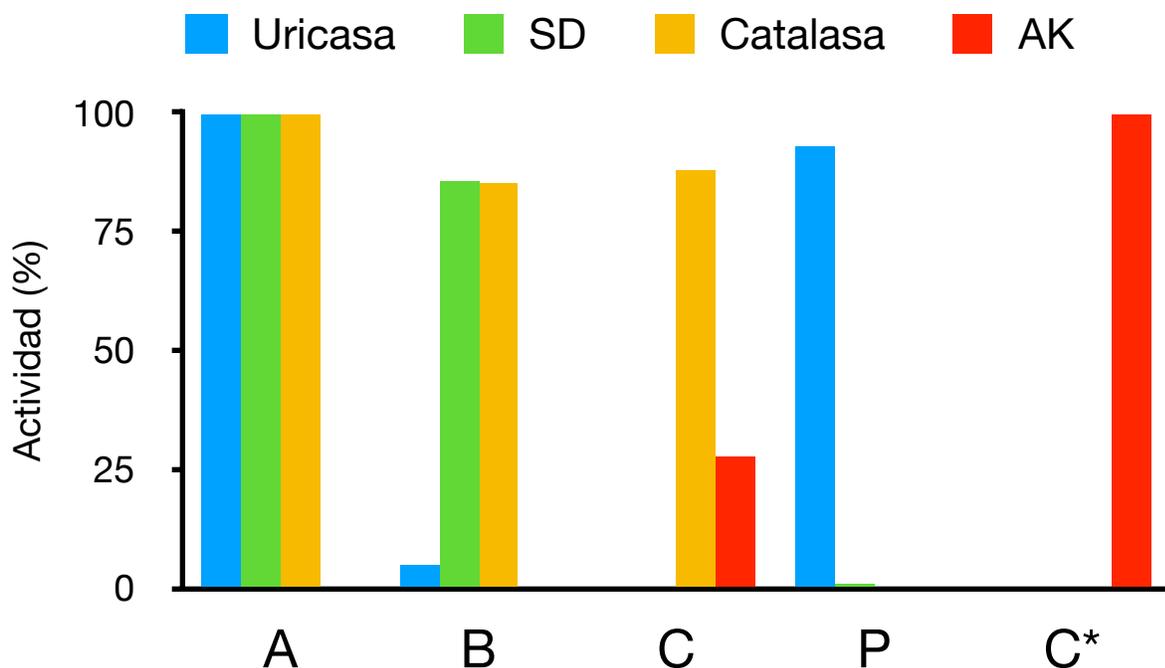
Consideramos las actividades enzimáticas de la fracción A como el 100% del total (gráfica 3). Es interesante notar que la fracción B carece de peroxisomas en comparación con la fracción A, aunque tiene un contenido similar de mitocondrias. A pesar de esto, la fracción B mostró una estimulación considerable en el metabolismo de etanol, aunque más pequeña que la fracción A (gráfica 4). Esto sugiere que los peroxisomas no son los principales productores de H_2O_2 , y también muestra que no son necesarios para observar el efecto. Sin embargo, los peroxisomas aislados (fracción P) son capaces de oxidar etanol en la presencia de lactato y su contribución es aproximadamente 30% del efecto total, lo que explica la diferencia en el estímulo entre las fracciones A (100% de peroxisomas) y B (carente de peroxisomas).

Tabla 1. Actividades de enzimas marcadoras por fracción. Actividades expresadas en U/g de tejido \pm E.E., donde una unidad cataliza 1.0 μ mol de sustrato por min.

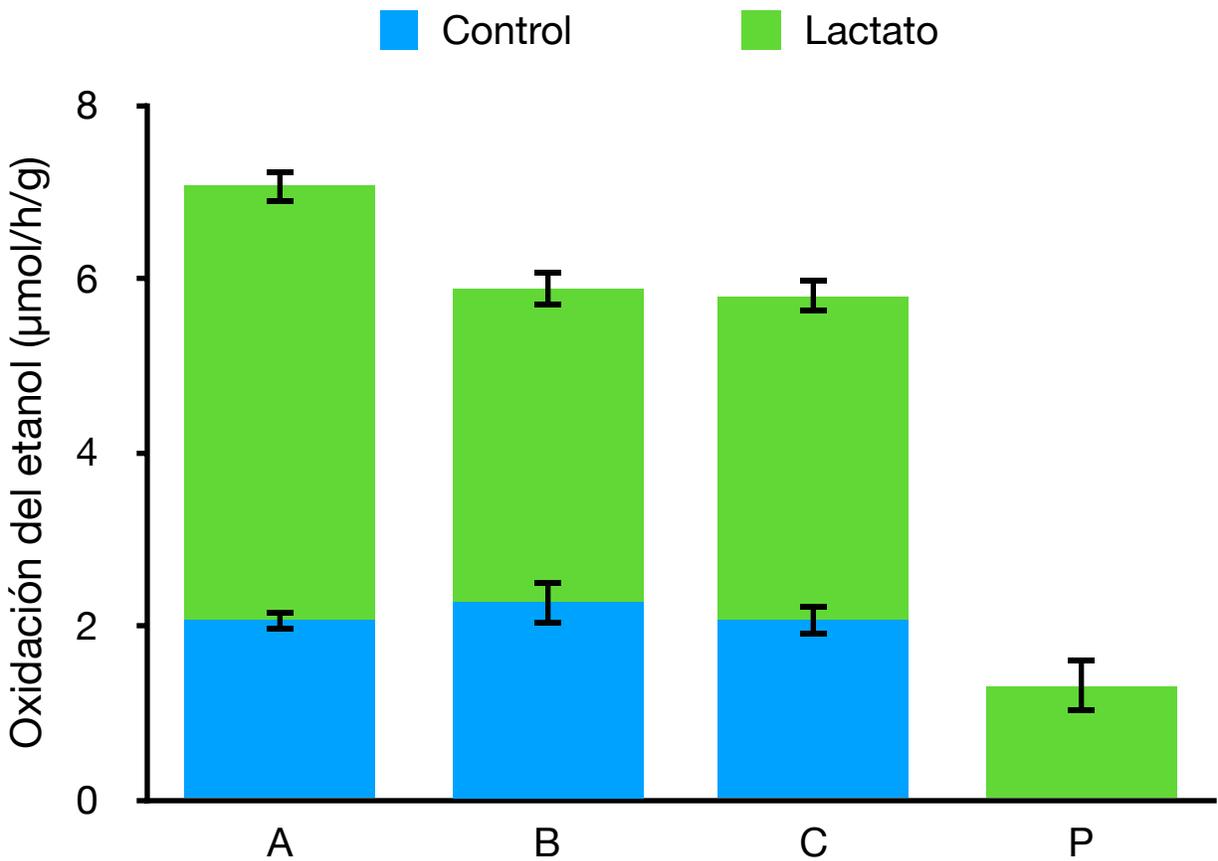
Fracción	Uricasa	Succinato deshidrogenasa	Catalasa	Adenilato cinasa
A	0.975 \pm 0.05	752 \pm 42	48371 \pm 1792	N.D.
B	0.0467 \pm 0.006	650 \pm 82	41331 \pm 1708	N.D.
C	0	0	42985 \pm 4073	12.02 \pm 0.29
P	0.92 \pm 0.1	7.3 \pm 1.4	N.D.	N.D.
C*	N.D.	N.D.	N.D.	43.3 \pm 2.

N.D. = No determinado

La fracción C no mostró actividades de succinato deshidrogenasa ni uricasa, pero mostró alta actividad de catalasa. Curiosamente, esta fracción también mostró estimular la oxidación de etanol debida al lactato, tan grande como la fracción B (gráfica 4), lo que sugiere que la mayoría del efecto del lactato proviene del citoplasma.



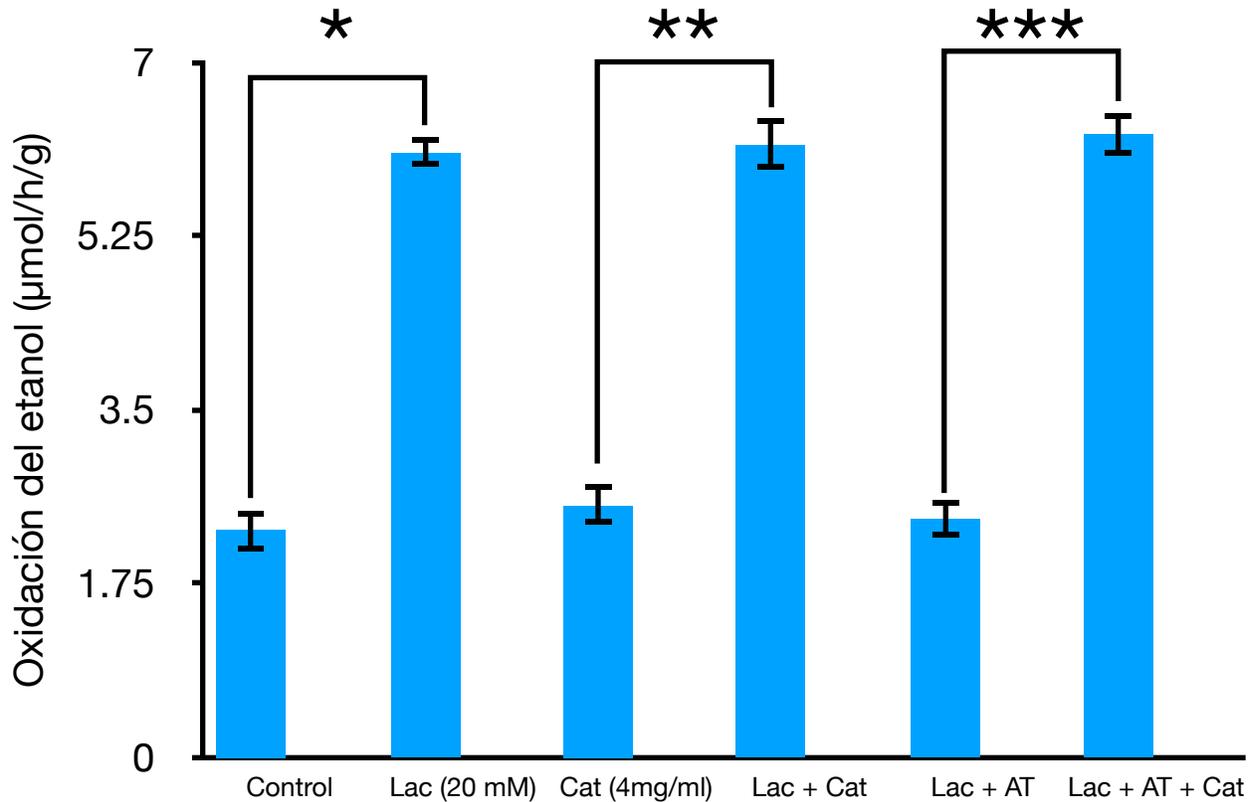
Gráfica 3. Proporción de la actividad de las enzimas marcadoras en las diferentes fracciones del homogenado. Los valores de la fracción A se consideran como el 100%. Estos valores fueron tomados de la tabla 1 y fueron expresados en porcentajes. Es importante notar que no todas las enzimas fueron determinadas en todas las fracciones (ver Tabla 1).



Gráfica 4. Tasa de oxidación de etanol en las diferentes fracciones de homogenado (n=4) en la presencia (verde) o ausencia (azul) de lactato (20 mM). Resultados son la media \pm E.E.

La lactato oxidasa mitocondrial se localiza en el espacio intermembranal [27], y debido a que la succinato deshidrogenasa es un marcador de la membrana interna mitocondrial, no provee información sobre la integridad de la membrana externa. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la membrana externa se rompa durante el fraccionamiento, liberando la lactato oxidasa al citosol [28]. Para descartar esta posibilidad, usamos la adenilato cinasa como marcador del espacio intermembranal. Usamos un buffer hipotónico con una concentración de sacarosa de 25mM para homogenizar el hígado y romper la membrana externa mitocondrial [29]. El homogenado se centrifugó de la misma manera que la fracción C y se le denominó fracción C*. Esta fracción contiene organelos rotos y su contenido de adenilato cinasa se consideró como el 100% del total. Como se muestra en la tabla 1, la actividad de la adenilato cinasa de la fracción C es 27.7% del de la fracción C*. Ya que alrededor del 20% del total de la actividad de la adenilato cinasa se encuentra en el citoplasma y

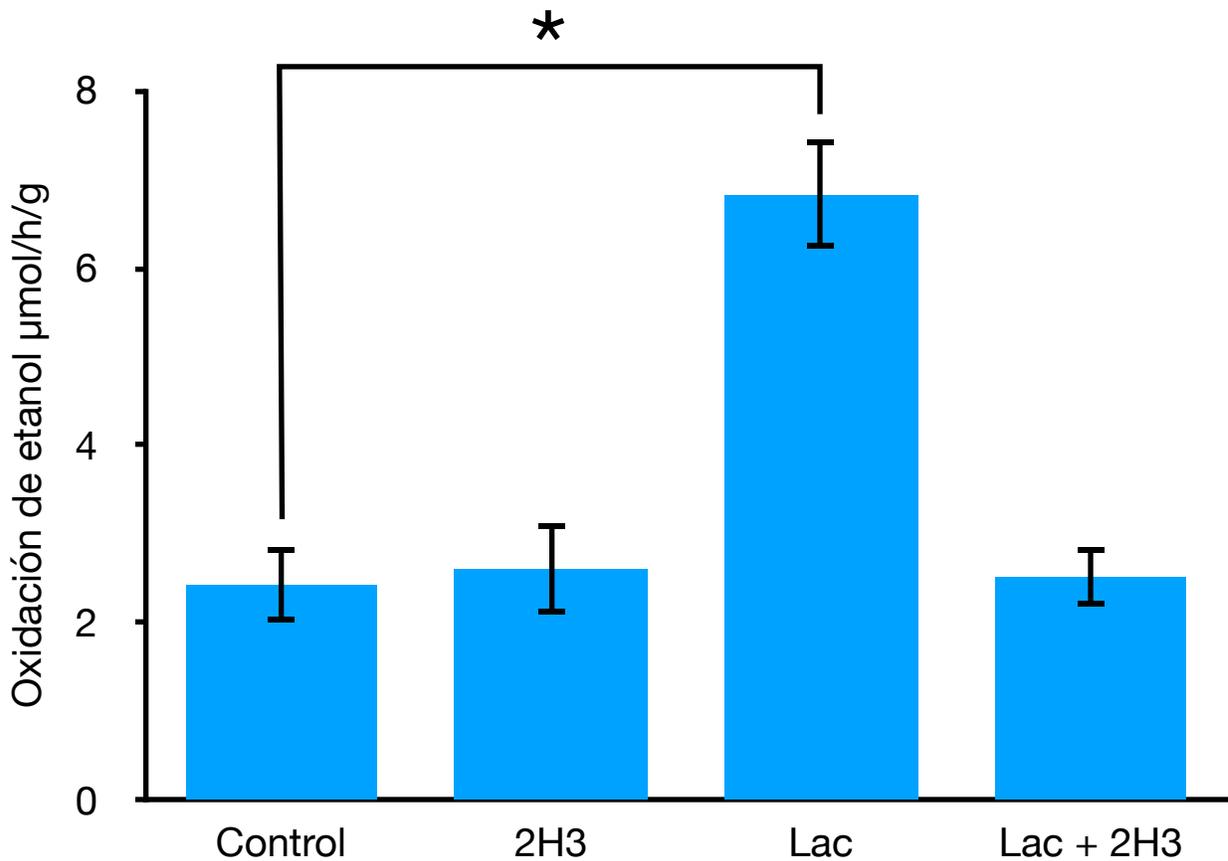
aproximadamente 70% se encuentra en la mitocondria [29], el valor obtenido es sólo ligeramente mayor al esperado. Por lo tanto puede concluirse que la fracción C no está contaminada de manera significativa con el contenido del espacio intermembranal de la mitocondria.



Gráfica 5. Tasa de oxidación de etanol en la fracción B (n=4) en presencia o ausencia de lactato (Lac), catalasa (Cat) y aminotriazol (AT). Resultados son la media \pm E.E. *p < 0.05 vs. grupo control (sin adiciones). **p < 0.05 vs. grupo Cat. ***p < 0.05 vs. grupo Lac + AT

Ya que el aminotriazol no es un inhibidor específico de la catalasa [30], era necesario descartar la posibilidad de que inhibiera el citocromo p450. Para esto tomamos ventaja de la capacidad del etanol de proteger a la catalasa de ser inhibida [31]. La fracción B se incubó en presencia de lactato 20mM y aminotriazol 10mM por 20 minutos para eliminar la catalasa presente, después de lo cual adicionamos etanol 10mM (gráfica 5). Posteriormente agregamos catalasa bovina (8-20 KU/ml). Debido a que hay etanol en el medio, éste evita que la catalasa bovina sea inhibida. Como se observa en la figura 5, la adición de catalasa restauró por completo el efecto del lactato, mientras que en la ausencia de lactato, la catalasa no modificó la tasa del metabolismo de etanol.

Finalmente, para demostrar que la enzima responsable del estímulo observado es la lactato oxidasa, usamos el 2-hydroxibut-3-inoato (2H3), un inhibidor específico, potente e irreversible que sólo afecta a las α -hydroxi acido oxidasas dependientes de flavina, incluyendo a la lactato oxidasa [32,33,34]. La fracción B se incubó en la presencia de 1 mM de 2H3 por 15 minutos para inhibir a la lactato oxidasa, después del cual adicionamos lactato y etanol (gráfica 6). Como se observa en la figura 5, la adición de 2H3 inhibió por completo el efecto del lactato, mientras que en ausencia de lactato, el 2H3 no tuvo ningún impacto en el metabolismo del etanol (gráfica 6).



Gráfica 6. Tasa de oxidación de etanol en fracción B del homogenado en presencia y ausencia de lactato (20 mM) y de 2-hidroxibut-3-inoato (2H3) (1 mM). Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$ vs. grupo control (sin adiciones).

7.2.- Discusión del efecto del lactato

El lactato duplicó la oxidación de etanol a una concentración de 10 mM. La inhibición de la ADH por 4-MP no inhibe la estimulación por lactato, por lo que el mecanismo es

independiente de esta enzima. Por otro lado el aminotriazol sí inhibió el efecto del lactato, lo que sugiere que el efecto es dependiente de la catalasa.

El aminotriazol también inhibió el efecto durante la incubación de la fracción B, pero éste fue restaurado al adicionar 8-20 KU/ml de catalasa bovina. Esto confirma que la catalasa es la única enzima capaz de oxidar al etanol, y que está involucrada en la estimulación debida al lactato. La adición de catalasa por sí sola (en ausencia de aminotriazol) no causó un incremento en el metabolismo del etanol en presencia o ausencia de lactato, mostrando que la catalasa no es limitante.

El 2H3 también inhibió el efecto del lactato durante la incubación con la fracción B. El 2H3 inhibe específicamente a las α -hidroxiácido oxidasas que contienen flavina como grupo prostético, lo que significa que este inhibidor no afecta a la LDH, la cual utiliza NADH [35]. Esto deja a la lactato oxidasa y a la lactato deshidrogenasa mitocondrial (mLDH) como las únicas enzimas dependientes de flavina capaces de oxidar al lactato. Sin embargo, la mLDH se encuentra sólo en las mitocondrias y es específica para D-lactato [36]. Puesto que el 2H3 no modifica el metabolismo del etanol por sí solo, es posible concluir que una lactato oxidasa es responsable de la estimulación por lactato observada en este estudio.

Los peroxisomas no fueron capaces de oxidar etanol en ausencia de lactato, pero sí en su presencia. Sin embargo, en la fracción B, la cual está casi libre de peroxisomas, hay un aumento importante en la oxidación del etanol con el lactato. La diferencia en el estímulo entre las fracciones A y B se puede atribuir a la presencia de peroxisomas en la fracción A, ya que la suma de los efectos de las fracciones B y P son iguales a la fracción A. Por lo tanto, los peroxisomas contribuyen de manera significativa al efecto del lactato, pero no son el sitio más importante. Como muestra la fracción C, las mitocondrias tampoco se requieren para el estímulo, y ya que la fracción C es citosol, esto sugiere que en el citoplasma se produce la mayoría del H_2O_2 generado por el lactato, mientras que los peroxisomas contribuyen alrededor del 30% del estímulo total.

La concentración normal de lactato en sangre está entre 0.5 y 2 mM [37] y se incrementa considerablemente durante el metabolismo del etanol [38], pudiendo alcanzar hasta una concentración de 15 mM en una condición conocida como acidosis láctica asociada al alcohol [39]. Durante el ejercicio el lactato aumenta aún más, alcanzando valores de hasta 25 mM [40]. Previamente se ha observado que el ejercicio puede incrementar el metabolismo de etanol [41], lo que podría deberse al incremento de lactato en sangre.

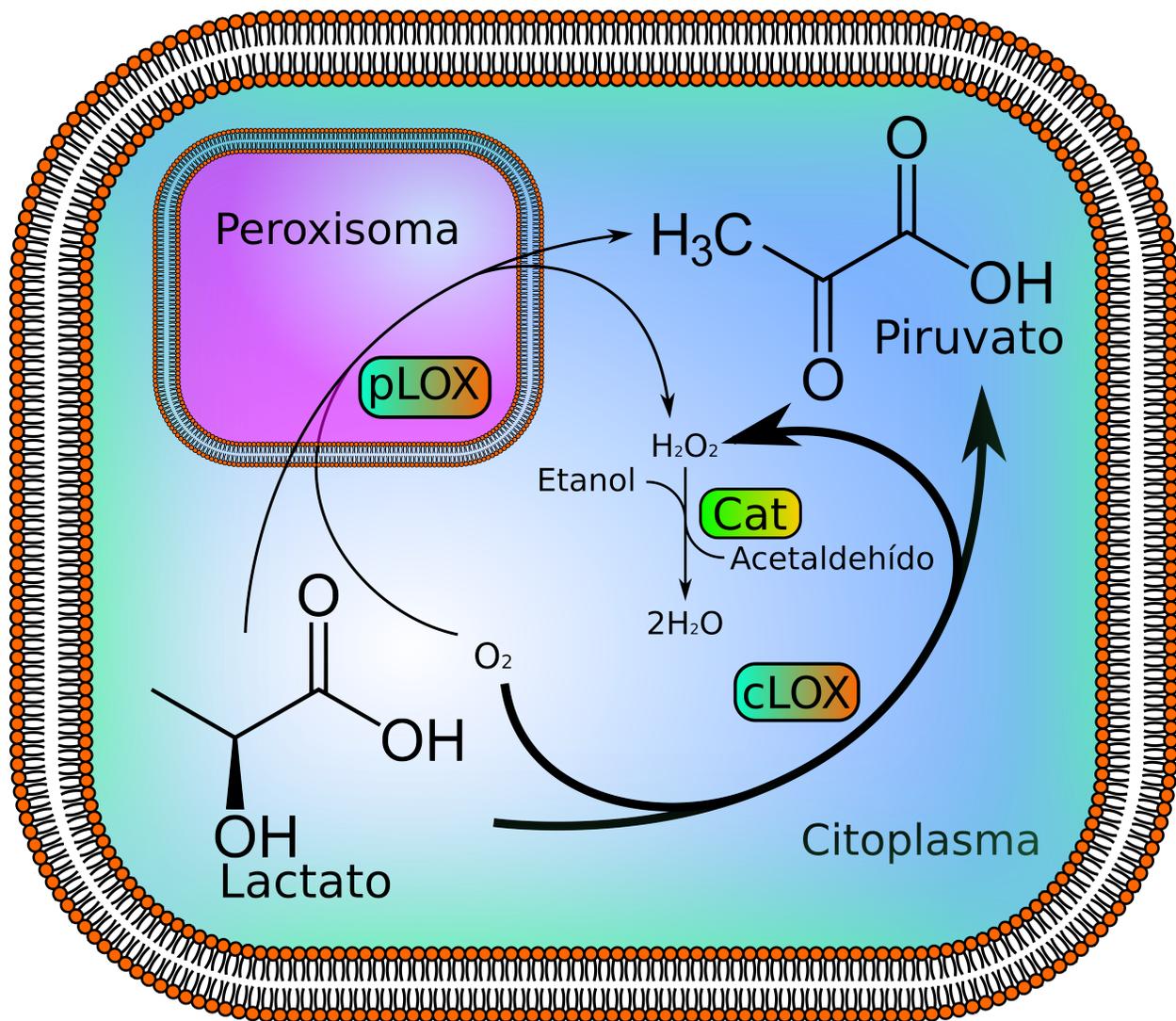


Figura 8. Mecanismo propuesto por el cual el lactato incrementa la oxidación de etanol.

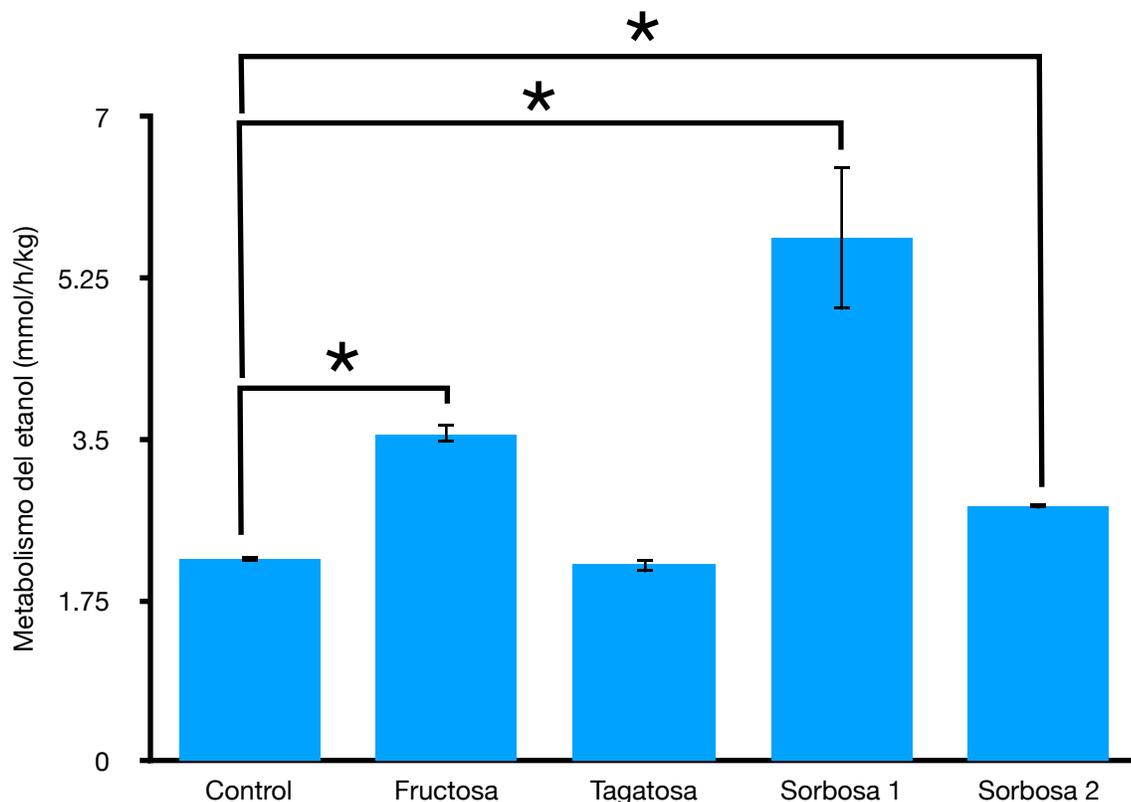
En conclusión, nuestros resultados indican que el lactato aumenta la oxidación de etanol a través de la catalasa, acoplado a la producción de H_2O_2 por la lactato oxidasa (LOx). La mayoría del H_2O_2 se genera en el citoplasma y una porción se genera en los peroxisomas.

7.3.- Perspectivas del efecto del lactato

Debido a que el H_2O_2 es una molécula reactiva, se presume que es deletérea para las células [42,43]. La razón por la cual existe una enzima que genera H_2O_2 a partir de un sustrato tan abundante no es clara; aunque generalmente se piensa que la función de la catalasa es eliminar el H_2O_2 y evitar que cause daño [42]. Sin embargo, ratones *knockout* para la catalasa y humanos que carecen de la enzima se desarrollan de manera normal y no parecen tener una mayor sensibilidad al estrés oxidativo [42,43]. Es sabido que el H_2O_2 puede funcionar como un segundo mensajero, incluyendo la señalización por insulina y la regeneración [44]; por lo tanto, la lactato oxidasa podría ser importante para la señalización por insulina durante el ejercicio o durante la regeneración hepática. Es también sabido que además de eliminar al H_2O_2 , la catalasa metaboliza varias moléculas, principalmente xenobióticos, en una reacción dependiente de H_2O_2 , llamada reacción peroxidática (la oxidación de etanol es un ejemplo) [45,46]. Por lo tanto, la principal función de la lactato oxidasa podría ser generar H_2O_2 de manera constante para mantener la reacción peroxidática activa de forma permanente. Por lo que es posible que la principal función de la catalasa sea participar en el metabolismo de los xenobióticos en el hígado además de impedir el estrés oxidativo.

7.4.- Resultados del efecto fructosa

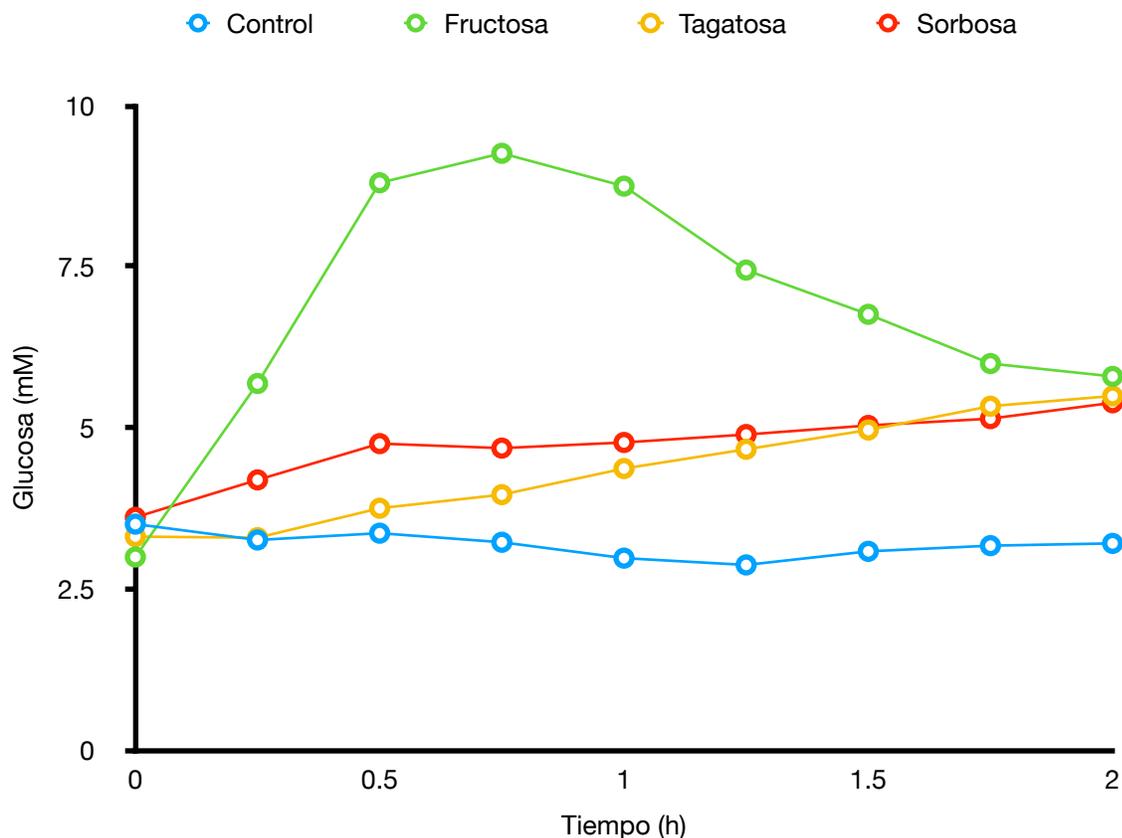
El metabolismo del etanol in vivo fue constante, con una tasa de 2.2 milimoles/h/kg (Gráfica 7 y figura suplementaria 3) para el control. Cuando se administró fructosa (8 milimoles/kg), la tasa aumentó a 3.56 milimoles/h/kg (incremento del 60%). Este incremento permaneció constante durante las dos horas que duró el experimento y se acompañó del aumento inmediato en la concentración de glucosa (Gráfica 8). Sin embargo, la tagatosa no modificó la tasa de metabolismo de etanol a pesar de que aumentó significativamente la concentración de glucosa en sangre.



Gráfica 7. Tasa de metabolismo de etanol in vivo en ausencia y presencia de azúcares. Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$ vs. grupo control (sin adiciones).

Por otro lado, la administración de sorbosa causó un aumento en la oxidación del etanol que, a diferencia de la fructosa, no fue constante. La sorbosa incrementó la tasa de metabolismo de etanol a 5.69 milimoles/h/kg (aumento de 158% comparado con el control), pero esta tasa sólo se mantuvo por 30 minutos. Durante el resto del experimento la tasa disminuyó a 2.77 milimoles/h/kg (26% sobre el control). Además, la

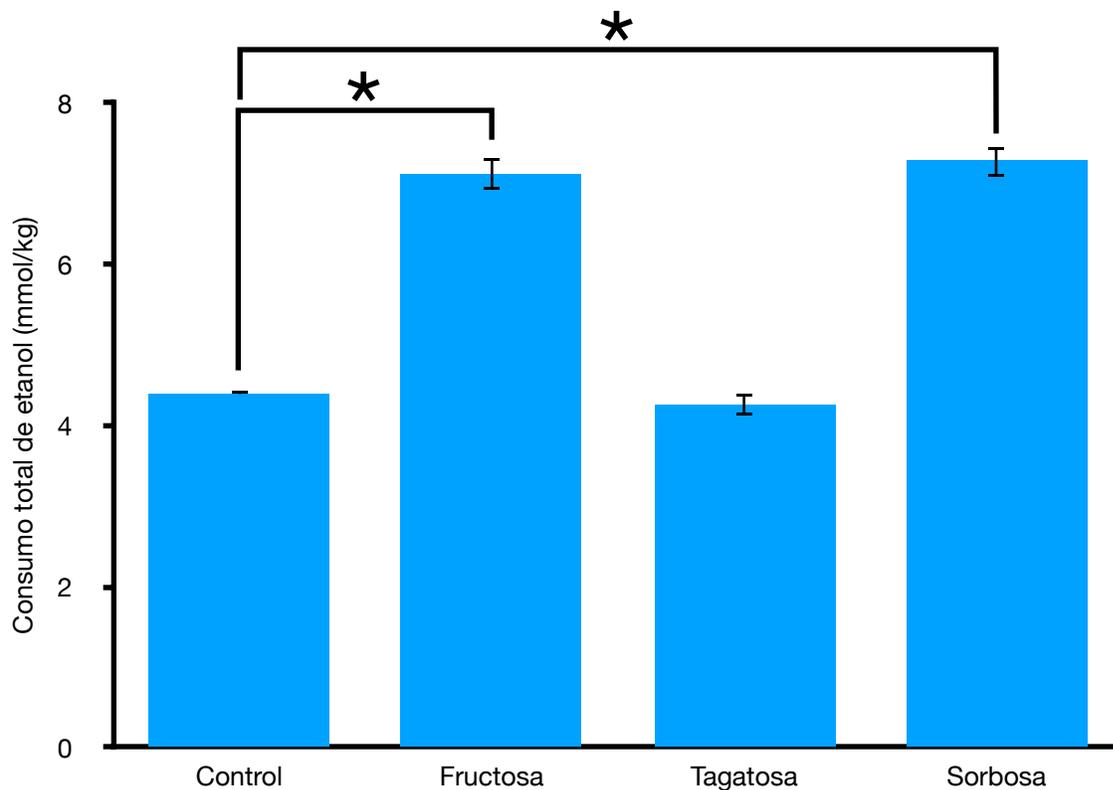
producción de glucosa sólo fue ligeramente mayor que lo observado con la tagatosa (Gráfica 8).



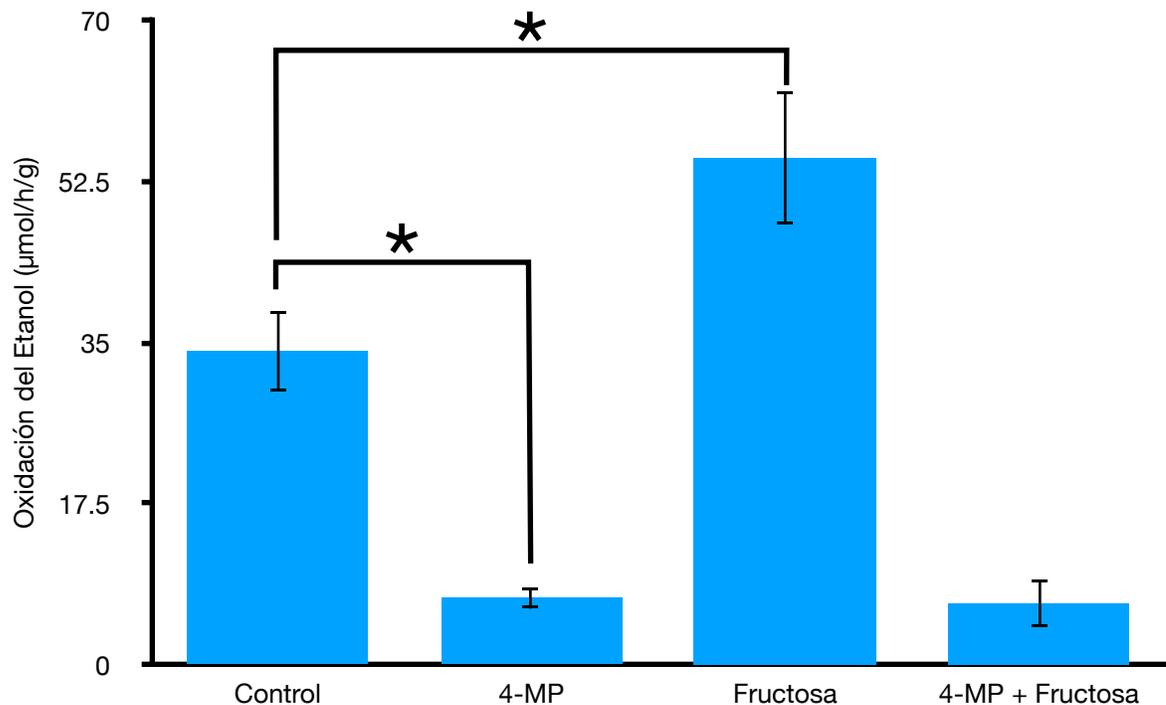
Gráfica 8. Concentración de glucosa en sangre en presencia de etanol (16 mmol/kg) y azúcares (8 milimoles/kg). El valor es respecto al tiempo de administración del azúcar o salina en caso del control.

Cuando se considera la cantidad total de etanol eliminado, se vuelve evidente que durante las dos horas del experimento, la fructosa y la sorbosa fueron igualmente efectivas en incrementar la oxidación del etanol. Como se observa en la gráfica 9, el grupo control consumió 4.4 milimoles/kg de etanol, mientras que en presencia de fructosa la cantidad total de etanol consumido fue de 7.12 milimoles/kg. La sorbosa, a pesar de un incremento inicialmente mayor, estimuló el consumo total de etanol a 7.28 milimoles/kg.

Cuando los hepatocitos se incubaron en buffer conteniendo etanol 10 mM y fructosa 10 mM, se observó un incremento de más del 50% en el metabolismo del etanol comparado con el control (Gráfica 10). El 4-MP, un potente inhibidor de la ADH (1 mM), redujo drásticamente el metabolismo del etanol e inhibió por completo el efecto fructosa, mostrando que el efecto depende de la ADH y, por lo tanto, de la oxidación del NADH. Por otro lado, el AOA, un inhibidor de la aspartato transaminasa (200 μ M [15]), redujo el metabolismo del etanol en 50% en ausencia de fructosa (Gráfica 11), lo que concuerda con reportes anteriores [15]. Esto es de esperar ya que la aspartato transaminasa es un componente esencial del transportador malato-aspartato, el cual es muy importante para la importación de equivalentes reductores a la mitocondria [15]. A pesar de esto, el AOA no afectó al efecto fructosa, lo que sugiere que es independiente de la cadena respiratoria.



Gráfica 9. Consumo total de etanol in vivo en ausencia y presencia de azúcares (8 milimoles/h/kg). Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$ vs. grupo control (sin adiciones). $n=4$.

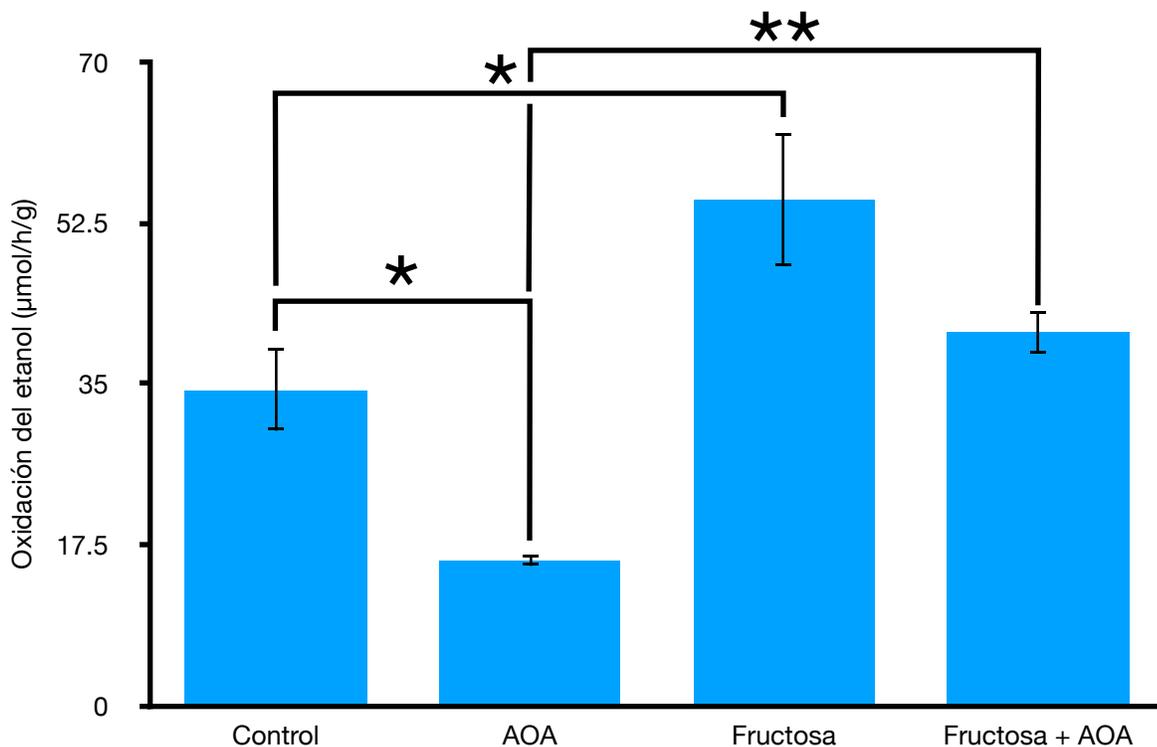


Gráfica 10. Tasa de metabolismo de etanol en hepatocitos en presencia y ausencia de fructosa (10 mM) y 4-MP (1 mM). Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$ vs. grupo control (sin adiciones). $n=4$

En otro experimento, evaluamos el efecto de la tagatosa en el metabolismo del etanol (Gráfica 12). La tagatosa es un epímero de la fructosa y se metaboliza de la misma manera. Sin embargo, la tagatosa-1-fosfato producida por la fructocinasa es metabolizada muy lentamente [47], lo que causa una baja producción de glucosa a partir de ella. A diferencia de la fructosa, la tagatosa no incrementó la velocidad de oxidación del etanol, lo que era de esperar, debido a su lento metabolismo comparado con el de la fructosa. La sorbosa es otro epímero de la fructosa y también se metaboliza más lentamente que la fructosa [48]. Sorprendentemente, la estimulación por sorbosa fue incluso mayor que la observada con fructosa, incrementando la oxidación del etanol a más del doble. La concentración de lactato se incrementó drásticamente al adicionar fructosa (Gráfica 13), alcanzando 1.6 mM al final del experimento comparado con 0.34 mM en el control.

La sorbosa, sin embargo, causó sólo un leve incremento en el lactato comparado con el control. Similar al lactato, la fructosa también aumentó drásticamente la producción

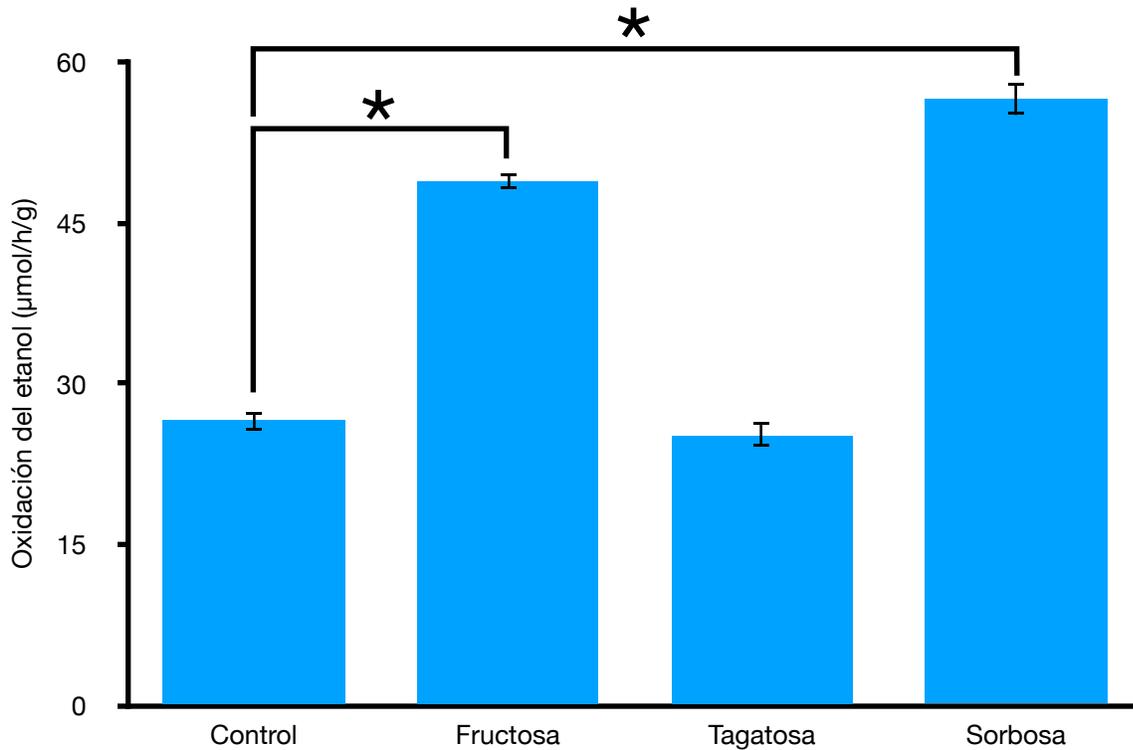
de glucosa comparada con el control (Gráfica 14). Aunque la producción de glucosa a partir de sorbosa y tagatosa es mayor al control, ésta es mucho menor que con fructosa, y no fue suficiente para que la tagatosa estimulara la oxidación de etanol. Debido a que la producción de glucosa a partir de sorbosa es igual que la de la tagatosa, y ya que la estimulación por sorbosa es mayor que con fructosa, esto contradice la idea de que la glucogénesis es relevante para el efecto.



Gráfica 11. Tasa de metabolismo de etanol en hepatocitos en presencia y ausencia de fructosa (10 mM) y AOA (200 µM). Resultados son la media ± E.E. *p < 0.05 vs. grupo control (sin adiciones). **p < 0.05 vs. grupo AOA. n=4

Por otro lado, la producción de glicerol fue la misma para la fructosa y la sorbosa, pero fue muy baja para la tagatosa (Tabla 2), mientras que fue indetectable en el control. No se pudo detectar sorbitol en el control ni en presencia de tagatosa (Tabla 2), lo cual es de esperar ya que la sorbitol deshidrogenasa no cataliza la reducción de la tagatosa [49]. Sin embargo, el sorbitol aumentó bastante en presencia de fructosa y especialmente en presencia de sorbosa, donde la producción de sorbitol fue el doble de

la observada con fructosa. En ausencia de etanol, no se pudo detectar la presencia de glicerol ni de sorbitol.

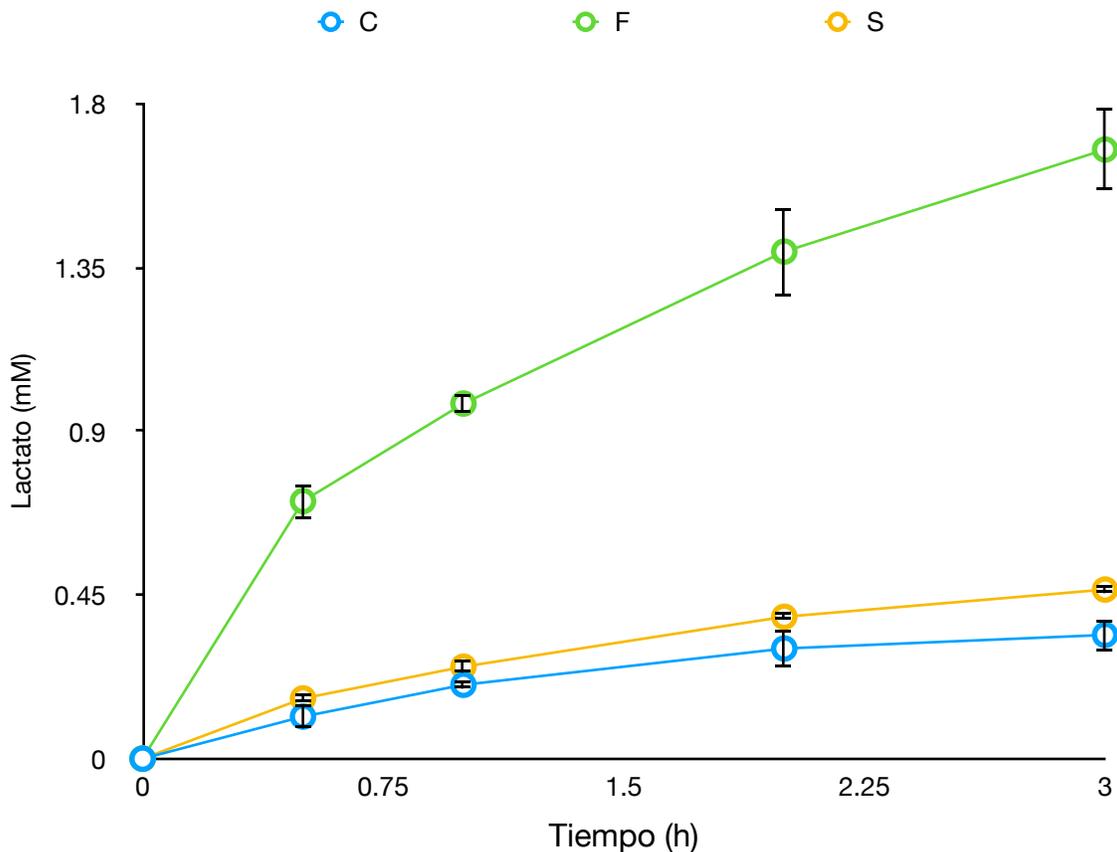


Gráfica 12. Tasa de metabolismo de etanol en hepatocitos en presencia de fructosa, tagatosa y sorbosa (todos a 10 mM). Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$ vs. grupo control (sin adiciones). $n=4$

La cantidad de glicerol-3-fosfato aumentó con los tres azúcares, siendo máxima con la sorbosa (Tabla 3). Sin embargo, contrario a los otros metabolitos, la cantidad de G3P permaneció constante durante todo el experimento y, por lo tanto, no se pudo determinar una tasa de producción. Cuando se usó el 4-MP para inhibir a la ADH, no se pudo detectar glicerol en presencia de fructosa (Tabla 4). Debido a que la ADH es necesaria para producir NADH, usamos xilitol (10 mM) en vez de etanol como fuente de NADH. En presencia de xilitol, nuevamente se produjo glicerol a partir de la fructosa, aunque a una tasa menor que en presencia de etanol, pero al usar 4-MP para inhibir la ADH, no se observó ningún cambio en la producción de glicerol, sugiriendo que la ADH no está involucrada en la producción de glicerol.

7.5.- Discusión del efecto fructosa

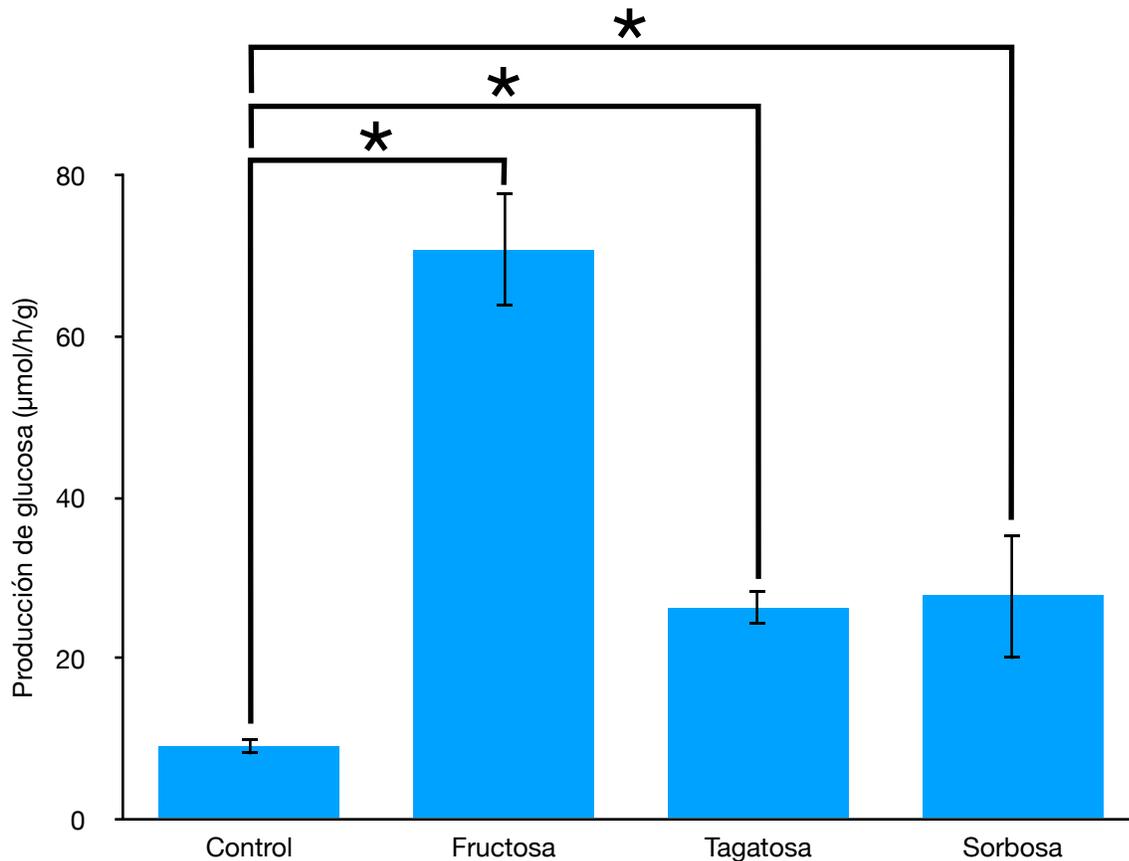
De los 3 azúcares probados, sólo la fructosa y la sorbosa estimularon el metabolismo de etanol tanto in vitro como in vivo (ver imagen suplementaria 2). Esto es de esperarse, ya que el metabolismo de la tagatosa es considerablemente más lento que el de la fructosa [48], lo que es evidenciado por la baja producción de glucosa, glicerol, G-3-P y lactato. La completa inhibición del efecto fructosa por 4-MP muestra que este efecto es dependiente de la ADH, y, por lo tanto, del NADH.



Gráfica 13. Concentración de lactato en el medio en presencia de fructosa y sorbosa (ambos 10 mM). Resultados son la media \pm E.E. n=4

Se piensa que el mecanismo por el cual actúa la fructosa es a través de un incremento en la oxidación del NADH, principalmente a través de la glucogénesis [12]. Sin embargo, esta hipótesis ha sido contradicha por algunos autores [4,50,7,8,12]. Nuestros resultados muestran que el efecto fructosa se acompaña de un incremento

considerable en la producción de glucosa in vitro e in vivo, lo que apoya la teoría. Pero la sorbosa sólo causó un ligero incremento en la producción de glucosa, a pesar de que el estímulo en el metabolismo del etanol es igual que con la fructosa. Los resultados obtenidos con la sorbosa no soportan la teoría de que la glucogénesis es responsable del efecto fructosa.



Gráfica 14. Tasa de producción de glucosa en hepatocitos en presencia de fructosa, tagatosa y sorbosa (todos a 10 mM). Resultados son la media \pm E.E. * $p < 0.05$ vs. grupo control (sin adiciones). $n=4$

El aislamiento de los hepatocitos causa la depleción de los componentes del transportador malato-aspartato, lo que podría reducir el metabolismo del etanol respecto al hígado entero [12,13]. Se ha sugerido que la adición de lactato regenera los componentes de este transportador [13,14], y ya que la fructosa incrementa la producción de lactato, existía la posibilidad de que la fructosa estuviera actuando de este modo. Pero como se muestra en la gráfica 11, mientras que el AOA redujo el

metabolismo del etanol a la mitad en ausencia de fructosa, no afectó el efecto fructosa. Estos resultados contradicen la teoría de que el efecto fructosa funcione incrementando la actividad del transportador malato-aspartato. Igualmente importante, si este fuera el caso, el efecto no debería de existir in vivo. La falta de inhibición del efecto fructosa por el AOA también sugiere que es independiente de la glucogénesis, ya que un mecanismo que involucre una actividad incrementada de la cadena respiratoria por un consumo incrementado de ATP requeriría un aumento en el transporte de NADH hacia la matriz mitocondrial.

Tabla 2. Tasa de producción de glicerol y sorbitol en hepatocitos en presencia y ausencia de etanol y azúcares. Resultados son la media \pm E.E. *p < 0.05 vs. grupo control (sin adiciones).

Adiciones	Producción de Glicerol ($\mu\text{mol/g/h}$)		Producción de Sorbitol ($\mu\text{mol/g/h}$)	
	Con Etanol	Sin Etanol	Con Etanol	Sin Etanol
Control	0	0	0	0
Fructosa	12.54 \pm 1 *	0	9.6 \pm 1.15 *	0
Tagatosa	3.36 \pm 0.58 *	0	0	0
Sorbosa	13.45 \pm 1.7 *	0	19.65 \pm 2.25 *	0

Thieden et al. [7] propusieron una teoría en la cual el piruvato generado de la fructosa entra en un ciclo fútil en el que se convierte en malato, consumiendo una molécula de NADH y GTP en el proceso. El malato se convierte en piruvato y CO₂ y genera NADPH. Este NADPH es entonces consumido en otros procesos metabólicos, como la síntesis de ácidos grasos. Aunque esta teoría podría ser correcta para la fructosa debido a la considerable producción de lactato, no podría serlo para la sorbosa. La producción de lactato por sorbosa es muy baja, indicando que comparado con la fructosa, muy poca sorbosa es metabolizada en piruvato.

Sin embargo, contrario a la glucosa y al lactato, la producción de glicerol a partir de sorbosa es similar al de la fructosa. Como epímero de la fructosa, la sorbosa se metaboliza de la misma manera, con una excepción: cuando la sorbosa-1-fosfato se

rompe por la aldolasa, genera L-gliceraldehído, mientras que la fructosa genera D-gliceraldehído [51]. Contrario al D-gliceraldehído, la triosa cinasa no puede fosforilar al L-gliceraldehído [52], limitando su metabolismo a glicerol (por la ADH) o a glicerato (por la ALDH) [51]. La baja producción de lactato y glucosa es de esperar por dos razones:

- 1) La fructocinasa tiene mayor Km y menor Vmax para la sorbosa que para la fructosa, haciendo el metabolismo de sorbosa más lento [53].
- 2) El L-gliceraldehído no puede ser convertido directamente a gliceraldehído-3-fosfato, debe convertirse a glicerol-3-fosfato o glicerato fosfato, y ambas rutas metabólicas están parcialmente inhibidas en la presencia de etanol [6,54,55].

Tabla 3. Cantidad de α -Glicerofosfato presente en el medio de los hepatocitos. Resultados son la media \pm E.E. *p < 0.05 vs. grupo control (sin adiciones).

Adiciones	α -Glicerofosfato ($\mu\text{mol/g}$)
Control	2.73 \pm 0.63
Fructosa	5.16 \pm 0.455 *
Tagatosa	4.25 \pm 0.21 *
Sorbosa	7.19 \pm 0.96 *

La presencia de un estímulo, la alta producción de glicerol y la baja producción de lactato y glucosa por parte de la sorbosa sugieren que la reducción del gliceraldehído a glicerol por la ADH es muy importante en el efecto fructosa. También sugiere nuevamente que la glucogénesis parece ser irrelevante para el efecto.

Mostramos que al inhibir la ADH con 4-MP en ausencia de etanol, la producción de glicerol se detuvo por completo, sugiriendo que la ADH está reduciendo el gliceraldehído a glicerol. Sin embargo, el glicerol no se acumula en ausencia de etanol, lo que significa que se requiere una fuente de NADH, y ya que el 4-MP inhibe a la ADH, también detiene la producción de NADH. Para evitar este problema, usamos xilitol como fuente de NADH [56]. El xilitol fue efectivo para incrementar la producción de glicerol en presencia de azúcares, confirmando que es necesaria una fuente de NADH.

La producción de glicerol en presencia de xilitol fue considerablemente menor comparado con etanol, lo que es de esperar, ya que el xilitol genera sólo una molécula de NADH mientras que el etanol genera dos (cuando llega a ácido acético). A pesar de esto y contrario al etanol, el 4-MP no modificó la producción de glicerol en presencia de xilitol.

Es importante notar que el 4-MP es un potente inhibidor de la clase I de ADH, pero no de las clases II, III y IV [57]. Ya que la ADH1 tiene 10 veces más afinidad por el etanol que por el gliceraldehído en la rata [7,58,59], y que la concentración de etanol usada (10 mM) es mucho mayor que la concentración de gliceraldehído presente (500 μ M) durante el metabolismo de la fructosa [7], no sería posible que esta enzima tuviera relevancia en la reducción del gliceraldehído cuando hay etanol presente. Las otras clases de ADH tienen baja afinidad por el etanol, por lo que serían mejores candidatos para la reducción del gliceraldehído.

Tabla 4. Tasa de producción de glicerol en hepatocitos en presencia y ausencia de etanol, 4-MP y xilitol. Resultados son la media \pm E.E. *p < 0.05 vs. grupo control (sin fructosa).

Adiciones	Tasa de Producción de Glicerol (μ mol/g/h)				
	Control	Etanol	Etanol + 4-MP	Xilitol	Xilitol + 4-MP
Ninguna	0	0	0	0	0
Fructosa	0	12.5 \pm 1 *	0	4.8 \pm 0.6 *	4.8 \pm 0.85 *

El gliceraldehído también puede ser reducido a glicerol por la aldosa reductasa (también llamada aldehído reductasa), ya que esta enzima tiene una alta afinidad por la molécula [60]. Pero ya que el etanol y el xilitol generan NADH y no NADPH (el cual es requerido por esta enzima), esta posibilidad parecería no ser viable. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis d) de la figura 4, podría haber una conexión entre la producción de NADH y NADPH a través de la enzima málica y la malato deshidrogenasa. Debido a esto, el posible papel de la aldosa reductasa no puede ser descartado.

Sin embargo, algunos autores proponen que la actividad del transportador malato-aspartato, y no la actividad de la cadena respiratoria, es lo que limita la oxidación del NADH en la mitocondria en hepatocitos aislados [13,14]. Esto significa que la glucogenesis podría ser importante in vivo pero no in vitro. Aún si este es el caso, la reducción de la fructosa a sorbitol y del gliceraldehído a glicerol consumen 1 molécula de NADH, mientras que la síntesis de una molécula de glucosa a partir de fructosa consume 2 ATPs. El mayor consumo de energía y el consumo directo de NADH harían de la reducción de la fructosa y el gliceraldehído mejores vías que la glucogénesis. Debido a ésto, estas vías podrían ser más importantes incluso aunque la glucogénesis tuviera importancia in vivo.

En conclusión, mostramos que el efecto fructosa funciona por la reducción de fructosa a sorbitol y de gliceraldehído a glicerol, ambas siendo reacciones que consumen NADH directamente (Figura 9). La glucogénesis no parece tener importancia en las condiciones usadas.

7.6.- Perspectivas del efecto fructosa

En diferentes ensayos realizados se ha demostrado que la administración de la fructosa tiene un efecto potenciador que acelera el metabolismo de etanol in vivo. Este efecto plantea la posibilidad de utilizar a la fructosa (o incluso a la sorbosa) como un agente terapéutico en condiciones de envenenamiento (intoxicación) por alcohol.

Sin embargo, antes de plantear el uso de este azúcar en el ámbito clínico, existen algunos aspectos que son necesarios de dilucidar. Uno de estos es la forma en que el metabolismo de fructosa interactúa con el metabolismo de etanol una vez que son administrados en humanos, ya que a pesar de la gran cantidad de información obtenida de modelos animales, hay carencia de estudios en humanos. Además, aún existen preocupaciones sobre los posibles efectos adversos de la administración de una dosis grande de fructosa, tal como el incremento del ácido úrico en la sangre.

También es necesario determinar por qué no todas las personas responden a la administración de la fructosa, ya que se ha observado, tanto en experimentos controlados como no controlados, que el efecto fructosa puede ser muy impredecible tanto en frecuencia como en efectividad, lo que ha impedido que se adopte su uso en la clínica.

Estos estudios ayudarían a comprender aún mejor el metabolismo de la fructosa y su interacción con el etanol, lo que permitiría establecer estrategias para tratar la intoxicación por alcohol de manera efectiva.

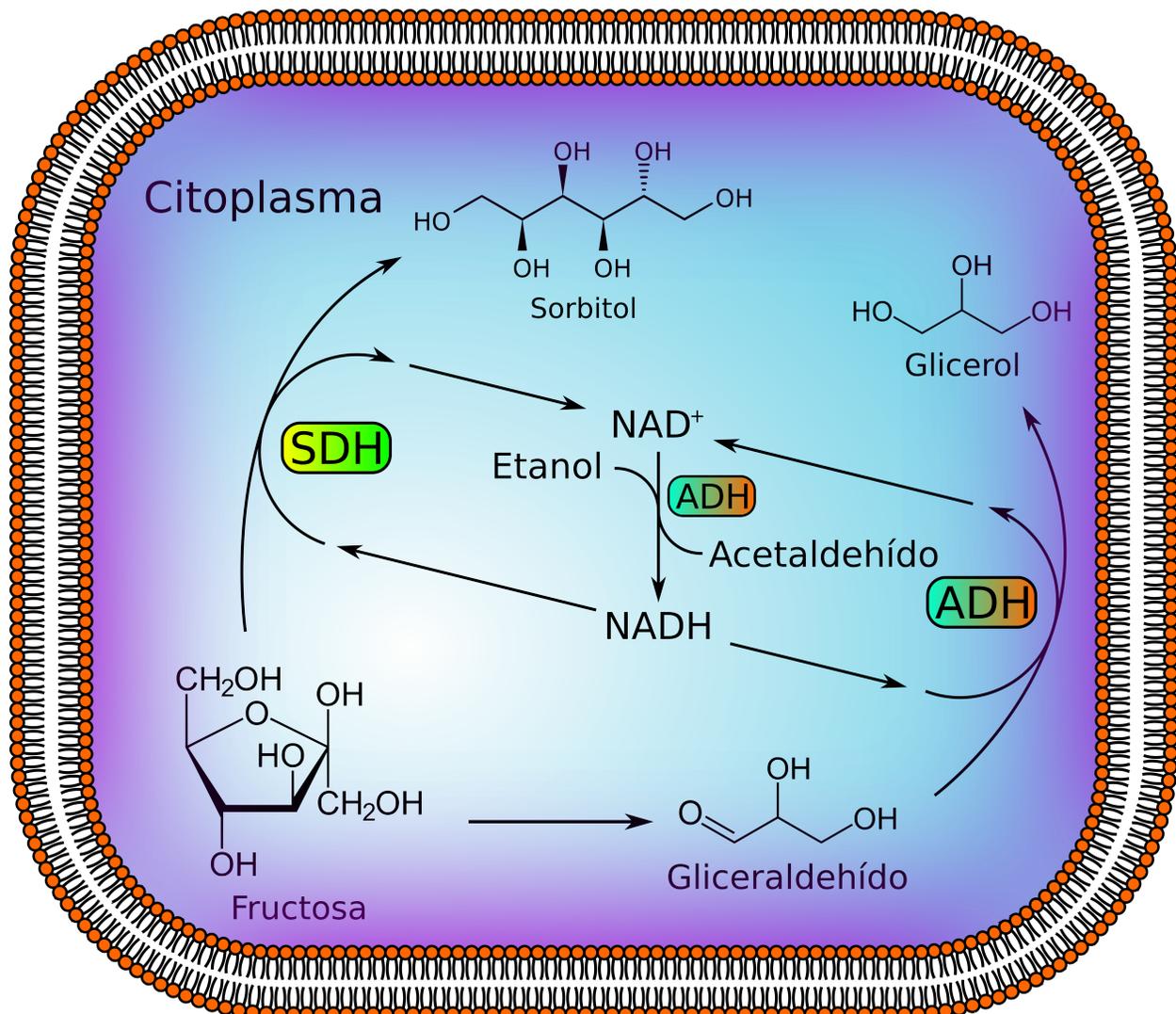
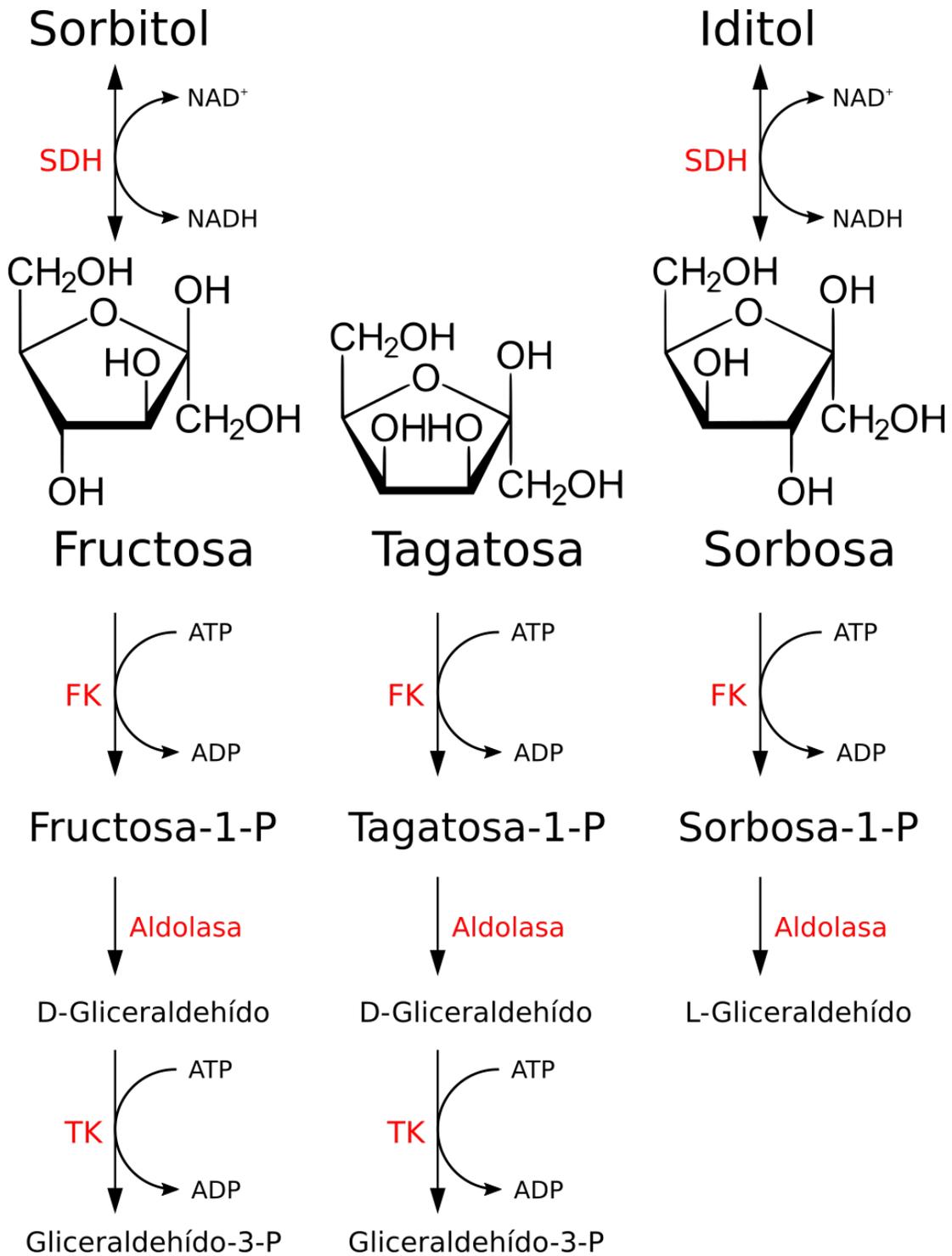
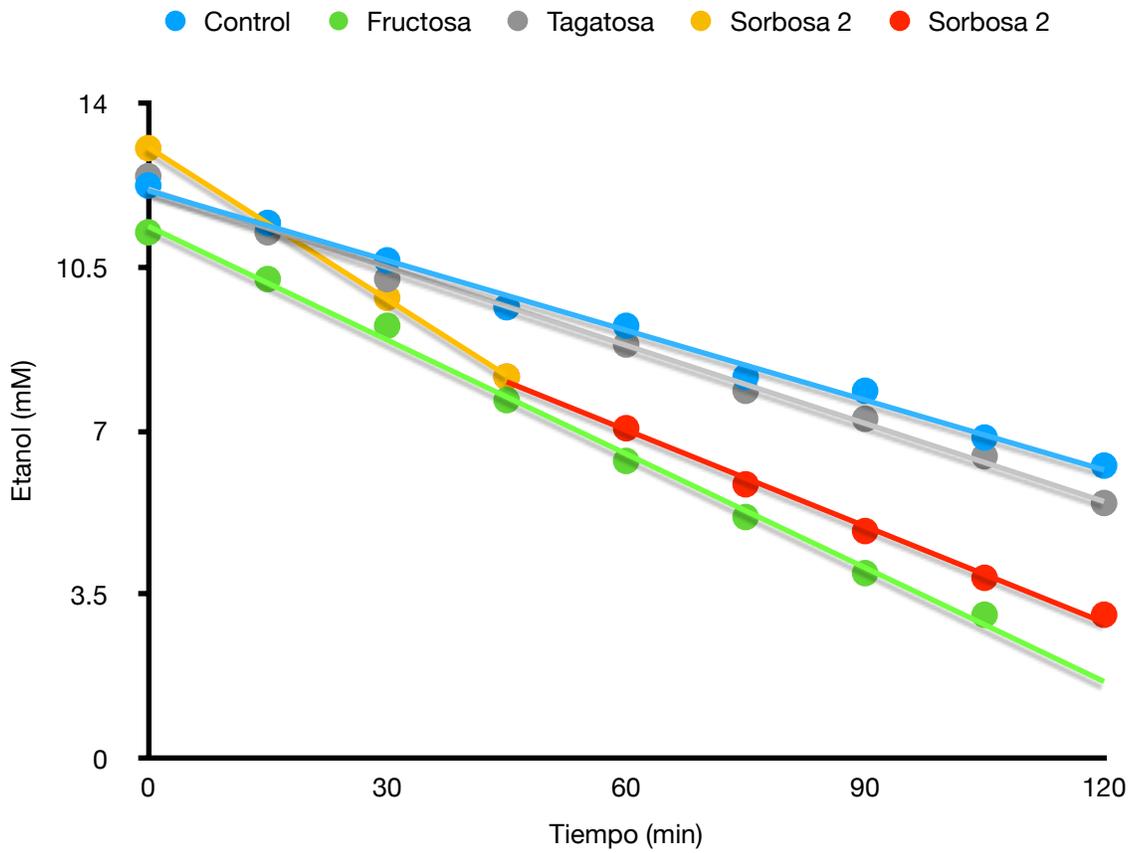


Figura 9. Mecanismo propuesto por el cual la fructosa incrementa la oxidación de etanol.



S2: estructura de la fructosa, tagatosa y sorbosa, así como las diferencias en su metabolismo. Ver nomenclatura en S1.



S3: Concentración de etanol en sangre en ausencia (control) y presencia de fructosa, tagatosa y sorbosa (todos a una dosis de 8 milimoles/kg). La condición con sorbosa está dividida en dos rectas.

8.- Referencias

- 1.- Cederbaum AI. (2012). Alcohol Metabolism. Clin Liver Dis 16(4): 667-685.
- 2.- Lieber CS. (1999). Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The first 30 years (1968-1998)-A review. Alcohol Clin Exp Res 23(6): 991-1007.
- 3.- Li TK. (2012). The absorption, distribution and metabolism of ethanol and its effects on nutrition and hepatic function. Control of ethanol and acetaldehyde metabolism in liver. 64-67. Chapter 3. In Medical and social aspects of alcohol abuse. Tabakoff B, Sutker PB, Randall CL., Eds. Plenum Press.
- 4.- Mascord D, Smith J, Starmer GA, Whitfield JB. (1991). The effect of fructose on alcohol metabolism and on the [Lactate]/[Pyruvate] ratio in man. Alcohol Alcohol 26(1): 53-59.
- 5.- Grunnet N, Quistorff B, Thieden HID. (1973). Rate-limiting factors in ethanol oxidation by isolated rat liver parenchymal cells. Eur J Biochem 40: 275-282.
- 6.- Tygstrup N, Winkler K, Lundquist F. (1965). The Mechanism of the fructose effect on the ethanol metabolism of the human liver. J Clin Invest 44: 817-830.
- 7.- Thieden HID, Grunnet N, Damgaard SE, Sestoft L. (1972). Effect of fructose and glyceraldehyde on ethanol metabolism in human liver and in rat liver. Eur J Biochem 30: 250-261.
- 8.- Berry MN, Kun E. (1978). Ethanol oxidation by isolated rat-liver cells. Stimulatory effects of fructose. Eur J Biochem 89: 237-241.
- 9.- Damgaard SE, Lundquist F, Tonnessen K, Hansen FV, Sestoft L. (1973). Metabolism of ethanol and fructose in the isolated perfused pig liver. Eur J Biochem 33(1): 87-97.

- 10.- Westerfeld WW, Stotz E, Berg RL. (1942). The role of pyruvate in the metabolism of ethyl alcohol. *J Biol Chem* 144: 657-665.
- 11.- Westerfeld WW, Stotz E, Berg RL. (1943). The coupled oxidation-reduction of alcohol and pyruvate in vivo. *J Biol Chem* 149: 237-243.
- 12.- Scholz R. Mechanism of the fructose effect on ethanol oxidation. In *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Vol III: Intermediary Metabolism and Neurochemistry*. Thurman RG, Williamson JR, Drott HR, Chance B, Eds., Academic Press, New York, 1977, pp. 305-312.
- 13.- Crow KE, Cornell NW, Veech RL. (1977). Lactate-stimulated ethanol oxidation in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 172: 29-36.
- 14.- Meijer AJ, van Woerkom GM, Williamson JR, Tager JM. (1975). Rate-limiting factors in the oxidation of ethanol by isolated rat liver cells. *Biochem J* 150: 205-209.
- 15.- Krebs HA, Stubbs M. (1975). Factors controlling the rate of alcohol disposal by the liver. In *Alcohol intoxication and withdrawal II* (Gross M. ed.), Plenum Press pp. 149-161.
- 16.- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002). The regulation of cellular respiration is governed primarily by the need for ATP. Chapter 18, 18.6. *Biochemistry* 5th edition. W H Freeman.
- 17.- Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. (1991). Isolated hepatocytes: Preparation, properties and applications. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 21, 1st Ed. Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ, Eds., Elsevier, pp. 15-52.

18.- Strober W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol Appendix 3.

19.- Poklis A, Mackell MA. (1982). Evaluation of a modified alcohol dehydrogenase assay for the determination of ethanol in blood. Clin Chem 28: 2125-2127.

20.- Hamilton SD, Pardue HL. (1984). Quantitation of lactate by a kinetic method with an extended range of linearity and low dependence on experimental variables. Clin Chem 30: 226-229.

21.- King TE. (1967). Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. Methods Enzymol 10: 322-331.

22.- Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Jha V, Switala J, Loewen PC. (2008). Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). Arch Biochem Biophys 471: 207-214.

23.- Criss WE. (1970). Rat liver adenosine triphosphate: adenosine monophosphate phosphotransferase activity. II. Subcellular localization of adenylate kinase isozymes. J Biol Chem 245: 6352-6356.

24.- Ghali MGZ. (2018). Microsurgical technique for tracheostomy in the rat. MethodsX 5: 61-67.

25.- Jespersen B, Knupp L, Northcott CA. (2012). Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements. J Vis Exp 59: 3496.

26.- Schneider WC, Hogeboom GH. (1950). Intracellular distribution of enzymes: V. further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. J Biol Chem 183: 123-128.

- 27.- Das AK. (1992). Biosynthesis of glycerolipid precursors in rat liver peroxisomes and their transport and conversion to phosphatidate in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267: 9724-9730.
- 28.- Graham JM. (2002). Preparation of crude subcellular fractions by differential centrifugation. *ScientificWorldJournal* 2: 1638-1642.
- 29.- Sigma Technical Bulletin: Peroxisome Isolation Kit.
<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/perox1bul.pdf>
- 30.- Criss WE. (1970). Rat liver adenosine triphosphate: Adenosine monophosphate phosphotransferase activity. *J Biol Chem* 245: 6352-6356.
- 31.- Sawhney SK, Singh R. (2005). *Introductory practical biochemistry*. Alpha Science; 2nd ed. pp. 174-176.
- 32.- Ghisla S, Ogata H, Massey V, Schonbrunn A, Abeles RH, Walsh CT. (1976). Kinetic studies on the inactivation of L-lactate oxidase by [the acetylenic suicide substrate] 2-hydroxy-3-butynoate. *Biochemistry* 15: 1791-1797.
- 33.- Cromartie TH, Walsh C. (1975). Mechanistic studies on the rat kidney flavoenzyme L-alpha-hydroxy acid oxidase. *Biochemistry* 14: 3482-3489.
- 34.- Cromartie TH, Walsh CT. (1975). Rat kidney L-alpha-hydroxy acid oxidase: isolation of enzyme with one flavine coenzyme per two subunits. *Biochemistry* 14: 2588-2596.

- 35.- Kaback HR, Reeves JP, Short SA, Lombardi FJ. (1974). Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles: VXIII. The mechanism of action of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone. Arch Biochem Biophys 160: 215-222.
- 36.- de Bari L, Atlante A, Guaragnella N, Principato G, Passarella S. (2002). D-Lactate transport and metabolism in rat liver mitochondria. Biochem J 365: 391-403.
- 37.- Kraut JA, Madias NE. (2014). Lactic acidosis. New Engl J Med 371: 2309-2319.
- 38.- Kreisberg RA, Owen WC, Siegal AM. (1971). Ethanol-induced hyperlacticacidemia: inhibition of lactate utilization. J Clin Invest 50: 166-174.
- 39.- Yang CC, Chan KS, Tseng KL, Weng SF. (2016). Prognosis of alcohol-associated lactic acidosis in critically ill patients: an 8-year study. Sci Rep 17(6): 35368.
- 40.- Goodwin ML, Harris JE, Hernández A, Gladden LB. (2007). Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. J Diab Sci Technol 1: 558-569.
- 41.- Pawan GL. (1968). Physical exercise and alcohol metabolism in man. Nature 218: 966-967.
- 42.- Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. J Biol Chem 279: 32804-32812.
- 43.- Góth L, Nagy T. (2013). Inherited catalase deficiency: is it benign or a factor in various age related disorders? Mutat Res 753: 147-154.
- 44.- Sies H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. J Biol Chem 289: 8735-8741.

- 45.- Calabrese EJ, Canada AT. (1989). Catalase: its role in xenobiotic detoxification, *Pharmacol Ther* 44: 297-307.
- 46.- Palese M, Tephly TR. (1975). Metabolism of formate in the rat. *J Toxicol Environ Health* 1: 13-24.
- 47.- Buemann B, Toubro S, Holst JJ, Rehfeld JF, Bibby BM, Astrup A. (2000). D-Tagatose, a stereoisomer of D-fructose, increases blood uric acid concentration. *Metabolism* 49: 969-976.
- 48.- Raushel FM, Cleland WW. (1973). The substrate and anomeric specificity of fructokinase. *J Biol Chem* 248: 8174-8177.
- 49.- McCorkindale J, Edson NL. (1954). Polyol dehydrogenases. 1. The specificity of rat-liver polyol dehydrogenase. *Biochem J* 57: 518-523.
- 50.- Thieden HI, Lundquist F. (1967). The Influence of fructose and its metabolites on ethanol metabolism in vitro. *Biochem J* 102: 177-180.
- 51.- Landau BR, Merlevede W. (1963). Initial reactions in the metabolism of D- and L-glyceraldehyde by rat liver. *J Biol Chem* 238: 861-867.
- 52.- Hers HG. (1962). Chapter 4: Triokinases, in *The Enzymes*, Vol. 6, Boyer PD, Lardy H, Myrback K, Eds., Academic Press, pp. 75.
- 53.- Adelman RC, Ballard FJ, Weinhouse S. (1967). Purification and properties of rat liver fructokinase. *J Biol Chem* 242(14): 3360-3365.
- 54.- Thieden HI. (1969). The influence of ethanol on glycerol metabolism in liver slices from fed and fasted rats. *Acta Chem Scand* 23: 237-243.

- 55.- Lundquist F, Tygstrup N, Winkler K, Jensen KB. (1965). Glycerol metabolism in the human liver: inhibition by ethanol. *Science* 150(3696): 616-617.
- 56.- Handler JA, Thurman RG. (1990). Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. *J Biol Chem* 265: 1510-1515.
- 57.- Boleda MD, Julià P, Moreno A, Parés X. (1989). Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch Biochem Biophys* 274: 74-81.
- 58.- Sillero MA, Sillero A, Sols A. (1969). Enzymes involved in fructose metabolism in liver and the glyceraldehyde metabolic crossroads. *Eur J Biochem* 10: 345-350.
- 59.- Julià P, Farrés J, Pares X. (1987). Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *Eur J Biochem* 162: 179-189.
- 60.- Srivastava SK, Hair GA, Das B. (1985). Activated and unactivated forms of human erythrocyte aldose reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (21): 7222-7226.