

00562

1

24

I N F L U E N C I A D E L O S
P O T E N C I A L E S R E D O X
E N E L M E T A B O L I S M O
H E P A T I C O

Tesis que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(BIOQUIMICA)

presenta el

MEDICO CIRUJANO

FERNANDO JORGE ARIAS MENDOZA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

S U M M A R Y

The present work shows several concepts and methodologies, used to determine the influence of the redox potentials on the intermediary metabolism in rat liver with special remark on their regulatory activity and their function as "energy transducers".

The research results show that:

- a) Glutamic acid γ -hydrazide produces a dual effect (activation-inhibition) on the malate-aspartate shuttle in liver depending on its doses;
- b) Adenosine has two effects on the cellular redox states: one favors the mitochondrial entry of malate; the other changes the utilization of reducing equivalents by the most important in vivo "in equilibrium" cytoplasmic dehydrogenases;
- c) An exponential relationship exists between the cytoplasmic NAD⁺/NADH and the triacylglycerides concentration in liver;
- d) There is an important role of the citrate-pyruvate cycle on the metabolic regulation in liver, mainly on lipid metabolism;
- e) The equilibrium between dehydrogenases in cytosol does not exist;
- f) It is suggested that the increase in hepatic triacylglycerides due to ethanol intoxication is a direct effect on hepatic metabolism, contrary to the idea of fat mobilization; and,
- g) It was demonstrated that several metabolic pathways are affected by metabolic fluxes through the internal mitochondrial membrane.

The methodological results show that the sample acquirence by a direct deproteinizing homogenization with perchloric acid developed in our laboratory is the most accurate method to obtain acid extracts from livers and that a multienzymatic assay for keto acids determination (pyruvate, dihydroxyacetone phosphate, oxaloacetate, and acetoacetate), also designed by the author, is the easiest way to obtain results with lesser needs of time, sample volume and sample handling.

R E S U M E N

El presente trabajo presenta una serie de conceptos y metodologías utilizadas para determinar la influencia de los potenciales redox sobre las vías englobadas como metabolismo intermedio en el hígado de rata, con énfasis en sus actividades reguladoras y sus funciones como sistemas "transductores de energía".

Los resultados de investigación muestran que:

- a) La L-hidrazida de ácido glutámico produce un efecto dual (activación-inhibición) a nivel de la lanzadera de malato-aspartato en el hígado, dependiendo de la dosis utilizada;
- b) La adenosina tiene dos efectos sobre los estados redox celulares: uno favorece la entrada de malato hacia la mitocondria sugiriéndose que es debido a un aumento en la poca de nucleótidos de adenina; el otro produce cambios en la captación de equivalentes reductores por dos de las deshidrogenasas citoplásmicas consideradas en equilibrio in vivo;
- c) Se encontró una relación de tipo exponencial entre los valores de la relación $NAD^+/NADH$ y los niveles de triacilglicéridos hepáticos;
- d) Se demostró la importante participación del ciclo de citrato-piruvato en la regulación del hígado especialmente en lo que a metabolismo de lípidos se refiere;
- e) Se demostró que el esperado equilibrio de deshidrogenasas para la utilización de equivalentes reductores no se cumple en el citoplasma;
- f) Se sugiere que el acúmulo de triacilglicéridos en el hígado por una ingesta desmedida de etanol es un efecto directo sobre el metabolismo hepático y no una alteración en la movilización de grasas; y
- g) Se demostró como diversas vías metabólicas se encuentran afectadas por los flujos de metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna, modificados preferentemente por los potenciales redox celulares.

Los resultados metodológicos demuestran que la obtención de muestras por homogenización deproteinizadora directa con ácido perclórico desarrollada en el laboratorio es el método más adecuado para obtener extractos ácidos de hígado y que un sistema multienzimático para la determinación de cetoácidos (piruvato, dihidroxiacetona fosfato, oxaloacetato y acetoacetato), también diseñado por el autor, facilita la obtención de resultados con menores requerimientos de tiempo, muestra y manejo de la misma.

IN MEMORIAM

ING. FRANCISCO JAVIER ARIAS
MORFIN

I N D I C E

RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	iii
JURADO DE TESIS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
INDICE.....	vii
FIGURAS Y TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. ANTECEDENTES	
1.2. CONCEPTOS FUNDAMENTALES	
1.2.1. Generalidades sobre función celular	
1.2.2. Fundamentos del estado redox celular	
1.2.3. Regulación metabólica por estado redox I: masas, alosterismo - concentración	
1.2.4. Regulación metabólica por estado redox II: cocientes NAD ⁺ /NADH y NADP ⁺ /NADPH	
1.2.5. Regulación metabólica por estado redox III: lanzaderas de equivalentes reductores	
1.2.6. Regulación metabólica por estado redox IV: interacción con el sistema ATP-ADP.	
2. METODOLOGIA.....	24
2.1. SUJETOS EXPERIMENTALES	
2.1.1. Animales Integros	
2.1.2. Hepatocitos Aislados	
2.2. TRATAMIENTOS	
2.2.1. Etanol	
2.2.2. Gamma hidracido de ácido glutámico	
2.2.3. Adenosina	
2.3. DETERMINACION DE PARAMETROS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	
2.3.1. Obtención de extractos ácidos de hígado	
2.3.2. Determinación de metabolitos	
2.3.3. Comparación de metodologías para la determinación de NAD ⁺ (H) y NADP ⁺ (H)	
3. RESULTADOS.....	52
3.1. EFECTO DE GAH SOBRE EL ESTADO REDOX HEPÁTICO	
3.1.1. Demostración del efecto directo sobre el hígado intoxicado con etanol	
3.1.2. Inhibición de la lanzadera y lipogénesis	
3.2. EFECTO DE ADEOSINA SOBRE EL ESTADO REDOX HEPÁTICO	

3.2.1.	Demostración del efecto directo sobre el hígado intoxicado con etanol	
3.2.2.	Efecto sobre la lanzadera de malato-aspartato	
3.3.	DESEQUILIBRIO DE LAS DESHIDROGENASAS CITOPLASMICAS	
3.3.1.	Datos de la literatura	
3.3.2.	Estudios sobre el desequilibrio de las deshidrogenasas citoplasmicas	
3.4.	METABOLISMO DE LIPIDOS Y ESTADO REDOX	
4.	CONCLUSIONES.....	89
4.1.	OBTENCION DE EXTRACTOS ACIDOS DE HIGADO	
4.2.	ENSAYO MULTIENZIMATICO	
4.3.	DESEQUILIBRIO DE DESHIDROGENASAS CITOSOLICAS	
4.4.	EFFECTO DE NAD/NADH CITOSOLICO SOBRE LIPIDOS	
4.5.	EFFECTO DIRECTO DEL ETANOL SOBRE LIPOGENESIS	
4.6.	EFFECTO DE GAN	
4.7.	EFFECTO DE ADENOSINA	
4.8.	CICLO DE CITRATO PIRUVATO	
4.9.	TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES COMO REGULADORES	
5.	BIBLIOGRAFIA.....	95
6.	APENDICE.....	103

Copias de las publicaciones, memorias de congresos y trabajos mandados a publicar con los resultados de esta tesis.

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Esquema general del metabolismo celular.

Figura 2: Fórmula desarrollada de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina y su reacción general de oxidorreducción.

Figura 3: Esquema de funcionamiento de la transferencia de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria a través de la lanzadera de malato-aspartato.

Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología utilizada en todos los experimentos reportados en esta tesis.

Figura 5: Vías metabólicas para el catabolismo del etanol en el hígado.

Figura 6: Relaciones entre el contenido de metabolitos en la primera extracción y el peso de la muestra empleada.

Figura 7: Porcentaje de recuperación en segunda extracción.

Figura 8: Curvas dosis-respuesta de etanol (panel A) y malato y lactato (panel B) a la presencia de GSH en animales previamente intoxicados con etanol.

Figura 9: Curvas tiempo-respuesta de etanol (panel A) y malato y lactato (panel B) a la presencia de GSH en animales previamente intoxicados con etanol.

Figura 10: Curva dosis-respuesta del consumo de etanol por hepatocitos en presencia y ausencia de GSH.

Figura 11: Curvas de concentración de triacilglicéridos en el tiempo en presencia y ausencia de GSH.

Figura 12: Mapa metabólico de integración del ciclo malato-piruvato con la lanzadera de malato-aspartato, el ciclo de Krebs, y la vía principal de oxidación del etanol en el hígado.

Figura 13: Curva exponencial de triacilglicéridos contra la relación NAD/NADH en diversas condiciones experimentales.

Tabla 1: Ejemplos de moléculas biológicas que poseen gran cantidad de energía de enlace.

Tabla 2: Valores aproximados reportados de las relaciones NAD/NADH y NADP/NADPH en el citoplasma y en la mitocondria.

Tabla 3: Vías metabólicas principales en el hígado de rata que poseen deshidrogenasas NAD- o NADP-dependientes.

Tabla 4: Vías metabólicas principales del hígado de rata y como se encuentran afectadas por ley de acción de masas y por alosterismo por los dinucleótidos de nicotinamida y adenina.

Tabla 5: Efecto de sales y alostrico de ATP, ADP y AMP sobre las vías metabólicas más comunes en el hígado.

Tabla 6: Lista de metabolitos determinados y referencias donde se detalla la metodología.

Tabla 7: Resumen de los pasos empleados para fijar y extraer tejidos con condiciones óptimas de recuperación tanto con la pinza de congelamiento como con la homogenización directa.

Tabla 8: Efecto del tiempo de muestreo sobre el contenido de metabolitos recuperados utilizando el método de las pinzas de congelamiento.

Tabla 9: Comparación entre los valores obtenidos con las metodologías empleadas para fijar y extraer tejidos animales y los valores reportados en la literatura previamente.

Tabla 10: Metodologías utilizadas para la determinación de potenciales redox intracelulares.

Tabla 11: Características de las deshidrogenasas utilizadas para la determinación indirecta de los potenciales redox en condiciones estándar (38°C, pH 7.0, I = 0.25).

Tabla 12: Efecto de GAN sobre los parámetros del estado redox citoplásmico y mitocondrial en hígados agudamente intoxicados por etanol.

Tabla 13: Efecto de ADP y EHNA sobre hepatocitos aislados incubados en presencia de etanol.

Tabla 14: Efectos sobre los parámetros del estado redox intracelular de adenosina (ADP), α -hidrazida de ácido glutámico (GAN) y ambos combinados sobre hígados intoxicados con etanol.

Tabla 15: Efecto sobre los parámetros energéticos celulares y triacilglicéridos, de adenosina (ADP), α -hidrazida de ácido glutámico (GAN) y ambos sinérgicamente en hígados agudamente intoxicados con etanol.

Tabla 16: Promedio de los metabolitos reportados en la literatura con los que se pueden obtener los diferentes estados de oxidorreducción celular.

Tabla 17: Valores de las relaciones NAD/NADH y NADP/NADPH a partir de los valores de metabolitos reportados en la literatura y que se encuentran resumidos en la tabla 20.

Tabla 18: Kc's de pares de deshidrogenasas que se consideran se encuentran en equilibrio químico in vivo y que comparten la misma puza de dinucleótidos (NAD o NADP) obtenidos a partir de los resultados reportados en las tablas 20 y 21.

Tabla 19: Valores de LAC, PIP, GAP y DAP en diversas condiciones estudiadas en el laboratorio. Estos datos fueron utilizados para determinar los valores de las relaciones NAD/NADH citoplásmicas. También se reporta la Kc obtenida con este par de deshidrogenasas.

A B R E V I A T U R A S

AAA	Acetoacetato
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BDH	Deshidrogenasa de β -hidroxibutirato
BHB	β hidroxibutirato
CPD	Ciclo malato-piruvato
DFP	Dihidroxiacetona fosfato
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato
GAH	γ -hidrazida de ácido glutámico
GAP	α glicerol fosfato
GDH	Deshidrogenasa de α -glicerol fosfato
GLU	Glutamato
GLUDH	Deshidrogenasa de glutamato
HDD	Homogenizacin deproteinizadora directa
IC	Isocitrato
ICDH	Deshidrogenasa de isocitrato
LAC	Lactato
LDH	Deshidrogenasa de lactato
LMA	Lanzadera de malato-aspartato
MAL	Malato
MDDH	Deshidrogenasa descarboxilante de malato NADP-dependiente
MDH	Deshidrogenasa de malato NAD-dependiente
MEOS	Sistema microsomal hepático
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NADP	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado (forma reducida)
OAA	Oxaloacetato
PEP	Fosfo-enol piruvato
Pi	Fosfato inorgánico
PIR	Piruvato
PCR	Pintas de congelamiento rápido
TAG	Triacilglicéridos

1. INTRODUCCION

Aunque no se conozca, existe el número de las estrellas y el número de los granos de arena. Pero lo que existe y no se puede contar y se siente aquí dentro, exige una palabra para decirlo. Esta palabra, en este caso, sería Inmensidad. Es como una palabra húmeda de misterio. Con ella no se necesita contar ni las estrellas ni los granos de arena. Hemos cambiado el conocimiento por la emocion: que es también una manera de penetrar en la verdad de las cosas.

Ernsto Fábregu Gómez: Canek

1.1. ANTECEDENTES

Los conocimientos iniciales que demuestran la importancia que tienen los procesos de oxidorreducción biológica para el fenómeno de la vida, este último considerado como un proceso dependiente obligado de energía, se remontan al tiempo de Lavoisier (1743-1794; francés¹⁻²); este científico demostró que sus organismos experimentales utilizaban oxígeno del aire y lo reemplazaban por bióxido de carbono y agua. Así mismo, demostró que este mismo tipo de organismos, sometidos a un ambiente sin oxígeno, morían al poco tiempo. Debido a estas observaciones sobre organismos superiores se generalizó, en la época de este singular científico, que todos los organismos vivos requerían de la presencia de oxígeno para su supervivencia²⁻³.

Posteriormente Louis Pasteur (1822-1895; francés⁴⁻⁶), encontró que ciertas levaduras podían sobrevivir en ausencia de oxígeno, es decir en condiciones anaeróbicas. La reconciliación entre las observaciones de Lavoisier y Pasteur se llevó a cabo en el momento en que se demostró que algunas vías metabólicas destinadas a la captación de energía para la posterior utilización celular de la misma, pueden realizarse en ausencia de oxígeno mientras que otras son dependientes obligadas del mismo⁶. De esta manera, existen organismos que pueden sobrevivir utilizando exclusivamente las primeras, mientras que otros requieren necesariamente del uso de las segundas.

Aplicando los conceptos mencionados a conocimientos actuales, se encuentra que en algunos procesos metabólicos que permiten la supervivencia de ciertas células no se lleva a cabo la oxidación completa de la molécula metabolizada (en el caso de las levaduras de Pasteur la glucólisis hasta etanol era la vía que permitía la supervivencia de dichos organismos), por lo que no se requerirá oxígeno para que el organismo sobreviva. Por otro lado, las vías metabólicas que son dependientes obligadas de oxígeno toman a los intermediarios parcialmente oxidados y llevan a cabo una oxidación total de la molécula hasta bióxido de carbono y agua (específicamente hablando son las vías metabólicas relacionadas con la respiración celular⁴⁻⁷).

Ya en este siglo, un científico alemán nacionalizado inglés; Sir Hans A. Krebs (1900-1981,⁸) premio Nobel de

Fisiología y Medicina en 1953, fue la piedra angular para el avance de los conocimientos respecto a oxidorreducciones biológicas, con una producción científica y formación de recursos humanos extraordinaria. El y su grupo, que a lo largo del tiempo incluyó gentes del calibre de Hansselaït, Cohen, Rathner y Veech han sido los que, de una forma u otra, han fundamentado los conceptos de estado redox y sus implicaciones dentro del metabolismo intermediario hepático^{9,10}.

Entre Lavoisier y Pasteur y Krebs existieron un gran número de investigadores sobre el área. Nuestra intención aquí no es la de dar pormenores históricos exhaustivos sino solamente reconocer el papel de iniciadores de la investigación en el área de los dos primeros y demostrar la gran admiración que se tiene por el último.

1.2. CONCEPTOS FUNDAMENTALES

Es un conocimiento básico el hecho de que la oxidación de una molécula conlleva liberación de energía¹¹⁻¹². Esta energía ha sido cuantificada en un sinnúmero de moléculas por medio de la bomba calorimétrica, en donde la energía del compuesto es desprendida en forma de calor¹². Pero, de dónde proviene la energía liberada en los procesos de oxidación? Para contestar esta pregunta debemos mencionar los conceptos de energía de enlace y energía libre¹³.

La energía de enlace es también denominada energía química y representa una forma de energía potencial la cual está presente en las moléculas como resultado del movimiento de sus electrones, así como de la disposición de los átomos dentro de sus moléculas¹³. Se le considera concentrada o almacenada en las ligaduras que existen entre los átomos que componen una molécula. Cuando una molécula se somete a oxidación, la energía de enlace se desprende en forma de energía libre definida como el contenido calórico de una sustancia más la energía que contiene en virtud de su estructura intrínseca (entropía¹³). Cuando la energía de enlace se desprende como energía libre debido a un proceso oxidativo esta última puede ser disipada en forma de calor o utilizada para llevar a cabo alguna clase de trabajo¹³. El caso clásico de transducción de energía (química a calorífica y trabajo) es la locomotora de vapor.

A nivel biológico, la célula, como unidad de estos sistemas, tiene mecanismos por los cuales puede oxidar lentamente (en varias reacciones parciales) ciertos compuestos, ya sea en parte o totalmente para utilizar la energía de enlace contenida en ellos con el fin de llevar a cabo trabajo celular¹⁴⁻¹⁴. Esto lo hace generando compuestos que sirven de intermediarios para las reacciones biológicas en las que se requiere energía (procesos de transducción de energía).

Para ampliar el tema a nivel biológico, se debe mencionar que existen dos tipos de organismos biológicos dependiendo del tipo de energía que utilicen para sobrevivir: los organismos autótrofos y los organismos heterótrofos (en la figura 1 se muestran los ciclos de ambos tipos de organismos). Los organismos conocidos como autótrofos son aquellos que tienen como

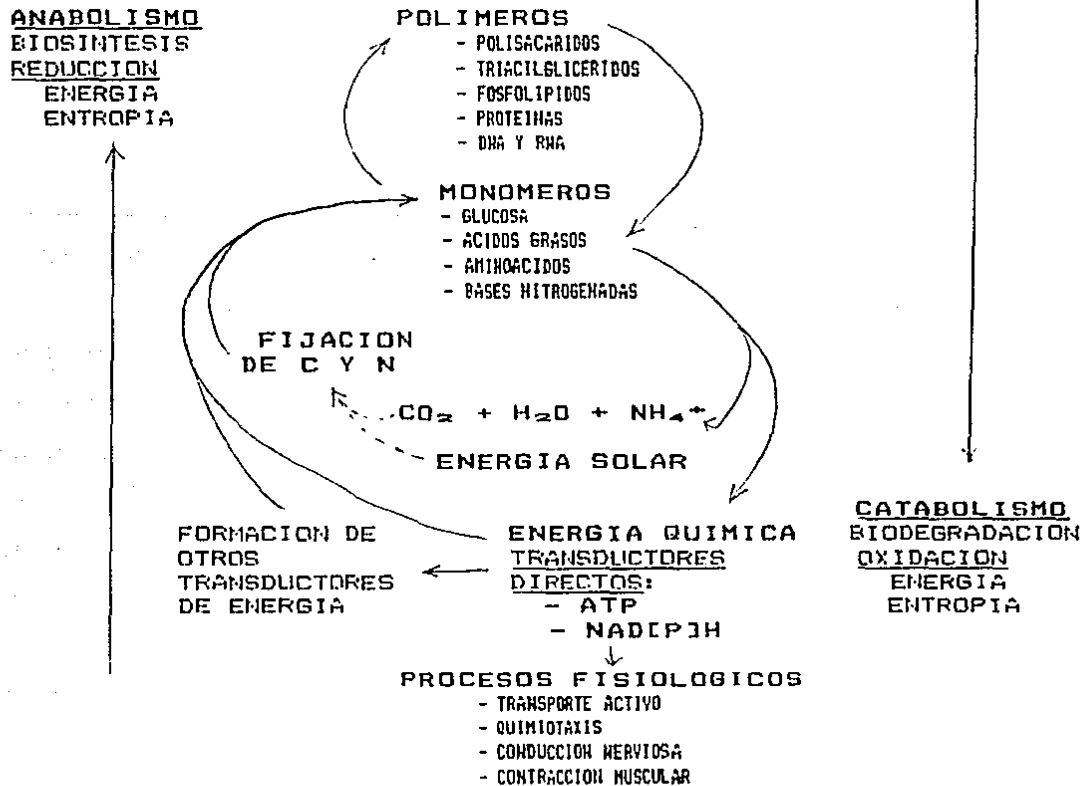


Figura 1: Esquema general del metabolismo celular. En él se hace distinción de las vías metabólicas que son llevadas a cabo exclusivamente por organismos autótrofos (líneas punteadas). Se muestra también el antagonismo entre catabolismo y anabolismo y como se interrelacionan los procesos de utilización y generación de energía por medio de los "transductores de energía".

fuerza de energía básicamente, a las radiaciones solares. Estos organismos poseen sistemas enzimáticos capaces de transducir la energía luminosa a energía de enlace con lo que llevan a cabo la fijación biológica de carbono y nitrógeno generando moléculas bioquímicas complejas (glucosa, ácidos grasos, etc.) a partir de moléculas simples como bióxido de carbono, amonio y agua o realizan trabajo celular utilizando esta energía más o menos directamente.

Por otra parte, los organismos heterótrofos (fig 1), carecen de la maquinaria transductora de energía luminosa a energía de enlace¹⁴, por lo que para subsistir requieren de las moléculas con alto contenido de energía que son sintetizadas por los organismos autótrofos¹³⁻¹⁴. En el caso de organismos superiores (organismos heterótrofos obligados) las fuentes de energía celulares deberán ser las moléculas ya mencionadas con un alto contenido de energía de enlace¹⁴⁻¹⁴. Como ejemplos de estas moléculas tenemos las mencionadas en la tabla 1. Como es de esperarse estos ejemplos demuestran que las moléculas que pueden

SUSTANCIA	CAL POR GRAMO
GLUCOSA	3.75
SACAROSA	3.96
ALMIDON	4.2
LIPIDOS	9.4
CASEINA	5.84
UREA	2.5
CREATININA	4.5

Tabla 1: Ejemplos de moléculas biológicas que poseen gran cantidad de energía de enlace.

ser utilizadas por la célula para la obtención de energía son moléculas con un grado de reducción relativamente alto y entropía relativamente baja. Estas moléculas poseen los enlaces de mayor contenido energético celular, ya que poseen ligaduras carbono-carbono que a su vez son los enlaces químicos más reducidos en sistemas biológicos.

Para concluir, se sabe que los dos elementos más abundantes en los organismos vivos, carbono e hidrógeno, se encuentran en el medio ambiente como bióxido de carbono y agua, compuestos simples, altamente oxidados, estables y con muy poca energía libre. Estos últimos compuestos, bióxido de carbono y agua son, a su vez, los compuestos más importantes de excreción de carbono, hidrógeno y oxígeno de organismos superiores (fig. 1¹⁴-14). Si en este punto regresamos a las observaciones de Lavoisier, podemos concluir que la respiración de cualquier organismo superior (captación de oxígeno y excreción de bióxido de carbono y agua) es indicación clara de que los compuestos de carbono con un alto contenido de energía de enlace son oxidados para que esta energía contenida en ellos sea utilizada para realizar trabajo celular.

1.2.1. Generalidades sobre función celular

Como se detalla en la figura 1, podemos dividir los eventos celulares tanto de organismos autótrofos como de heterótrofos en dos grupos: procesos bioquímicos o metabolismo y procesos fisiológicos. El primer grupo se subdivide en catabolismo y anabolismo como procesos yuxtapuestos: el catabolismo comprende la serie de reacciones oxidativas que realiza cualquier organismo vivo y tiene como fin último el hacer posible para la célula, el utilizar la energía potencial contenida en los sustratos complejos con cierto grado de reducción¹⁴⁻¹⁴. De manera inversa, el anabolismo utiliza esta energía potencial para sintetizar moléculas reducidas y altamente ordenadas necesarias para la célula. Finalmente los eventos fisiológicos celulares son aquellos en los cuales la energía química liberada durante el catabolismo de moléculas complejas es utilizada en fenómenos de trabajo celular dentro de los cuales podemos incluir a las actividades celulares de transporte a través de membranas, la conducción nerviosa, la contracción muscular, etc.

Dentro del complejo sistema metabólico de una célula existen diversas moléculas con la finalidad de ser los medios de conexión entre los procesos catabólicos (donde se libera la energía potencial de ciertos compuestos) y los procesos anabólicos y fisiológicos (donde se requiere de esta energía

para que el proceso se lleve a cabo) a los cuales llamaremos transductores de energía en donde destacan los nucleótidos de adenina y los dinucleótidos de nicotinamida y adenina (figura 1). Como se puede inferir del texto y de la figura 1, la función de los transductores de energía es la de servir como enlace entre los procesos oxidativos que liberan energía y los procesos celulares que la requieren (anabolismo y/o procesos fisiológicos), cumpliendo dos funciones para la célula: son almacenadores momentáneos de energía y la acarrear desde donde se está generando hasta donde se está requiriendo.

La importancia de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina y los nucleótidos de adenina es que son los únicos transductores que captan energía directamente de las vías catabólicas; el primer grupo liga a los equivalentes reductores generados en las reacciones de oxidorreducción (reacciones redox¹⁷), mientras que el segundo almacena la energía en forma de enlaces de "alta energía" (enlaces anhídrido de ácido fosfórico¹⁸) denominándose a estas últimas reacciones, fosforilaciones a nivel de sustrato. En la figura 1 se ha tratado de esquematizar que todos los demás transductores de energía se generan, de una forma u otra, a partir de los transductores directos.

Tanto las reacciones redox como las fosforilaciones a nivel de sustrato son de importancia para la posterior utilización de energía por la célula, pero depende del tipo de

célula y de las condiciones en las que se encuentre el que utilice el primer tipo de reacciones o el segundo. Así células en estado de anaerobiosis (músculo, levaduras, etc.) o que no poseen mitocondrias (eritrocito), tendrán como fuente de energía exclusivamente a las fosforilaciones a nivel de sustrato, mientras que células que se encuentren en aerobiosis (siendo este el caso del hígado en condiciones fisiológicas) tendrán como fuente principal de energía a las reacciones redox, ya que en estas células la vía que oxida totalmente a los equivalentes reductores ligados a los dinucleótidos de nicotinamida y adenina (cadena respiratoria) y que genera un potencial protomotriz en la membrana mitocondrial interna^{4,7,19}, está acoplada a un proceso de captación de energía por los nucleótidos fosforilados de adenina más eficiente que la fosforilación a nivel de sustrato y que se denomina fosforilación oxidativa¹⁹.

1.2.2. Fundamentos del estado de oxidorreducción celular.

El grupo de dinucleótidos de nicotinamida y adenina (que son los encargados de transducir la energía contenida en los equivalentes reductores) consta de dos especies moleculares: la

simple (NAD) y la fosforilada (NADP)¹⁷. En la figura 2 se muestra la fórmula desarrollada de los dinucleótidos y su reacción general de oxidorreducción. Existen otros tipos de aceptores de equivalentes reductores dentro del metabolismo (FAD, FMN, citocromos) pero éstos, o se encuentran ligados fuertemente a las proteínas (grupos prostéticos¹⁷) o su actividad se encuentra confinada al medio lipídico (coenzima Q²⁰), por lo que no tienen la actividad dinámica del NAD y NADP.

Debido a que NAD y NADP y sus contrapartes reducidas se encuentran libres en el medio, de tal manera que pueden interactuar con diversas enzimas en el metabolismo (actividad dinámica o de transductor), se generó un concepto fundamental para entender como estos acarreadores de equivalentes reductores llevan a cabo regulación metabólica en base a las constantes de equilibrio de algunas de las enzimas que utilizan al NAD y al

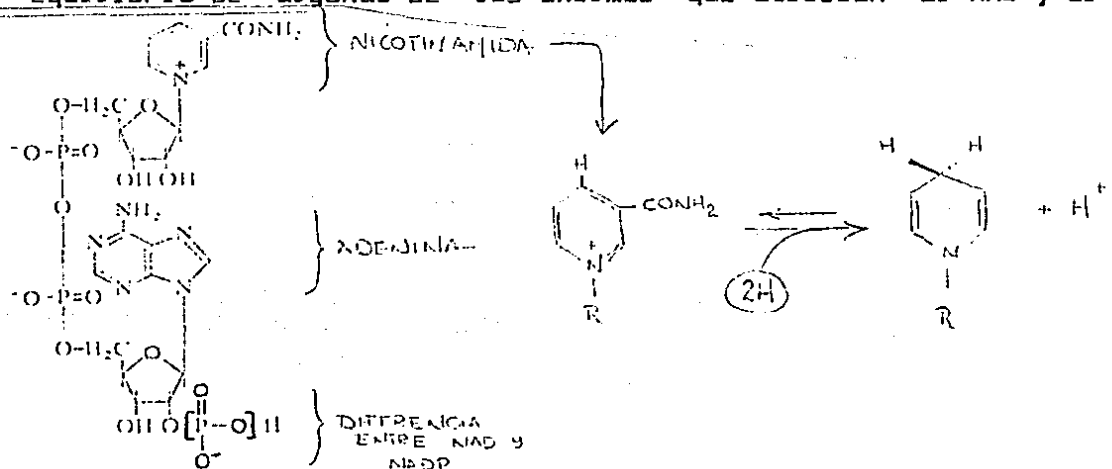


Figura 2: Fórmula desarrollada de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina y su reacción general de oxidorreducción.

NADP. Este concepto es el de estado de oxidorreducción celular (estado redox) que se considera como el valor del cociente de las formas oxidada y reducida de los dinucleótidos en los compartimentos específicos²¹, expresándose de manera estándar como:

$$\frac{[NAD]}{[NADH]} \quad \text{y} \quad \frac{[NADP]}{[NADPH]}$$

en donde cada miembro de las relaciones se refiere a su concentración libre en el compartimento dado²¹. Esto último es de importancia porque los valores de ambas relaciones en los dos compartimentos metabólicamente activos (citoplasma y mitocondria [tabla 2]) son diferentes, pudiendo determinar la dirección de reacciones reversibles, la magnitud de los cambios de energía libre en las oxidorreducciones metabólicas y la dirección de reacciones alostéricas²¹.

La generación de los equivalentes reductores ligados a NAD y NADP (expresados aquí como NADH y NADPH respectivamente) se lleva a cabo en las reacciones oxidativas que involucran

	MITCONDRIA	CITOSOL
NAD/NADH	10	1000
NADP/NADPH	10	0.1

Tabla 2: Valores aproximados reportados de las relaciones NAD/NADH y NADP/NADPH en el citoplasma y en la mitocondria.

alcoholes y en menor cuantía aldehidos¹⁷. Como es bien sabido, la oxidación ligera de alcoholes primarios da como resultado un aldehido, la de alcoholes secundarios produce una cetona y la de un aldehido produce un carboxilo^{11,12}. Estas reacciones involucran comúnmente NAD (o NADP) como agente oxidante el cual se reduce a NADH (o NADPH) por medio de dos hidrógenos uniéndose a la molécula un hidruro y liberándose un protón al medio (fig. 2). En la tabla 3 se resumen las vías principales que posee el hígado de mamífero con los nombres de las deshidrogenasas NAD- o NADP-dependientes, sus sustratos y productos y si se encuentran cerca del equilibrio o no^{17,22}.

VIA METABOLICA	NOMBRE DE LA DESHIDROGENASA Y SUSTRATO	PRODUCTO	EQ
<u>NAD-DEPENDIENTES</u>			
GLUCOLISIS	GLICERALDEHIDO 3P LACTATO	1,3DIFOSFOGLICERATO PIRUVATO	NO SI
GLUCONEOGEN.	MALATO MITOCON. MALATO CITOPL. GLICERALDEHIDO 3P	OXALOACETATO OXALOACETATO 1,3DIFOSFOGLICERATO	SI SI NO
CICLO DE KREBS	ISOCITRATO α CETO GLUTARATO MALATO	α -CETO GLUTARATO SUCCINIL CoA OXALOACETATO	NO NO SI
β OXIDACION C. CETONICOS AMINOACIDOS	β HIDROXIACIL CoA β HIDROXIBUTIRATO GLUTAMICO	ACETOACIL CoA ACETOACETATO α CETOGLUTARATO	SI SI SI
<u>NADP-DEPENDIENTES</u>			
β REDUCCION C. DE PENTOSAS	β HIDROXIACIL PTA GLUCOSA 6P FOSFOGLUCONATO	ACETOACIL PTA FOSFOGLUCONOLACTONA RIBULOSA-5-FOSFATO	SI SI SI
ANAPLEROTICA	MALATO DESCARBOY.	PIRUVATO	SI

Tabla 3: Vías metabólicas principales en el hígado de rata que poseen deshidrogenasas NAD- o NADP-dependientes y si se encuentran en el equilibrio o no (EQ).

1.2.3. Regulación Metabólica por los Estados Redox I:
Ley de Acción de Masas, Alostereismo y Concentración.

Una de las maneras que tienen los dinucleótidos para ejercer regulación metabólica es por ley de acción de masas sobre las vías metabólicas que poseen deshidrogenasas NAD(P)-dependientes que se encuentran cerca de su equilibrio químico in vivo^{17,22}. Estas vías serán afectadas cuando varíen los niveles de NAD(P) y NAD(P)H (tabla 3,¹⁷). Existen también enzimas que son afectadas alostéricamente por ellos tanto en estado oxidado como reducido¹⁷. En la tabla 4 se muestra una lista de estas enzimas y el tipo de modulación alostérica realizado sobre ellas. Como se ve en esta tabla la enzima alostérica que es afectada por la forma oxidada de los dinucleótidos es afectada en sentido contrario por la forma reducida.

Por último, otro concepto fundamental para entender el control del metabolismo por los transductores de equivalentes

	MASAS		ALOSTERISMO	
	NAD	NADH	NAD	NADH
GLUCOLISIS	+	-	+	-
GLUCONEOGENESIS	-	+	-	+
CICLO DE KREBS	+	-	+	-
CADENA RESP.	-	+		

Tabla 4: Vías metabólicas principales del hígado de rata y como se encuentran afectadas por ley de acción de masas y por alosterismo por los dinucleótidos de nicotinamida y adenina.

reductores es que en estas moléculas la suma de concentraciones de dinucleótido oxidado más dinucleótido reducido es constante a una concentración celular baja (ca. 10^{-9} M²¹), lo que conlleva que si se da una alteración tal que genere un aumento importante de una de las variedades moleculares (por ejemplo NADH) debido a un cambio metabólico agudo, se producirá, que el valor de su contraparte (en este caso NAD) tienda a cero produciendo que las enzimas que los toman como sustratos o moduladores alostéricos funcionen en un solo sentido.

Para ejemplificar lo anterior, el caso clásico es la intoxicación del hígado por etanol²³⁻²⁵. Cuando existe una concentración alta de etanol en el torrente circulatorio de animales de experimentación o humanos, se produce un aumento de NADH citoplásmico en el hígado²³⁻²⁵. Si la concentración de etanol es superior a la suma de concentraciones de NAD y NADH (lo cual se logra con demasiada frecuencia en humanos), se saturará el sistema de equivalentes reductores produciendo la desaparición casi total del NAD citoplásmico. En estas condiciones, la deshidrogenasa de lactato, enzima exclusivamente citoplásmica (ver tabla 3), funcionará en el sentido de la producción masiva de lactato y no de piruvato como lo hace en condiciones fisiológicas²², ya que esta enzima intracelularmente se encuentra cerca de su equilibrio químico y el NADH la afecta por ley de acción de masas. Por otro lado, la fosfofructocinasa, enzima alostérica de la glucólisis (tabla 4), se inhibirá, ya que el NADH es un modulador alostérico negativo de esta enzima y el

NAD, que en estas condiciones se encuentra bajo, con un valor cercano a cero, es un modulador alostérico positivo¹⁷.

1.2.4. Regulación Metabólica por Estado Redox II: Diferencias entre los cocientes NAD/NADH y NADP/NADPH

Refiriéndose a un mapa metabólico se encuentra que, en general, la reoxidación de los sistemas NAD-dependientes está involucrada en procesos de generación y captación de energía en forma de enlaces anhidrido fosfórico en ATP, donde los equivalentes reductores ligados al dinucleótido se oxidan totalmente hasta agua (fosforilación oxidativa^{4,7,18}), mientras que los sistemas NADP-dependientes se reoxidan en reacciones comúnmente involucradas en procesos anabólicos reductivos (β -reducción, síntesis de colesterol, etc). Una explicación de esta "división de labor" metabólica fue elucidada por Krebs y colaboradores²⁴.

La fundamentación de Krebs se basa en que cuando las relaciones NAD/NADH y NADP/NADPH citosólicas se comparan, una diferencia de cerca de cinco ordenes de magnitud es encontrada entre ellas^{21,24}. Como se muestra en la tabla 2, en el citosol hepático, y probablemente en otros tejidos, la relación de concentraciones de NAD/NADH es cercana a 1000, mientras que para NADP/NADPH es de cerca de 0.01²¹. Esta última relación favorece las reacciones reductivas debido a que permite que dichas

reacciones se lleven a cabo con concentraciones de precursores muy por abajo de las concentraciones que se requerirían si el par NAD/NADH estuviera involucrado. De la misma manera una relación NAD/NADH alta favorece reacciones oxidativas, por ejemplo la reacción de la deshidrogenasa de lactato en la glucólisis funcionará generando piruvato en condiciones fisiológicas.

Esta hipótesis no es del todo válida ya que existe un caso en el que esto no se cumple que es la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en la gluconeogénesis. Esta vía metabólica eminentemente reductiva usa NADH y no NADPH como proveedor de equivalentes reductores²⁷. Si a esto aunamos que en el hígado la gluconeogénesis es muy activa, se entenderá que la comprensión de la participación del estado de oxidorreducción celular en la regulación del metabolismo hepático es fundamental.

Ya que tanto reacciones NAD- como NADP-dependientes se llevan a cabo en el citosol del hígado, el mantenimiento de los diferentes valores de las relaciones requiere de que las deshidrogenasas posean un alto grado de especificidad por NAD o NADP. Este es el caso de las deshidrogenasas citoplásmicas que han sido estudiadas con detalle²⁸. Cualquier enzima capaz de usar sin distinción ambos dinucleótidos podrá, si es suficientemente activa, llevar las relaciones de ambos a valores idénticos en el compartimiento donde se encuentre dicha enzima.

Esto no ocurre en el citosol pero sucede en la mitocondria donde las relaciones de concentración para ambos pares es aproximadamente de 10 (tabla 2); la enzima glutamato deshidrogenasa puede ser la responsable ya que puede reaccionar tanto con NAD como con NADP²⁴. Esto último habla de la poca utilidad de los sistemas NADP-dependientes en la mitocondria.

1.2.5. Regulación Metabólica por Estado Redox III: Lanzaderas de equivalentes reductores NAD-dependientes.

El diseño metabólico y la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna al NAD o NADH bajo condiciones fisiológicas, deriva, como ya fue mencionado anteriormente, en una relación NAD/NADH mitocondrial dos ordenes de magnitud menor que la citosólica (tabla 2). Aún con estas restricciones de flujo entre el citosol y la mitocondria es de esperarse que la mayoría de los equivalentes reductores en forma de NADH generados en el citosol alimenten, finalmente, a la cadena respiratoria para la subsecuente generación de ATP^{4,7,19}. No así los que están en forma de NADPH que como también se mencionó anteriormente, sirven comúnmente en reacciones anabólicas las cuales se llevan a cabo preferencialmente en el citoplasma. Es por esto que la célula, pese a su impermeabilidad al NADH a nivel de la membrana interna de la mitocondria, tiene mecanismos que realizan la translocación del equivalente reductor ligado al NAD citosólico^{29,30}.

Es necesario que esta translocación sea unidireccional o de lo contrario sacará equivalentes reductores de la mitocondria por simple gradiente de concentración²⁹. Estos mecanismos por los cuales las células transfieren equivalentes reductores del citosol a la mitocondria unidireccionalmente se les llama lanzaderas (shuttles)^{29,30}. En el hígado se encuentra que existen tres lanzaderas activas: la de malato aspartato (LMA) la de α -glicerol fosfato y la de ácidos grasos²⁹. En la referencia mencionada se muestran los mecanismos de acción de

dichas lanzaderas. En la figura 3 se reproduce el ciclo de la lanzadera de malato-aspartato que es la que nos atañe²⁹.

Se sabe que en el hígado la lanzadera de malato-aspartato (fig. 3) es la más activa transfiriendo más del 80% de los equivalentes reductores generados por el hígado²⁹. El paso que le da unidireccionalidad a esta lanzadera es el translocador de aspartato que se sabe funciona exclusivamente en dirección

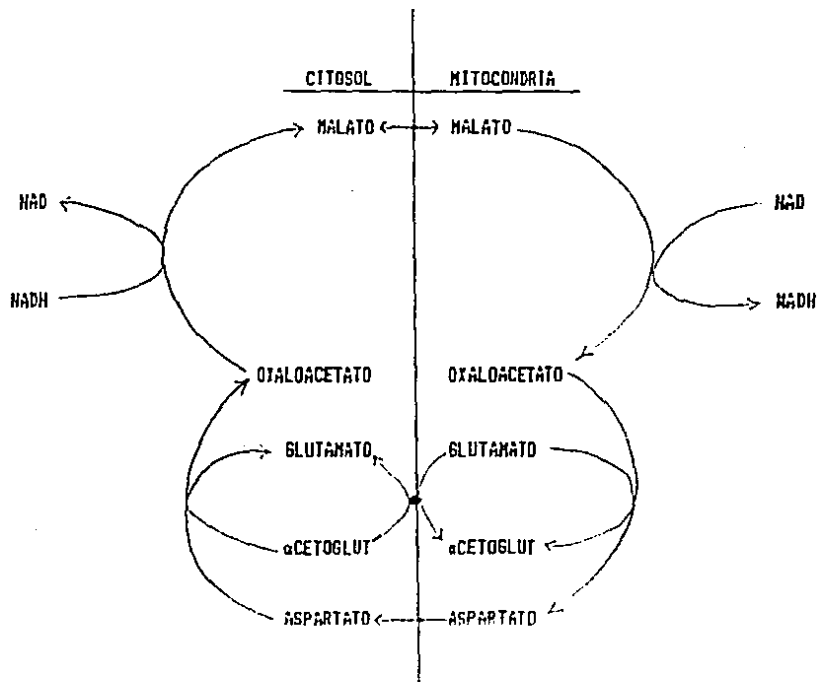


Figura 3: Esquema de funcionamiento de la transferencia de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria a través de la lanzadera de malato-aspartato. Debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial al NAD(H), el equivalente reductor es captado por un aceptor (oxaloacetato citoplásmico) que por la reducción llevada a cabo se convierte en una molécula permeable (malato citoplásmico), dejando al equivalente dentro de la mitocondria y convirtiéndose posteriormente en otra molécula (aspartato mitocondrial) que permea en sentido opuesto. Este paso (de aspartato mitocondrial a citoplásmico es unidireccional). El oxaloacetato, en este caso, no atraviesa tampoco la membrana.

mitocondria-citosol³⁰. Es interesante hacer notar que el flujo de malato, que es bidireccional, forma parte en sentido mitocondrial de la LMA y en sentido citosólico de la gluconeogénesis²⁷. Igualmente el flujo unidireccional del aspartato es fundamental para el funcionamiento tanto de la lanzadera como de la ureogénesis³¹. Es de esperarse entonces, que alguna alteración sobre los estados redox NAD-dependientes conlleve una alteración importante sobre las vías de generación de urea y glucosa.

1.2.6. Regulación del metabolismo por Estado Redox IV: Interacción con el sistema ATP-ADP-AMP.

Otro de los mecanismos de control del metabolismo por los sistemas NAD-dependientes se encuentra a nivel del acoplamiento de la cadena respiratoria con la fosforilación oxidativa³². Las reacciones en estas vías están acopladas para que la energía liberada en reacciones de oxidación del equivalente reductor en NADH, sea utilizada en las reacciones de fosforilación de ADP en base a la formación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial (acoplamiento de la cadena respiratoria con los procesos de fosforilación de la ATP sintetasa mitocondrial^{4,7,19}). Este proceso, como fue mencionado antes, es de importancia bioenergética capital para células aerobias ya que es donde la energía contenida en el equivalente

reductor ligado a NADH es transferida al más importante de los transductores de energía que es el ATP¹⁹.

Considerando la reacción global que se lleva a cabo al realizarse la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa tenemos:



donde un transductor de energía (NADH) es utilizado para generar el otro (ATP). Como se ve en esta suma de reacciones NADH desaparece y NAD aparece al funcionar en condiciones normales, por lo que las enzimas que son afectadas por sus concentraciones deberían modificar su actividad concomitantemente a la actividad de la cadena respiratoria (tablas 3 y 4).

Esto no sucede ya que también ATP, ADP y AMP regulan, por ley de acción de masas y alosterismo, las mismas vías afectadas por NAD y NADH, por lo que la fosforilación oxidativa se convierte en un sistema de regulación metabólica²².

Como se ve al comparar la tabla 4 con la tabla 5, tanto las vías metabólicas afectadas por ley de acción de masas como las reacciones afectadas por alosterismo por NADH, regularmente son afectadas en el mismo sentido por ATP¹⁷. Lo mismo es cierto entre NAD y ADP y/o AMP.

La relación que existe entre NADH y ATP a nivel del acoplamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa produce, que cuando NADH se usa para generar ATP uno de los moduladores alostéricos en un sentido disminuye (NADH) mientras que el otro aumenta (ATP) y al mismo tiempo un modulador en sentido opuesto disminuye (ADP) mientras que el otro aumenta (NAD) (ver reacción química anterior). Así una enzima afectada alostéricamente por ATP y NADH, se mantendrá afectada en la misma dirección pese a que se encuentre funcionando la fosforilación oxidativa.

	MASAS		ALOSTERISMO	
	ATP	ADP,AMP	ATP	ADP,AMP
GLUCOLISIS	+/-	+/-	-	+
GLUCONEOGENESIS	+/-	+/-	+	-
CICLO DE KREBS	-	+		
CADENA RESP.	-	+		

Tabla 5. Efecto de masas y alostérico de ATP, ADP y AMP sobre las vías metabólicas más comunes en el hígado. El efecto mixto de masas en glucólisis y gluconeogénesis es debido a que en una parte de las vías los nucleótidos se usan como sustrato y en otra se generan como producto.

2. METODOLOGIA

En la figura 4 se muestra un diagrama de flujo de las condiciones metodológicas utilizadas en este trabajo. Los animales de experimentación fueron ratas blancas machos de la

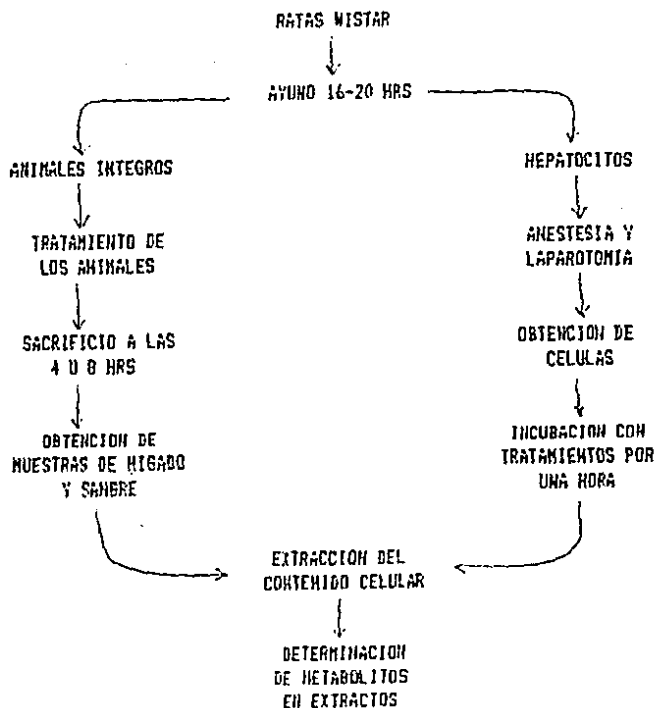


Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología utilizada en todos los experimentos reportados en esta tesis.

cepa Wistar con un peso entre los 180 y los 250 g, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Regularmente en este bioterio los animales son destetados a la cuarta semana de vida, se mantienen con un ciclo luz/obscuridad natural y su alimentación es Purina lab chow y agua ad libitum. Los animales fueron solicitados un día antes del inicio del experimento para someterlos a ayuno de 16 a 20 horas, pasando una noche en el laboratorio. Después de este periodo de ayuno los animales fueron utilizados para dos diferentes tipos de experimentos: los llevados a cabo en el animal íntegro y los llevados a cabo en hepatocitos aislados.

2.1 SUJETOS EXPERIMENTALES

2.1.1. Estudios con animales íntegros

En el caso de los experimentos con organismos íntegros (ver figura 4), los animales ayunados se sometieron a tratamientos que modifican los estados de oxidorreducción celular. En esta tesis se utilizaron tres moléculas como agentes que alteran los estados de oxidorreducción celular: etanol, adenosina (ADO) y α -hidrazida de ácido glutámico (GAH [ver inciso 2.2.]). Las dosis fueron:

- etanol: solución al 63 % (v/v); 10ml/kg de peso corporal intragástricamente,

- ADO: 200 mg/kg de peso corporal intraperitonealmente, suspendida en un volumen de 20 mg/ml de solución salina isotónica (NaCl 0.9% [p/v]); y
- GAH: diferentes dosis entre 20 y 160 mg/kg de peso corporal para generar curvas farmacocinéticas y como dosis óptima: 80 mg/kg de peso corporal intraperitonealmente suspendida en un volumen de 8 mg/ml de solución salina isotónica.

Como controles de estos tratamientos se tiene al animal ayunado exclusivamente y al animal que era tratado con una única dosis de glucosa, isocalórica con la de etanol (solución de glucosa al 90% [p/v] administrada intragástricamente a razón de 10 mg/kg de peso corporal).

Después del tratamiento, el animal era sacrificando para obtener tanto muestras de hígado para extracción ácida como para homogenización en amortiguador de fosfatos y muestras de sangre para extracción ácida (ver incisos sobre obtención de muestras y determinación de metabolitos).

2.1.2. Experimentos con hepatocitos aislados

Los hepatocitos aislados fueron obtenidos por medio de la perfusión recirculante de colagenasa de hígados de los animales experimentales mencionados siguiendo básicamente el método de Berry y Friend²³. El proceso es el siguiente: los animales son anestesiados en una cámara de éter realizándoles posteriormente una laparotomía longitudinal extensa para exponer el hígado y los vasos hepáticos. Se disecciona la vena porta haciéndole pasar tres sedas quirúrgicas. Posteriormente se hace una pequeña incisión en la vena para introducir una cánula, la cual se encuentra conectada a un sistema de perfusión. Este sistema consta de dos reservorios con camisas de temperatura constante (37°C); uno de 1000 ml y el otro de 40 ml de capacidad. El primero contiene una solución de Ringer Krebs libre de calcio a pH 7.4 que se utiliza para la canulación inicial y limpieza del hígado sin llevar a cabo recirculación. El segundo contiene un amortiguador similar adicionado de calcio y colagenasa a la misma temperatura y pH el cual se recircula por un periodo de tiempo establecido para cada lote de colagenasa. La velocidad de perfusión es lograda por medio de presión hidrostática.

Posterior a la canulación, las tres sedas se ligan fijando la cánula a la vena porta, se corta la parte infrahepática y luego la parte suprahepática de la vena cava inferior para evi-

tar así aumento de presión dentro del hígado. Se continúa la disección del hígado hasta separarlo por completo del animal y colocarlo ya aislado en un reservorio mantenido a temperatura constante. Este reservorio que es de cristal, se encuentra cubierto de film de polietileno para evitar el contacto directo del hígado con las paredes de vidrio.

Al finalizar un periodo de 10 min con el amortiguador libre de calcio se cambia al amortiguador suplementado con calcio y colagenasa y se inicia la recirculación del mismo. Después de concluir el tiempo de recirculación especificado (que depende del lote y marca de la colagenasa), el hígado se aísla del sistema de perfusión y con ligera tracción mecánica sobre la cápsula hepática se separan los hepatocitos del tejido fibroso no digerido por la colagenasa.

Los hepatocitos así obtenidos se hacen pasar por una malla de nylon y se resuspenden en un tercer amortiguador con calcio, sin colagenasa y con albumina y se centrifugan tres veces, tirando los sobrenadantes y resuspendiendo las células otras tantas veces. La última suspensión es la utilizada para los experimentos incubándose a 37°C bajo diversas condiciones de suplementación con etanol (5mM), ADD (10^{-8} M) y GAH (2.3×10^{-21} a 2.3×10^{-4} M), deteniendo el metabolismo al agregar ácido perclórico a una concentración final de 6% (v/v).

2.2. Tratamientos: moléculas que alteran los estados de oxidorreducción celular.

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis el objetivo último de la misma es el de estudiar los cambios de los sistemas de oxidorreducción celulares y la manera en que estos cambios afectan al metabolismo intermediario hepático. Tres agentes fueron utilizados como alteradores de los estados redox celulares: etanol, ADO y GAH. Existen otras condiciones que alteran a los estados redox y que también han sido estudiadas (ayuno, fructosa, glicerol, aminoácidoacetato) pero en el momento actual se encuentran en estadios preliminares de investigación.

2.2.1. Etanol.

La acción del etanol sobre el hígado ha sido caracterizada ampliamente en especial su efecto sobre el estado redox citoplásmico NAD-dependiente^{23,24}. El etanol siempre ha sido considerado como un tóxico a nivel hepático²⁵ ya que tiene que ser metabolizado en este tejido, siendo sus productos de catabolismo sustancias que alteran grandemente el funcionamiento del hígado²³⁻²⁵. La demostración histopatológica y clínica característica del daño hepático producido por etanol es el llamada hígado grasoso²³, que corresponde a un acúmulo excesivo

de triacilglicéridos en la célula hepática. Se han caracterizado 3 sistemas hepáticos que oxidan al etanol: el sistema de la alcohol deshidrogenasa, el sistema de la catalasa y el sistema microsomal²⁴; estos tres sistemas se encuentran representados en la figura 5. Es bien sabido que el sistema de la alcohol deshidrogenasa es el más activo para oxidar el etanol en intoxicación aguda²⁴.

Considerando al sistema de la alcohol deshidrogenasa (fig. 5) se tiene que el etanol sufre dos deshidrogenaciones: la primera a través de una enzima citoplásmica (alcohol deshidrogenasa NAD-dependiente) y la segunda por una enzima no muy bien caracterizada que al parecer es mitocondrial (aldehído deshidrogenasa NAD-dependiente) formándose de esta manera acetato^{23, 24, 25}. Se ha demostrado que tanto acetaldehído como

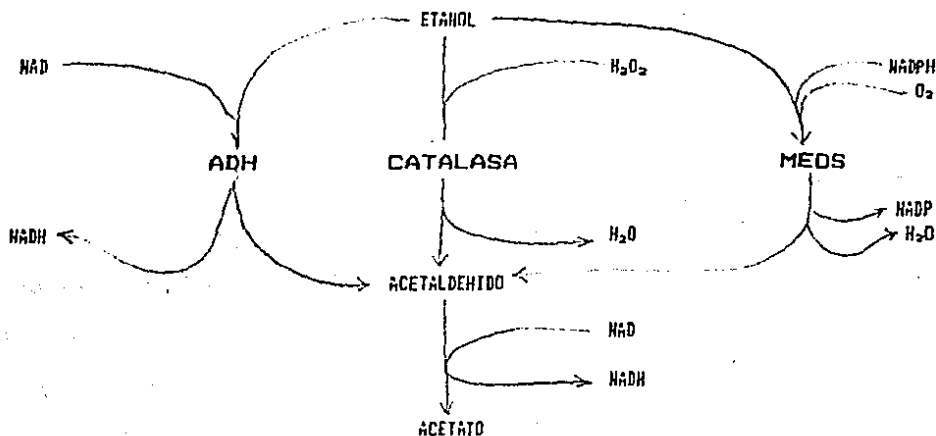


Figura 5: Vías metabólicas para el catabolismo del etanol en el hígado. Se reconocen tres vías: la de la alcohol deshidrogenasa (ADH), la de la catalasa y la del sistema microsomal hepático (MEOS).

acetato son tóxicos hepáticos per se, aunque las concentraciones hepáticas y por ende las séricas de acetaldehído son relativamente bajas ya que la aldehído deshidrogenasa es una enzima muy activa³⁴. Por el contrario, las concentraciones circulantes de acetato se encuentran altas en las primeras horas posteriores a la carga de etanol.

Este acetato posteriormente se convierte en acetil-CoA tanto en el hígado como en otros tejidos³⁵ por medio de la tioquinasa para ácidos grasos de cadena corta con lo que puede ser metabolizado subsecuentemente por vías metabólicas comunes. La acción de la tioquinasa, como su nombre lo dice, es ATP-dependiente, generando una gran cantidad de AMP lo cual contribuye a un catabolismo desmedido de purinas hasta ácido úrico³⁷.

La primera reacción mencionada (alcohol deshidrogenasa citoplásmica NAD-dependiente [fig.5]) es la que ha despertado mayor interés ya que produce un aumento de NADH citoplásmico³⁸⁻³⁹. Como ya fue mencionado, la cantidad de NADH generada es tan grande y la poza de NAD total tan pequeña que este NADH se convierte en producto limitante de la reacción²³⁻²⁶, v. gr.: si no es reoxidado a NAD por algún mecanismo, entonces la oxidación del etanol se verá disminuida³⁹⁻⁴⁰. Dentro de estos mecanismos de reoxidación, el que se ha considerado más importante es el de translocación de equivalentes reductores^{29,30,35,41}. Estudios realizados en animales íntegros y células aisladas de hígado

muestran que la inhibición de las lanzaderas disminuye dramáticamente la oxidación del etanol, en especial cuando la lanzadera de malato-aspartato es la inhibida²⁹⁻³⁰.

En este trabajo se ha utilizado al etanol como una molécula que reconocidamente altera al estado de oxidorreducción citoplásmico NAD-dependiente con el fin de estudiar como diversas vías metabólicas son afectadas a su vez por dichas alteraciones.

2.2.2. Gamma hidrazida de ácido glutámico (GAH).

La GAH, como una molécula que afecta a los estados redox celulares, es introducida en esta tesis. Previamente se había demostrado un efecto inhibitor de las transaminasas por este análogo del ácido glutámico, tanto in vitro como in vivo⁴². En esta tesis demostramos que esta molécula también tiene un efecto inhibitor sobre la lanzadera de malato-aspartato el cual es secundario a su efecto inhibitor de transaminasas. El efecto sobre la lanzadera permitió estudiar otros aspectos de los estados de oxidorreducción celulares, especialmente los relacionados con la interacción entre los estados redox NAD- y NADP-dependientes y corroboramos la importancia de la translocación de equivalentes reductores entre el citoplasma y la mitocondria para el buen funcionamiento del metabolismo hepático.

2.2.3. Adenosina (ADO).

ADO ha sido estudiada en diversas facetas tanto como metabolito celular como su papel como agente hormonal⁴³⁻⁴⁵. Una de estas facetas es el efecto hepatoprotector que el nucleósido tiene cuando se administra etanol a un roedor⁴³. Este efecto, que ha sido estudiado con cierto detalle habiendo sido demostrado una influencia sobre el estado redox citoplásmico, no ha sido explicado en sus bases moleculares⁴³⁻⁴⁵.

En esta tesis hemos utilizado la acción hepatoprotectora de ADO para intentar comprender más ampliamente los fenómenos de regulación de los estados redox sobre el metabolismo hepático. También fue de nuestro interés el buscar una razón molecular del fenómeno hepatoprotector de ADO por lo que se puso énfasis en intentar explicar como es que ADO funciona como agente lipotrópico (antihígado grasoso) en la intoxicación etílica aguda. Dos fueron los resultados principales: primero, ADO tiene un efecto acelerando la translocación de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria debido, al parecer, a un efecto sobre los niveles de nucleótidos de adenina; y segundo ADO tiene un efecto secundario desequilibrando la captación de equivalentes reductores por dos de las deshidrogenasas NAD-dependientes del citoplasma que se han considerado en equilibrio in vivo.

2.3.DETERMINACION DE METABOLITOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

La determinación enzimática de cetoácidos. (piruvato, dihidroxiacetona fosfato, acetoacetato y oxaloacetato) fue modificada de las citas originales⁴⁴⁻⁴⁹ con lo que se optimizó la determinación de dichas moléculas. Estos cambios metodológicos junto con los lineamientos generales de determinación de metabolitos se encuentran en el inciso 2.3.1. incluidos aquellos que no fueron determinados enzimáticamente (triacilglicéridos).

Tanto los extractos ácidos de hígado, sangre y hepatocitos como el homogenizado de hígado en amortiguador de fosfatos eran obtenidos con el fin de utilizarlos para la determinación del contenido celular de metabolitos relacionados con el estado redox celular y metabolitos claves de diversas vías metabólicas (ver figura 4). La metodología de obtención de los extractos de hígado de animales íntegros fue modificada en nuestro laboratorio con respecto a la metodología utilizada por otros autores⁵⁰⁻⁵³. La descripción y validación de dicha metodología se encuentra en el inciso 2.3.2., donde se demuestra que un procedimiento más rápido y sencillo de llevar a cabo es el ideal para obtener muestras ácidas de hígado.

Un análisis sobre las diferentes metodologías utilizadas para determinar los potenciales redox se encuentra en el inciso 2.3.3., donde se concluyó que las determinaciones indirectas utilizando las constantes de equilibrio de las deshidrogenasas NAD- o NADP-dependientes que se encuentran compartimentalizadas son las más adecuadas.

2.3.1. Determinación de metabolitos.

Todas las determinaciones de metabolitos realizadas en este trabajo fueron de tipo enzimático a excepción de la determinación de triacilglicéridos³⁴. Las determinaciones enzimáticas están basadas en la absorción de luz del NADH a 340 nm de longitud de onda y en la no absorción del NAD a la misma longitud de onda³⁵. Utilizando deshidrogenasas NAD(P)-dependientes purificadas se le da especificidad al ensayo con lo que se logra un cambio estequiométrico de la coenzima oxidada a reducida o viceversa habiendo un cambio proporcional en la absorbancia a 340 nm^{35,34}. Considerando la diferencial de absorbancia antes y después de la adición de la deshidrogenasa y el hecho de que el NADH tiene un coeficiente de extinción molar de 6220 a 340 nm de longitud de onda³⁵, se puede obtener la concentración de un metabolito dado³⁴. Las determinaciones con sus referencias originales^{44-49,54,57-63}, se encuentran en la tabla 6.

Como se mencionó previamente se diseñó una determinación multienzimática de piruvato (PIR), dihidroxiacetona fosfato (DAP), oxaloacetato (OAA) y acetoacetato (AAA) llevada a cabo en un espectrofotómetro de doble rayo la cual permite una mayor facilidad para obtener resultados con un menor manejo de muestra y mayor sensibilidad para estos cetoácidos. Este ensayo permite el medir el contenido celular de estos metabolitos en una muestra única disminuyendo así los requerimientos de tejido y de tiempo ya que se requiere menos de 5 minutos para poder llevar a cabo la determinación de los cuatro metabolitos mencionados en cada muestra.

El ensayo fue realizado en un espectrofotómetro de doble rayo (AMINCO DW-2a J4-9650), siguiendo básicamente los métodos originales¹⁴⁻¹⁷. Para este ensayo 1 ml de amortiguador

<u>METABOLITO DETERMINADO</u>	<u>ABV</u>	<u>REFERENCIA</u>
ADENOSIN TRIFOSFATO	ATP	71
ADENOSIN DIFOSFATO	ADP	72
PIRUVATO	PIR	46
DIHIDROXIACETONA FOSFATO	DAP	47
OXALOACETATO	OAA	48
ACETOACETATO	AAA	49
LACTATO	LAC	57
GLICEROL FOSFATO	GAP	59
MALATO	MAL	58
B-HIDROXIBUTIRATO	BHB	70
TRIACILGLICEROL	TAG	54
FOSFO-ENOL PIRUVATO	PEP	46
ETANOL	ETOH	73

Tabla 6: Lista de metabolitos determinados y referencias donde se detalla la metodología. El asterisco (*) denota las metodologías que fueron modificadas y que se presentan en el inciso 2.3.1 de este trabajo

de fosfatos (100 mM) a pH 6.8, 0.1 ml de una solución 6 mM de NADH y 1 ml de extracto o 1 ml de agua destilada en las celdas de muestra y referencia respectivamente se incuban a 37°C y agitando continuamente con un agitador magnético durante todo el ensayo. La determinación de metabolitos se comienza agregando cerca de una unidad de lactato deshidrogenasa en un volumen de 0.01 ml en ambas celdas y se registra el cambio diferencial de absorbancia de las muestras a 340 nm de longitud de onda hasta llegar a estabilización (aproximadamente 30 segundos). El procedimiento se continúa con la adición sucesiva de la misma cantidad de unidades de las deshidrogenasas de α -glicerofosfato, malato y β -hidroxibutirato disueltas en 0.01 ml. Este método permite la determinación sucesiva de PIR, DAP, DAA y AAA en la misma celda.

Las coenzimas y las enzimas purificadas usadas en los ensayos de metabolitos fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La definición de unidad de actividad enzimática para cada enzima fue establecido usando los parámetros de los lotes suministrados por la compañía Sigma. Los otros reactivos fueron del mayor grado de pureza obtenibles.

2.3.2. Obtención de extractos ácidos de hígado.

Un método de un solo paso para fijar y extraer metabolitos de muestras de hígado se detalla a continuación (homogenización deproteinizadora directa [HDD]). Su aplicabilidad

se compara con la metodología comúnmente utilizada de las "pinzas de congelamiento rápido" (PCR²⁰⁻²²). Una recuperación máxima de metabolitos fue lograda con ambas metodologías cuando las muestras de hígado fueron tomadas bajo las siguientes condiciones: a) relación peso a volumen de las muestras entre 35 y 55 mg por ml de medio de homogenización; b) corrección por un factor volumétrico por pérdida al homogenizar de 5 mg/ml; y c) tomadas e iniciada su fijación en no más de 10 segundos después de la incisión abdominal. En conclusión, de las dos metodologías utilizadas, HDD permite una recuperación mayor de metabolitos cuando ambas metodologías son llevadas a cabo utilizando la estandarización de condiciones metodológicas. Aunado a lo anterior, la simplicidad del procedimiento sugiere que HDD es el método de elección para determinar el contenido celular de metabolitos en muestras de hígado y probablemente otros tejidos.

El procedimiento de extracción utilizado para ser adecuado debe de incluir una fase de fijación del estado metabólico del tejido a un determinado tiempo y una extracción adecuada de los metabolitos contenidos en él^{23, 27, 40}. La técnica de las pinzas de "congelamiento rápido" desarrollada por Eranko²⁰, y modificada por Hohorst et al²¹ y Wollengberg et al²² ha sido el procedimiento de elección para fijar y extraer el contenido de metabolitos lábiles de varias muestras tisulares. En esta metodología el tejido es tomado con unas pinzas que previamente se han mantenido sumergidas en nitrógeno líquido. Posteriormente, los metabolitos son extraídos al pulverizar el

tejido en nitrógeno líquido homogenizándolo en ácido perclórico a 0°C.

Nuestros resultados demuestran que otras variables aparte de la extremadamente baja temperatura deben ser controladas para llevar a cabo una recuperación más adecuada de los metabolitos que serán estudiados. De esta manera, siguiendo la metodología original²⁴ y manteniendo condiciones estandarizadas para el tiempo de fijación, el tamaño de la muestra a homogenizar en un volumen dado y considerando las pérdidas de líquido durante el procedimiento, se obtuvieron valores mayores de metabolitos que con las condiciones reportadas previamente^{21,47-70}. También demostramos que un procedimiento en un solo paso llevado a cabo a 0°C y bajo nuestras condiciones estándar puede ser considerado el método de elección para la fijación y extracción del contenido celular del hígado ya que se recuperan mayores cantidades de metabolitos aunado a que es un método más fácil y rápido.

Los animales utilizados fueron sacrificados por un golpe en la nuca e inmediatamente después del sacrificio se les realizó una incisión abdominal extensa exponiendo el hígado. Muestras de hígado de diferentes pesos y utilizando diferentes tiempos de muestreo [definido éste último como el tiempo que pasa entre la incisión abdominal (tiempo 0) y el inicio de la fijación del tejido (ver figuras y tablas de esta sección)], fueron fijados y sus metabolitos extraídos usando una de las técnicas

mencionadas: pinzas de congelamiento (PCR)^a u homogenización directa (HDD), resumidas ambas en la tabla 7.

	<u>PINZAS DE CONGELAMIENTO</u>	<u>HOMOGENIZACION DIRECTA</u>
FIJACION Y PRIMERA EXTRACCION	Congelar el tejido por pinzamiento dentro de los 3-7 seg. de la incisión abdominal	Corte quirúrgico rápido del tejido (3-7 seg) seguido de homogenización inmediata en un vaso ^a pre-pesado con 6 ml de ácido perclórico 0.6 N
	Moler el tejido a temperatura de nitrógeno líquido	
	Homogenizar el molido en un vaso ^a pre-pesado con 6 ml de ácido perclórico 0.6 N	
OBTENCION DE EXTRACTOS CRISTALINOS	Pesar el vaso de homogenización ^b	
	Centrifugar el homogenado (3,000 g·10 min, 4°C)	
	Ajustar el pH del sobrenadante entre 5.5-6.5 con 5 M K ₂ CO ₃	
	Centrifugar el neutralizado (3,000 g·10 min, 4°C)	
	Usar el sobrenadante para determinaciones	
SEGUNDA EXTRACCION	Resuspensión de la primera pastilla (pellet) en 3 ml de ácido perclórico 0.6 N y homogenizar	
	Seguir los cuatro últimos pasos de "Obtención de extractos cristalinos".	

^a El vaso de homogenización (tamaño "A" de la compañía Arthur H. Thomas Co.) es mantenido en una camisa con agua de hielo durante la homogenización, la cual es llevada a cabo con el pistilo conectado a un motor eléctrico girando a 2,500 rpm durante 30 seg y con, por lo menos, cinco inserciones del pistilo.

^b La diferencia entre los pesos del vaso de homogenización antes y después del procedimiento se considera el peso húmedo de la muestra de tejido, tomando en cuenta un factor de error por pérdida de 5 µg/ml (ver el texto)

Tabla 7: Resumen de los pasos empleados para fijar y extraer tejidos con condiciones óptimas de recuperación tanto con la pinza de congelamiento como con la homogenización directa.

Siguiendo alguna de las dos metodologías mencionadas en la tabla 7, todos los metabolitos determinados (según se detalla en el inciso 3), mostraron grandes variaciones en sus valores cuando el peso de la muestra homogenizada era menor a 25 mg/ml de medio de homogenización (datos no mostrados). Esta variación es debida, en parte, al líquido de homogenización que se pierde adherido al vástago, ya que la determinación del peso de la muestra se lleva a cabo indirectamente sacando la diferencia de pesos del vaso de homogenización antes y después de la operación (sin incluir el vástago).

Aún cuando un cuidado extremo fue tomado para prevenir en lo más posible esta pérdida, un promedio de 30 ± 1 mg se pierden en el procedimiento. Ese valor representa el promedio \pm el error estándar de la media de 22 muestras homogenizadas en 6 ml de ácido perclórico 0.6 N a 0°C.

Usando el factor de corrección de 5 mg/ml calculado del valor anterior y omitiendo muestras con pesos menores a 25 mg/ml, los valores de los metabolitos cuantificados utilizando cualquiera de las dos metodologías (PCR o DDH) pueden ser graficados contra el peso de la muestra homogenizada obteniendo dos diferentes patrones de comportamiento: Mientras que el grupo denominado "A" formado por ATP y lactato (LAC) no mostró correlación con el peso de la muestra, el grupo denominado "B"

formado por DAP, PIR, OAA, AAA, α -glicerofosfato (GAP), malato (MAL) y β -hidroxibutirato (BHB) correlaciona con el peso de la muestra negativamente. Los valores de ATP y DAP graficados contra el peso de la muestra se encuentran en la figura 6 como metabolitos representativos de los grupos A y B, respectivamente.

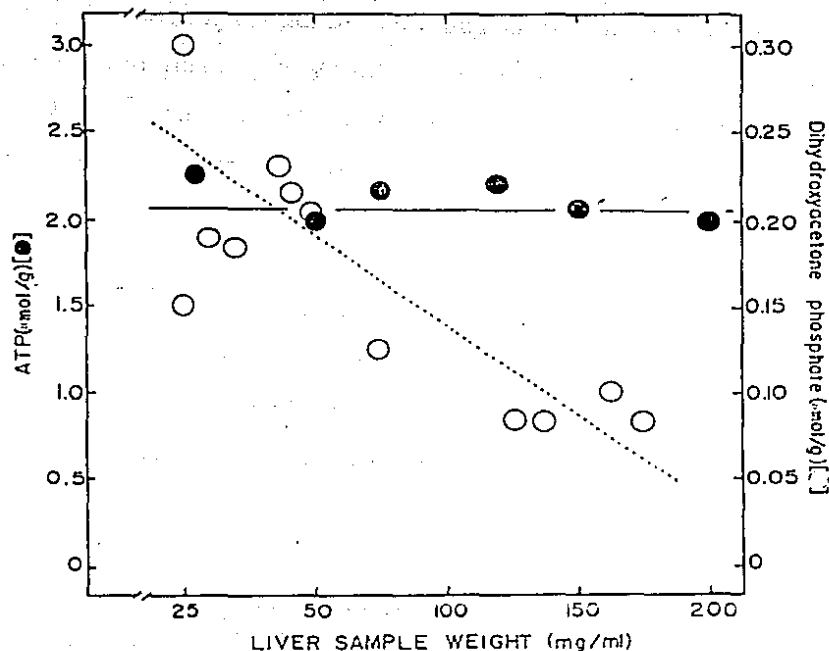


Figura 6: Relaciones entre el contenido de metabolitos en la primera extracción y el peso de la muestra empleada. Se muestran las gráficas "corregidas" para ATP (círculos llenos y línea continua) y para dihidroxiacetona fosfato (círculos vacíos y línea punteada). Las regresiones lineales para ATP y dihidroxiacetona fosfato son $y = -0.0005 x + 2.1$ ($r^2 = 0.21$) y $y = -0.0012 x + 0.25$ ($r^2 = -0.83$) respectivamente.

En la figura 7, se muestran los valores de los metabolitos representativos determinados en una segunda extracción (como se menciona en la tabla 7) mostrados en función del tamaño de la muestra. Para las muestras con un peso alto, el contenido de los metabolitos del grupo A en la segunda extracción aumenta menos del 25% del valor encontrado en la primera extracción. Por el contrario, los valores de la segunda extracción del grupo B aumentan en más del 80% para pesos de muestra superiores a 100mg/ml. Los datos de la primera y segunda extracción del grupo A muestran una primera extracción casi completa en el rango de

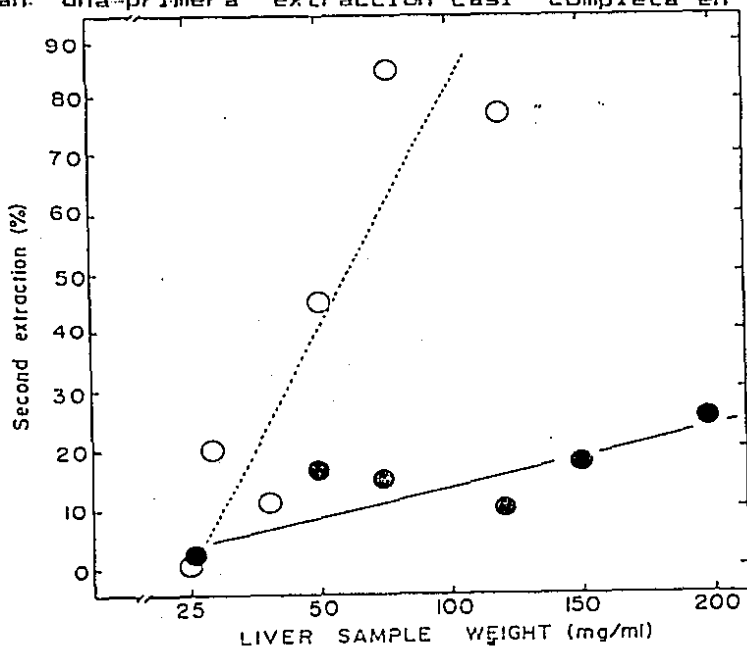


Figura 7: Porcentaje de recuperación en segunda extracción. Los valores recuperados de ATP (círculos llenos y línea continua) y de dihidroxiacetona fosfato (círculos vacíos y línea punteada) en segunda extracción fueron graficados contra el peso de la muestra como el porcentaje de los valores obtenidos en la primera extracción. Las regresiones lineales para ATP y dihidroxiacetona fosfato son $y = 0.06x + 4.6$ ($r = 0.68$), y

pesos verificado, mientras que las extracciones del grupo B sugieren que la eficiencia de la primera extracción disminuye con el aumento del peso de la muestra.

El efecto del tiempo de muestreo, definido como el intervalo de tiempo que pasa entre que se realiza la incisión abdominal y el inicio de la fijación del tejido, también fue estudiado. Los valores de ATP en los homogenados de hígado obtenidos con diferentes tiempos de muestreo se muestran en la tabla 8. Como es esperado debido al efecto de la anoxia, ATP disminuye proporcionalmente con el tiempo de muestreo^{77, 80}. PIR, DAP, DAA y AAA también mostraron cambios dependiendo del tiempo

	TIEMPO DE MUESTREO		
	10 seg	20 seg	30 seg
A T P	2040±190 ^a	1290±250 ^b	980±250 ^c
PIRUVATO	196±35	396±102	218±50
DIHIDROXIACETONA-P	94±52	150±42	172±74
OXALOACETATO	117±50	125±36	337±85 ^{d, e}
ACETOACETATO	198±41	252±80	236±58

^a promedio ± error estándar en nmol/g de peso húmedo de hígado (4 observaciones)

^b p < 0.05 comparado con el grupo de 10 seg

^c p < 0.01 comparado con el grupo de 10 seg

^d p < 0.025 comparado con el grupo de 20 seg

^e p < 0.025 comparado con el grupo de 10 seg

Tabla 8: Efecto del tiempo de muestreo sobre el contenido de metabolitos recuperados utilizando el método de las pinzas de congelamiento.

de muestreo (tabla 8), pero los cambios parecen estar relacionados más que a anoxia, a cambios en las actividades enzimáticas del tejido^{44.47.53.44.48.}

Usando los datos presentados anteriormente se deduce que una recuperación máxima de metabolitos, de los tejidos fijados con cualquiera de las dos metodologías resumidas en la tabla 7 se asegura si se utilizan muestras que pesen entre 35 y 55 mg por ml de medio de homogenización, corregidas por un factor de 5 mg/ml y tomando no más de 10 segundos a partir de la incisión abdominal para su obtención. Con estas limitaciones consideramos que una segunda extracción no era necesaria. En la tabla 9 se muestra la comparación entre el método de las pinzas de congelamiento y el

	HDD	PCR	LITERATURA
A T P	2200±179 ^a	2040±190	2574±130
PIRUVATO	193±20	140±20	177±23
DIHIDROXIACETONA-P	207±13	119±25 ^b	36±4 ^{c,d}
OXALDACETATO	107±15	117±15	7±1 ^{e,f}
ACETOACETATO	103±24	93±42	81±25

* promedio ± error estándar en nmol/g de peso húmedo del hígado (4 observaciones)

^a p < 0.01 comparado con el grupo HDD

^b p < 0.0005 comparado con el grupo HDD

^c p < 0.01 comparado con el grupo PCR

^d p < 0.0005 comparado con el grupo HDD

Tabla 9: Comparación entre los valores obtenidos con las metodologías empleadas para fijar y extraer tejidos animales y los valores reportados en la literatura previamente.

metodo de homogenización directa realizada manteniendo las limitaciones anteriores estrictamente. Se seleccionaron los valores de ATP y los cuatro cetoácidos (PIR, DAP, OAA y AAA) como los parámetros sujetos a comparación.

El ATP fue considerado tanto un control interno del tiempo de muestreo (ver la tabla 8,⁷⁹), como un control externo del peso de la muestra ya que las variaciones de este último no afectan mayormente el contenido de ATP por gramo en un rango bastante amplio (fig. 6). Como es mostrado en la tabla 9, los valores de ATP dentro de los tres grupos estudiados no fueron estadísticamente diferentes. Los valores ligeramente mayores reportados previamente^{51.43-71} son debidos a que representan la adición de los valores de ATP de una primera y una segunda extracción^{53.41}. Valores promedio de 2530 y 2350 nmol/gm de ATP fueron obtenidos cuando se sumó el contenido de ATP de la segunda extracción a los valores reportados del mismo en la tabla 9, para HDD y PCR respectivamente. Si comparamos estos valores con el promedio de los valores reportados (tabla 9) todos correlacionan adecuadamente.

Debido a la labilidad reconocida de los cetoácidos⁶⁴⁻⁶⁸ estos fueron utilizados como medida de la efectividad de los métodos de preparación. Comparando los resultados obtenidos con las pinzas de congelamiento en nuestro laboratorio con lo reportado previamente con la misma metodología^{51.47-72}, no existe una diferencia significativa en los niveles de PIR y AAA. Sin

embargo, los niveles de DAA y DAP son significativamente mayores (tabla 9). Estas diferencias son debidas probablemente a un tiempo de muestreo mayor en los datos previamente reportados⁷⁴ y/o un tamaño inadecuado de la muestra empleada previamente⁸³. En este contexto, la cantidad de tejido empleado en estas publicaciones está en el rango de 1 g por 5 a 6 ml de medio de homogenización⁸³ que corresponde a una concentración final de 166-200 mg/ml. Si este rango de concentración se extrapola utilizando la regresión lineal del grupo B (fig. 6), los valores obtenidos con nuestros resultados son muy similares a los reportados previamente.

Considerando que un beneficio se ha obtenido con las restricciones de peso y tiempo de muestreo, pasamos entonces a la comparación de ambas metodologías de preparación (PCR vs. HDD), donde se demuestra que la recuperación de todos los cetoácidos verificados obtenidos con HDD (tabla 9) es mayor que la recuperación con PCR, demostrando que las condiciones usadas con HDD representan un manejo más apropiado del tejido para la mejor recuperación de metabolitos. En conclusión, de los dos métodos de preparación tisular comparados, la técnica de homogenización deproteinizadora directa (HDD), produce una recuperación mayor de metabolitos cuando ambas metodologías son llevadas a cabo bajo condiciones estandarizadas estrictamente. Agregando a esto la simplicidad del método, se concluye que HDD es el método de elección para la fijación y extracción de metabolitos del hígado y probablemente de otros tejidos.

2.3.3. Comparación de las metodologías para la determinación de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina.

Uno de los problemas fundamentales para el estudio de la influencia de los potenciales redox en el metabolismo es precisamente la determinación de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina²¹. En la tabla 10 se listan las técnicas más comunes de determinación de las diferentes formas de estas moléculas^{21, 21.01, 02}.

Por desgracia todas las formas de determinación de los dinucleótidos presentan un sinnúmero de dificultades y problemas

a) DIRECTAS IN VITRO

DETERMINACION ENZIMATICA DE NAD, NADP, NADH Y NADPH EN EXTRACTOS TISULARES

b) DIRECTAS IN VIVO

ESPECTROFLUOROMETRIA DE SUPERFICIE

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR POR ¹³C

c) INDIRECTAS IN VITRO

DETERMINACION ENZIMATICA DE METABOLITOS RELACIONADOS CON DESHIDROGENASAS NAD(P)-DEPENDIENTES

d) INDIRECTAS IN VIVO

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR POR ¹H DETERMINANDO METABOLITOS RELACIONADOS CON DESHIDROGENASAS NAD(P)-DEPENDIENTES

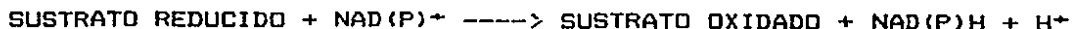
Tabla 10: Metodologías utilizadas para la determinación de potenciales redox intracelulares.

metodológicos que las hacen poco válidas. En diferentes trabajos se han discutido estos problemas²¹. Resumiendo, desde el punto de vista biológico, las determinaciones directas (incisos a y b; tabla 10), es decir las determinaciones del contenido celular total de NAD y NADP y sus contrapartes reducidas, aunque pueden dar alguna información general, no tienen ningún significado metabólico. Esto es debido a que la participación de los diferentes estadios de oxidorreducción de estas coenzimas en el metabolismo celular esta influenciada por la compartamentación y la concentración libre de dinucleótidos (fracción no ligada a proteínas²¹). Por otro lado, las técnicas directas in vivo (inciso b; tabla 12) que daban la impresión de ser de importancia ya que estudian el tejido íntegro, tienen una desventaja adicional a las antes mencionadas y es que no distinguen entre NADH y NADPH^{25,22}.

Una manera de solucionar este problema ha sido determinar los potenciales redox indirectamente (incisos c y d; tabla 12,^{17,21,21}). Estas metodologías se valen de la medición de las concentraciones de sustratos y productos de algunas deshidrogenasas NAD- o NADP-dependientes que se encuentran compartamentalizadas y que a su vez se considera se encuentran en equilibrio químico en el tejido íntegro debido a su velocidad de reacción relativamente alta²¹. Aunque este enfoque ha resultado ser el de mayor validez y uso, existen serios opositores hacia el mismo²¹. Las objeciones principales han sido: la exclusión de las coenzimas ligadas a proteínas y los problemas para la

extracción y determinación de los metabolitos. Estos problemas se han intentado resolver utilizando resonancia magnética nuclear in vivo, proyecto que se encuentra en estadios iniciales de investigación (la referencia ²¹ es producto de este proyecto). La tabla 11 resume las diferentes deshidrogenasas que han sido utilizadas para fines de determinación de los cocientes NAD(P)/NAD(P)H y algunas de sus características más importantes^{17,22,24}.

En estas enzimas la reacción general es:



por lo que la ecuación de equilibrio es:

TIPO	COMPARTIMENTO	K' (K _{eq} /[H ⁺])	PAR REDOX
NAD/NADH			
LDH	CITOSOL	1.11·10 ⁻⁴	LAC/P1R
GDH	CITOSOL	1.31·10 ⁻⁴	GAP/DHAP
MDH	CIT/MIT	2.33·10 ⁻⁵	MAL/OAA
BDH	MITOCONDRIA	4.93·10 ⁻²	BHB/AAH
GLUDH	MITOCONDRIA	3.90·10 ⁻³	GLU/αCG, NH ₄
NADP/NADPH			
MDH	CITOSOL	3.44·10 ⁻²	MAL/P1R, CO ₂
G6PDH	CITOSOL	2.40·10 ⁻³ (?)	G6P/FGH
ICDH	CITOSOL	0.91	IC/αCG

Tabla 11: Características de las deshidrogenasas utilizadas para la determinación indirecta de los potenciales redox en condiciones estándar (38°C, pH 7.0, I = 0.25). La concentración de CO₂ considerada es de 1.16 paol/g. Las abreviaturas se encuentran en la página -xi-.

$$K_{eq} = \frac{[\text{OXIDADO}] \cdot [\text{NAD(P)H}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{REDUCIDO}] \cdot [\text{NAD(P)}]} \dots\dots\dots 1$$

Considerando para fines prácticos que la concentración de protones es constante alrededor de 10^{-7} en el tejido vivo y despejando $\text{NAD(P)}/\text{NAD(P)H}$ se obtiene:

$$\frac{[\text{NAD(P)}]}{[\text{NAD(P)H}]} = \frac{[\text{OXIDADO}]}{[\text{REDUCIDO}]} \cdot \frac{1}{K'} \dots\dots\dots 2$$

donde $K' = K_{eq}/[\text{H}^+]$,²³. La ecuación 2 expresa que conociendo la concentración de los sustratos de estas enzimas se tendrá una idea aproximada del potencial redox siempre y cuando se cumpla el hecho de estar en equilibrio químico in vivo²³. También en la tabla 11 se encuentran listados los pares redox y las K' de cada una de las enzimas consideradas para la determinación de los potenciales redox intracelulares. La ecuación 2 estará afectada por otros miembros si la reacción enzimática involucra otros sustratos como es el caso de la glutamato deshidrogenasa (amonio) y la malato deshidrogenasa descarboxilante NADP-dependiente (bióxido de carbono; ver tabla 11,^{27,28}).

Este sistema indirecto de determinación de potenciales redox (NAD/NADH y NADP/NADPH) que aún teniendo detractores es el más fidedigno, fue el utilizado en el presente trabajo con algunas modificaciones que se mencionan en los incisos siguientes.

RESULTADOS

3.1. EFECTO DE GAH SOBRE EL ESTADO REDOX HEPATICO

Para estudiar a las lanzaderas se utilizan inhibidores o activadores de las reacciones involucradas en el proceso^{29,30}. En la citas mencionadas, se listan las sustancias que han sido utilizadas para el estudio de la lanzadera de malato-aspartato (LMA) en el hígado y que eminentemente corresponden a activadores o inhibidores de las reacciones de transaminación³⁰. En esta parte del trabajo se exploró el efecto de la γ -hidrazida de ácido glutámico (GAH), un inhibidor de transaminasas previamente documentado por Tapia *et al*¹², sobre LMA cuando se utiliza etanol como generador de NADH citosólico con el fin último de demostrar la importancia de la lanzadera en el metabolismo hepático. La GAH mostró diferentes efectos sobre la actividad de la lanzadera dependiendo de la dosis utilizada: activación a concentraciones bajas e inhibición a altas concentraciones. Utilizando el efecto inhibitorio de dosis mayores de GAH estudiamos el efecto de dicha inhibición sobre la lipogénesis y la gluconeogénesis hepática en presencia de etanol. Se encontraron resultados que sugieren que

tanto la generación de grasas como de glucosa están aumentadas por efecto del GAH.

3.1.1. Demostración del efecto directo sobre hígado.

En esta parte del trabajo se llevaron a cabo experimentos con animales integros y células hepáticas aisladas. Los experimentos con animales integros se llevaron a cabo en los animales mencionados en el capítulo de metodología administrándoles una dosis única de etanol (5mg/kg de peso corporal; intragástricamente) y una inyección intraperitoneal inmediata de diferentes dosis de GAH como se muestra en las figuras 8, y 9 y en la tabla 12. Los animales fueron decapitados a los tiempos mencionados en las figuras previamente referidas considerando tiempo cero cuando la hidrazida fue inyectada. Muestras de hígado fueron tomadas según se mencionó previamente (HDD en la tabla 7) y se determinaron LAC, MAL, PIR, BHB, AAA, y triacilglicéridos (TAG) hepáticos y etanol en sangre total, siguiendo las metodologías reportadas en la tabla 6.

Hepatocitos aislados siguiendo la metodología descrita en el inciso 2.1.2., se incubaron en solución de Ringer-Krebs adicionada con etanol a una concentración final de 5mM, albúmina (1%) y calcio (concentración final 1.3mM). GAH fue adicionada a diferentes concentraciones como se detalla en la figura 10. El metabolismo celular se detuvo al agregar ácido perclórico a una

concentración final de 6% midiéndose etanol en los extractos neutralizados (tabla 6).

En la figura 8 se muestran las curvas dosis-respuesta de etanol sanguíneo (panel A) y de LAC y MAL hepáticos (panel B) a la administración de GAH a animales íntegros. En el panel A se muestra un comportamiento bifásico de las concentraciones de etanol sérico, mientras que en el panel B se muestran tanto un aumento lineal de MAL hepático (estadísticamente significativo desde la dosis más baja de GAH) como un aumento de LAC hepático siguiendo un comportamiento sigmoideo. Como es obvio en esta figura, las concentraciones bajas de GAH (10-20 mg/Kg de peso corporal) producen una disminución del etanol sérico respecto al control coincidiendo con un mantenimiento de los valores de LAC

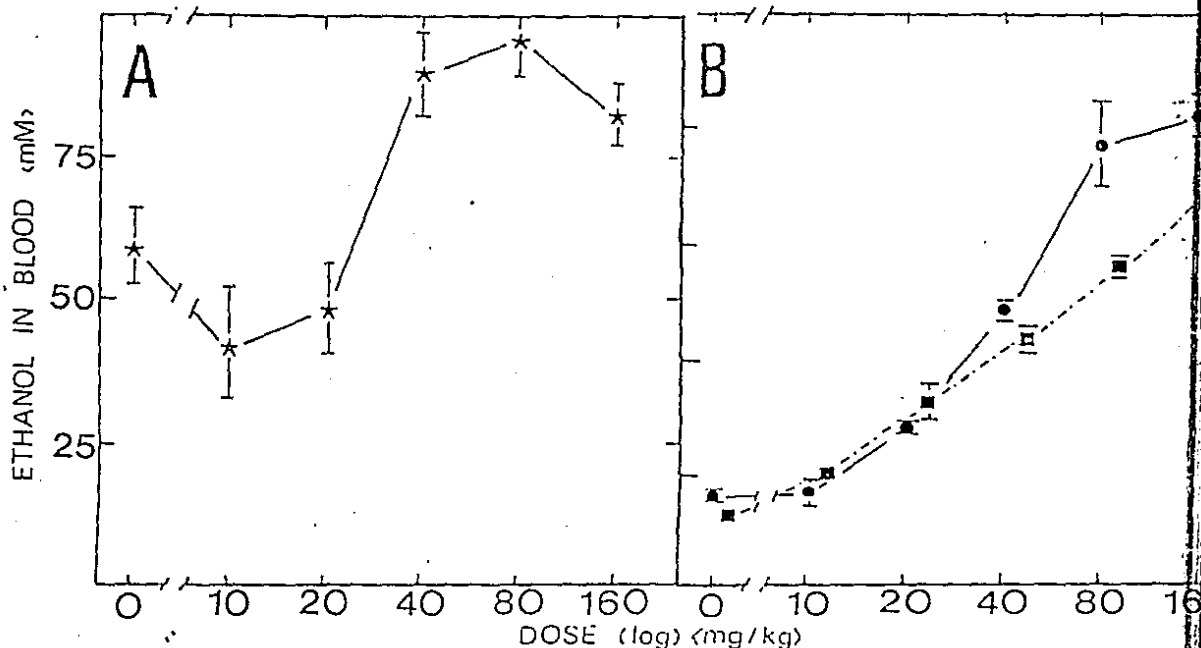


Fig. 8: Curvas dosis-respuesta de etanol (panel A) y malato y lactato (panel B) como respuesta a la presencia de GAH en animales previamente intoxicados con etanol.

hepático. Esto probablemente refleja una activación de la lanzadera por la presencia de dosis bajas de GAH demostrado por un aumento en la desaparición del etanol sérico.

En las curvas de tiempo-respuesta de etanol sérico y malato y lactato hepáticos (paneles A y B de la figura 9 respectivamente) se muestra que mientras en el control los niveles de etanol sérico se mantienen dentro del mismo rango entre 0.5 hr y 8 hr después de su administración, la presencia de GAH produce un bloqueo en la desaparición de etanol en sangre que es máximo a las cuatro horas y regresa a valores normales a las 8 horas (panel C). En el caso de LAC y MAL hepáticos (panel D),

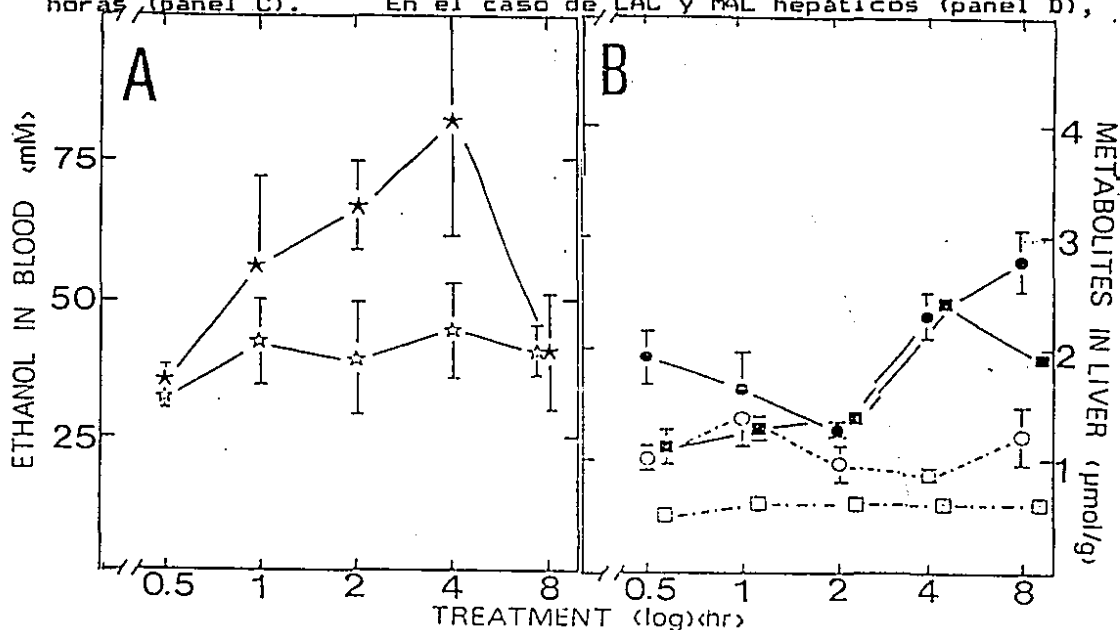


Figura 9: Curvas tiempo-respuesta de etanol (panel A) y malato y lactato (panel B) a la presencia de GAH en animales previamente intoxicados con etanol.

los valores del primero son estadísticamente mayores en presencia de GAH solamente después de cuatro horas de tratamiento, coincidiendo con la disminución máxima de la movilización del etanol sérico, mientras que el segundo es significativo desde el inicio del tratamiento. Aún así hay una elevación máxima de MAL hepático concomitantemente con la disminución máxima de la movilización del etanol sérico. Lo interesante es notado cuando, a las 8 horas, el etanol regresa a valores control, la concentración de MAL tiende a bajar también (aunque no llega a valores control), y la concentración de LAC sigue aumentando en el tiempo.

Para demostrar que el efecto de la hidrazida es directo sobre el metabolismo hepático se llevaron a cabo experimentos con hepatocitos aislados. En estos experimentos (figura 10) se encontró un efecto muy similar que el encontrado en animales íntegros: bajas concentraciones de GAH aumentaron la desaparición

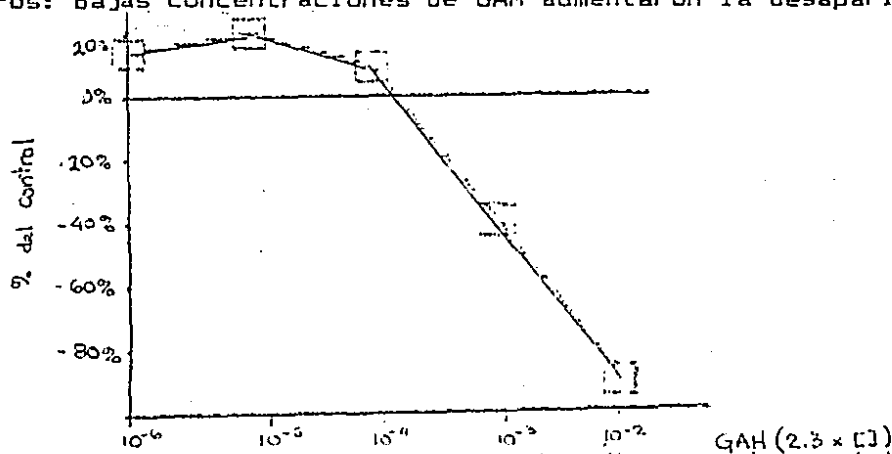


Figura 10: Curva dosis-respuesta del consumo de etanol por hepatocitos en presencia y ausencia de GAH.

de etanol mientras que dosis mayores inhibieron esta desaparición casi llegando a un 100% en el caso de la dosis de 2.3×10^{-2} M. Esto demuestra que el efecto de la GAH es directo sobre el hígado.

En la tabla 12 se muestran los valores de los cocientes NAD/NADH citosólicos y mitocondriales en presencia y ausencia de

	SIN GAH	CON GAH
LAC	860±160 (13)	2590±340* (5)
PIR	110±30 (3)	160±40 (4)
MAL	670±70 (6)	2170±200* (5)
BHB	1020±130 (5)	1010±50 (5)
AAA	140±50 (4)	160±70 (4)
LAC/PIR	7.81	16.19
MAL/PIR	6.09	13.56
BHB/AAA	7.28	6.31
NAD/NADH CITOSOLICO	1152	556
NAD/NADH MITOCONDRIAL	2.80	3.20
NADP/NADPH CITOSOLICO	0.0056	0.0025

* $p < 0.0005$ contra el valor control

Tabla 12. Efecto de GAH sobre los parámetros del estado redox citoplásmico y mitocondrial en hígados agudamente intoxicados por etanol.

GAH en animales integros intoxicados con etanol. Los valores reportados muestran claramente como en presencia de GAH hay un aumento del valor de NADH citoplasmico demostrando la alteración en la movilización de equivalentes reductores del citoplasma a la mitocondria debido a la presencia de la GAH.

Resumiendo, en un higado agudamente intoxicado con etanol, donde la concentración de NADH citosolico se encuentra aumentada, dosis altas de GAH, un reconocido inhibidor de transaminasas, muestran una disminuci6n en la actividad de la lanzadera de malato-aspartato, manifestada por una disminuida oxidaci6n del etanol, por una relaci6n NAD/NADH citoplasmica disminuida y por la elevaci6n de sustratos reducidos generados por las deshidrogenasas que comparten el NADH en el citosol (LAC y MAL).

3.1.2. Inhibici6n de la lanzadera de malato-aspartato y lipog6nesis.

Para demostrar el efecto que sobre los TAG hepaticos tiene la inhibici6n de la lanzadera de malato-aspartato se sigui6 la metodologia reportada en el inciso 3.1.1., estudiando algunos parámetros relacionados con el metabolismo de lipidos. En la

figura 11 se muestran los resultados de las determinaciones de TAG en hígados de animales íntegros tratados con etanol o etanol más GAH. En la tabla 12 se muestran los valores de la relación NADP/NADPH citoplásmica donde se demuestra una disminución de la misma, esto es la presencia de etanol produce un aumento de NADPH²⁴ que es potenciado por la inhibición de la LMA. Como es sabido, el NADPH es sustrato para la síntesis de ácidos grasos²⁷ que se pueden acumular en forma de TAG hepáticos.

En estos resultados se ve que existe un efecto importante sobre la concentración de TAG en hígado cuando está tratado con el inhibidor de la LMS. Esto último sugiere que el efecto productor de hígado grasoso que se ha reportado tiene el etanol²⁴ y que aquí se potencia por la presencia de GAH, es un efecto directo sobre el metabolismo hepático y no un efecto por

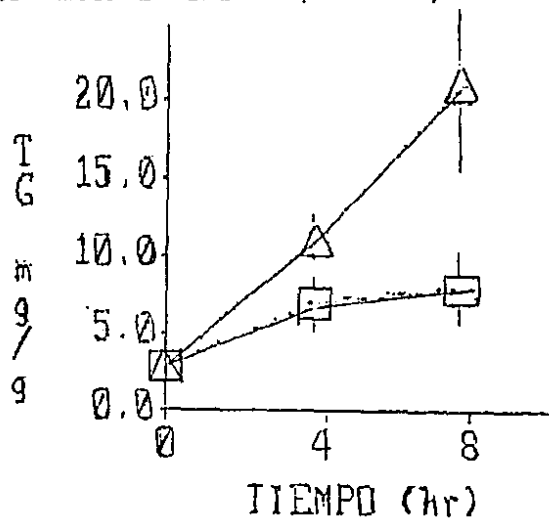


Figura 11: Curvas de concentración de triacilglicéridos en el hígado en presencia (triángulos) y ausencia (cuadros) de GAH. En I, $p < 0.025$ y en II $p < 0.01$.

movilización alterada de lípidos (disminución de la salida y/o aumento de la entrada) como se ha sugerido previamente⁹⁰.

Para fundamentar la hipótesis anterior se buscó un sistema celular lipogénico que pudiera ser activado como respuesta a la inhibición de la lanzadera de malato-aspartato y que tuviera relación con la generación de equivalentes reductores en el citosol por etanol. La explicación más adecuada que se encontró para justificar el aumento de los niveles de lípidos por inhibición de LMS es una probable activación del ciclo de malato-piruvato (CMP^{17.91}), como respuesta al aumento de NADH citosólico producida por el etanol y a la acción de la GAH.

Dicho ciclo y diversas vías metabólicas involucradas con él se encuentran esquematizados en la figura 12.

Teóricamente la inhibición de LMA por GAH producirá un aumento en el flujo metabólico en CMP aumentando en mayor medida algunos precursores lipogénicos (citrato, citoplásmico y NADPH). En este sentido, nuestros resultados experimentales muestran que las relaciones NADP/NADPH reportadas en la tabla 12 están en favor de estas suposiciones. Más aún, el GAP, precursor del glicerol de los TAG se ha encontrado aumentado en hígados de animales previamente intoxicados con etanol en presencia de GAH

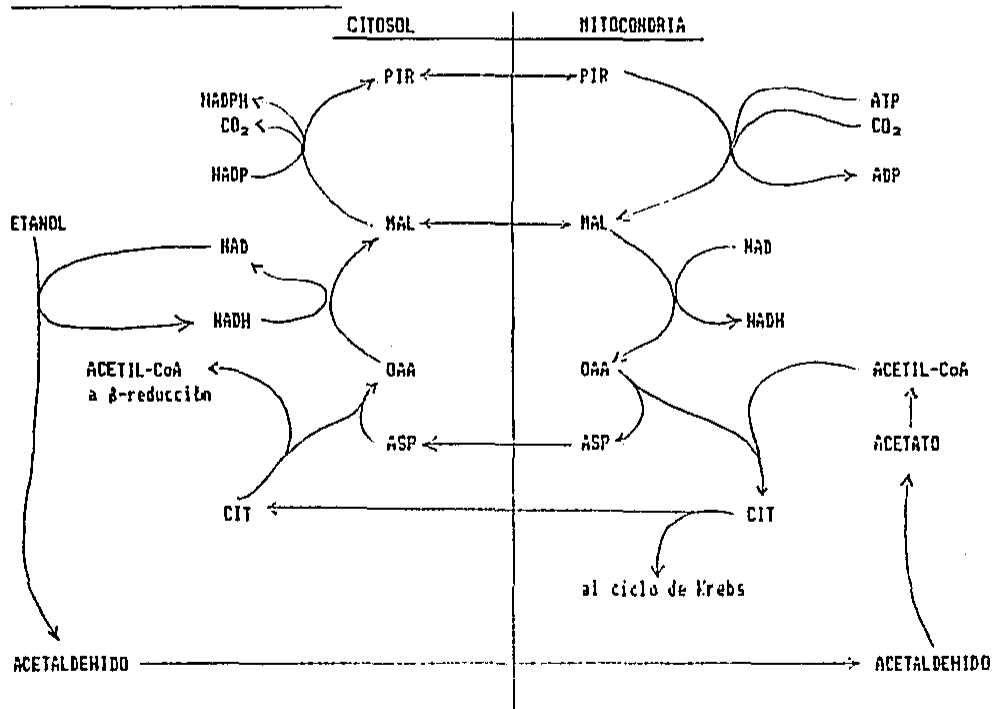


Figura 12: Mapa metabólico de integración del ciclo malato-piruvato con la lanzadera de malato-aspartato, el ciclo de Krebs, y la vía principal de oxidación del etanol en el hígado.

(ver incisos siguientes), proveyendo de un factor adicional para considerar una síntesis aumentada de TAG como respuesta a las alteraciones metabólicas del etanol en el hígado.

También el hallazgo de que la relación NAD/NADH mitocondrial se encuentra mantenida en presencia o ausencia de GAH (tabla 12) puede ser explicado en este contexto: el OAA formado por la deshidrogenasa málica (NAD) mitocondrial puede brincar el paso bloqueado de la transaminación siguiendo el camino del citrato en CMP (ver figura 12), por lo que sigue existiendo transferencia de NADH del citosol a la mitocondria aún con el bloqueo de la lanzadera. Por otro lado, para que el acetaldehído se convierta en acetato se requiere de la participación de la aldehído deshidrogenasa enzima que genera NADH mitocondrial en el catabolismo de etanol³³.

3.2. EFECTO DE ADENOSINA SOBRE EL ESTADO REDOX HEPATICO

En trabajos previos Hernandez Muñoz et al mostraron que ADO produce un efecto protector del hígado en ratas integras contra el acúmulo de lípidos en este órgano (hígado grasoso) producido por intoxicación etanólica³³. La ADO inyectada concomitantemente o dos horas después de la administración de etanol, produjo una disminución significativa de los niveles de TAG hepáticos en comparación con animales control a los que se

administrò etanol solo. Aunado a esta disminuciòn de TAG, tambièn fue mostrado por estos autores, que el estado redox del sistema de la deshidrogenasa de GAP (sistema citoplàsmico) se modificaba en presencia de ADD. Graficando los valores de TAG vs. NAD/NADH por este sistema se encontrò una relaciòn lineal. Con estos datos se demostrò que existe una relaciòn importante entre el estado redox citoplàsmico NAD-dependiente y la apariciòn de TAG en el hígado y que la ADD modifica ambos paràmetros favorablemente⁴³.

El mecanismo por el cual ADD modifica estos paràmetros ha sido motivo de estudio por el mismo grupo de autores, sin haber llegado a una conclusiòn adecuada⁴³⁻⁴⁵. En el presente trabajo se discuten tres aspectos del problema: a) la demostraciòn experimental de que el efecto de ADD es directo sobre el hígado; b) la participaciòn de ADD en la translocaciòn de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria y c) la participaciòn de ADD para desequilibrar la captaciòn de equivalentes reductores por las diferentes deshidrogenasas citoplàsmicas.

3.2.1. Demostraciòn del efecto directo sobre el hígado.

Como se mencionò en el inciso respecto al efecto de la GAH, en la actualidad no se tiene una idea clara del por què de

la formación del hígado grasoso por ingesta desmedida de etanol²⁵. Se han postulado mecanismos por movilización afectada de grasas y mecanismos por metabolismo hepático alterado²⁶. Nuestros resultados con GAH sugieren una participación directa del metabolismo hepático. Considerando lo anterior y el hecho de que los niveles de TAG hepáticos son directamente proporcionales con la magnitud del etanol ingerido y de su velocidad de oxidación, se sugiere que cualquier efecto sobre niveles de lípidos hepáticos o etanol sanguíneo post-ingesta de etanol es directo sobre el metabolismo hepático. Es de esperarse entonces, que ADO, la cual actúa sobre los niveles de lípidos hepáticos post-ingesta de etanol²⁷, tenga una participación directa sobre el metabolismo hepático. En relación a esto, Hernández-Muñoz et al²⁸, midieron los niveles de etanol en sangre y encontraron que estos disminuían más rápidamente en presencia de ADO que cuando no se administraba el nucleósido.

Aún así debido a que los experimentos de Hernández-Muñoz et al fueron realizados en animales íntegros²⁸, no se podía descartar que el efecto de ADO fuera sobre tejido adiposo (impidiendo la movilización de grasas) y no sobre hígado. Es más, se sabe que ADO tiene diversos efectos, tanto metabólicos como hormonales, a nivel del adipocito²⁹. Es por esto que se decidió investigar si ADO tiene un efecto directo sobre el hígado para disminuir los niveles de TAG o si lo visto por el grupo de Hernández-Muñoz es secundario a un efecto primario en tejido adiposo. Esto fue hecho con el objetivo de fundamentar más la

hipótesis sobre una alteración hepática directa del etanol para generar el hígado grasoso.

El sistema biológico que se utilizó fue el de hepatocitos aislados con la incubación de los mismos con los metabolitos en cuestión. Encaramos dos problemas con este sistema: a) los hepatocitos tienen una enzima que desamina al nucleósido activamente⁹³, por lo que en ocasiones es difícil determinar su efecto metabólico y b) hasta el momento actual no ha sido posible estudiar síntesis activa de lípidos en hepatocitos ya que no se cuenta con sistemas suficientemente sensibles⁹⁴. Para solucionar el primer problema se utilizó un inhibidor de la ADO desaminasa la eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina (EHNA^{93,95}). Como su nombre lo dice, el EHNA es un análogo de ADO que se fija a la desaminasa produciendo inhibición no-competitiva⁹³, por lo que se esperaba que el efecto de ADO, si es a nivel hepático, fuera potenciado por dicho compuesto. Para resolver el segundo problema se estudió la oxidación del etanol como marcador para el efecto de ADO que, aunque no es la manera más adecuada para obtener resultados, si había antecedentes sobre el efecto de ADO favoreciendo la oxidación del etanol en animales integros⁹³.

Se obtuvieron hepatocitos aislados por el mismo método detallado en el inciso 2.1.2., de los animales experimentales previamente mencionados y que son muy similares a los usados por el grupo de Hernández-Muñoz⁹³. Las células se incubaron en

presencia de etanol y se cuantificó la velocidad de oxidación del etanol en presencia o ausencia de ADO y/o EHNA. Los resultados se presentan en la tabla 13 donde se demuestra que ADO tiene un efecto directo sobre la oxidación del etanol por el hepatocito cuando se encuentra en presencia de EHNA pero no lo tiene por si sola. Lo más interesante de los resultados se encuentra en el valor de oxidación del etanol cuando solamente se agregó EHNA. El hecho de que esta molécula por si misma produzca el efecto de aumento en la oxidación del etanol sugiere que los niveles de ADO endógenos que no son desaminados por el hepatocito son suficientes para producir la aceleración del catabolismo del etanol.

Con esta explicación, en este inciso concluimos positivamente: ADO tiene un efecto directo sobre la oxidación del etanol (aunque es necesario visualizarlo en hepatocitos aislados inhibiendo a la adenosina desaminasa por medio de EHNA), lo que sugiere que el efecto lipotrópico y sobre el estado redox

CONDICIONES	% OXIDACION
ETANOL SOLO	100
ETANOL + ADO	97
ETANOL + EHNA	147
ETANOL + ADO + EHNA	142

Tabla 13: Efecto de ADO y EHNA sobre hepatocitos aislados incubados en presencia de etanol.

intrahepático también es directo sobre el hígado lo cual fundamenta nuevamente nuestra hipótesis de generación de hígado grasoso por alteraciones metabólicas directa sobre el hígado.

3.2.2. Efecto sobre la lanzadera de malato-aspartato

Diversos sistemas se han intentado para explicar el efecto lipotrópico (anti-hígado grasoso) de ADO dando resultados fundamentalmente negativos³³⁻³⁵. Tres posibles efectos fueron estudiados previamente: a) aumento de la poza de nucleótidos de adenina con un aumento de ADP y AMP que aceleran la utilización de NADH por la cadena respiratoria³³; b) aceleración de la alcohol deshidrogenasa por un efecto hormonal de ADO³⁴; y c) la aceleración del sistema alternativo de oxidación del etanol (catalasa) por el catabolismo de ADO (generación de peróxidos por el aumento de síntesis de ácido úrico³⁵), habiendo sido reportado que el primero sucede muy pobremente como para explicar el fenómeno y los otros dos fueron resultados completamente negativos. Era de esperarse que el último efecto fuera negativo ya que como se mencionó previamente, el etanol por sí mismo eleva la concentración de ácido úrico por un aumento desmedido en la degradación de purinas^{36,37}.

Un sistema en el que no había sido demostrado el efecto de ADO en la intoxicación etanólica y que consideramos fundamental fue el acarreo de equivalentes reductores del citoplasma a la

mitocondria. La razón por la cual fue considerado importante es porque en la literatura se considera que las lanzaderas son el paso limitante en la oxidación del etanol^{29,30}. Estas son limitantes por el hecho de que el primer paso del catabolismo del etanol se lleva a cabo en el citosol generando NADH estequiométricamente a la concentración de etanol ingerida^{29,30}. Considerando que la concentración citoplásmica del dinucleótido es baja y constante¹⁰, se requerirá un sistema que lo reoxide para poder continuar utilizándose en el catabolismo del etanol. En las figuras 8 y 14 se presentan, el catabolismo del etanol y los pasos que generan equivalentes reductores junto con las reacciones involucradas de la lanzadera de malato-aspartato que es considerada como paso limitante. Si ADO acelerara este paso limitante se podrían justificar los datos observados respecto a TAG, estado redox citoplásmico y oxidación del etanol fundamentando nuevamente la hipótesis de metabolismo hepático alterado como generador de hígado grasoso post-etanólico.

En nuestra hipótesis de trabajo consideramos que una aceleración de LMS provocaría que los equivalentes reductores generados citoplásmicamente estuvieran más fácilmente disponibles por la cadena respiratoria con lo que se produciría un aumento de NAD citoplásmico y una mayor facilidad para oxidar etanol por el sistema de la alcohol deshidrogenasa NAD-dependiente³¹. Esto se demostraría por una relación NAD/NADH citoplásmica aumentada y un aumento en la oxidación del etanol, que como se ha mencionado,

así se encuentran cuando se administra ADD a animales intoxicados agudamente con etanol⁴³.

Por otro lado, considerando el ya mencionado eslabonamiento entre LMS y CMP se tendría que si se acelera la primera, la segunda trabajará menos por lo que la relación NADP/NADPH aumentaría y la generación de acetil-CoA citoplásmica disminuiría concomitantemente. De esta forma la síntesis de lípidos estaría disminuida por carencia de precursores. Como se mencionó, los niveles de TAG hepáticos están disminuidos en presencia de ADD⁴³. Luego entonces, si inhibimos LMS en presencia de ADD en animales intoxicados con etanol, debemos encontrar una anulación de los efectos del nucleósido.

En las tablas 18 y 19 se muestran los resultados obtenidos cuando GAH fue utilizada como inhibidor de la lanzadera de malato-aspartato, con el fin de ver si con esto se bloqueaba concomitantemente el efecto de ADD sobre el metabolismo del etanol. En estos experimentos, a los animales se les administró etanol intragástricamente e inyecciones intraperitoneales de ADD y solución salina o GAH. Estos animales fueron sacrificados a las 8 horas posteriores a las administraciones. El sacrificio fue llevado a cabo por decapitación y se tomaron muestras de hígado para extracción ácida y homogenización en amortiguador de fosfatos. Las muestras fueron procesadas como se indica en la tabla 9 para homogenización directa. En estos experimentos se determinaron los metabolitos que se indican en la tabla 14, que

	LAC	PIR	GAP	DAP	MAL	GAH	BHB	AAA
CONTROL	543±99 (6)	6±1 (5)	611±61 (5)	17±3 (4)	531±65 (9)	2±0.5 (4)	1004±90 (3)	3±1 (3)
ADD	284±59 (4)	7±2 (5)	545±70 (5)	13±2 (5)	356±21 (4)	6±0.4 (3)	674±21 (4)	3±1 (3)
p<t	0.025				0.025	0.005		
GAH	2528±334 (8)	16±1 (4)	1595±414 (5)	13±1 (5)	1490±191 (10)	2±0.3 (4)	397±123 (4)	2.5±0.3 (3)
p<t	0.0005	0.0005	0.0005		0.0005		0.01	
GAH + ADD	1761±406 (5)	17±1 (4)	1490±310 (5)	17±2 (5)	985±174 (4)	2±0.4 (5)	645±85 (5)	4±1 (3)
p<t	0.0005	0.0005	0.0005		0.025			
p<t<t					0.05			

Tabla 14: Efectos sobre los parámetros del estado redox intracelular de adenosina (ADD), α -hidrazida de ácido glutámico (GAH) y ambos combinados sobre hígados intoxicados con etanol. Los valores se reportan en nmol/g de peso húmedo y corresponden al promedio \pm el error estándar con el número de observaciones en paréntesis. p<t corresponde a la comparación con el grupo control; p<t<t corresponde a la comparación con el grupo de GAH. La correspondencia con las abreviaturas se encuentra en la hoja ix.

corresponden a los resultados en relación a los estados redox intracelulares, y los reportados en la tabla 15 que corresponden a los parámetros de carga energética y triacilglicéridos.

Como se puede ver en la tabla 14, la presencia de ADO en un hígado intoxicado con etanol, produce disminuciones de los niveles de hidroxiacidos siendo significativas las disminuciones de LAC y MAL. También produce una disminución no significativa de los niveles de TAG (tabla 15), lo cual concuerda con trabajos previos¹³. Cuando se administra GAH, su efecto es patente en todos los resultados siendo altamente significativos los aumentos de LAC, PIR, GAP y MAL y la disminución de BHB, todos hablando de la inhibición de la lanzadera de malato-aspartato. Los TAG

	ATP	ADP	AMP	PEP	TAG
CONTROL	1158±154 (5)	1132±88 (4)	362±101 (5)	210.25 (4)	8.4±0.5 (4)
ADO	1174±191 (5)	947±158 (5)	370±84 (5)	7±0.01 (3)	6.1±0.8 (5)
p<t				0.0005	
GAH	746±241 (4)	1174±97 (4)	351±46 (5)	8±1 (3)	21.3±4 (4)
p<t				0.005	0.005
GAH + ADO	1288±165 (4)	963±35 (5)	360±64 (4)	5±2 (5)	15.7±4 (5)
p<t				0.01	0.01
p<t†	0.05	0.05			

Tabla 15: Efecto sobre los parámetros energéticos celulares y triacilglicéridos, o adenosina (ADO), α -hidrazida de ácido glutámico (GAH) y ambos sinérgicamente en hígados agudamente intoxicados con etanol. Los valores se reportan en nmol/g de peso húmedo, a excepción de TAG que se reportan en mg/g de peso húmedo, y corresponden al promedio ± el error estándar con el número de observaciones en paréntesis. p<t corresponde a la comparación del grupo en cuestión con el grupo control, mientras que p<t† corresponde a la comparación con el grupo de GAH. La correspondencia con las abreviaturas se encuentra en la hoja ix.

tambièn se encuentran elevados correspondiendo a una posible activaciòn del ciclo de malato-piruvato secundario al aumento de MAL.

Al tratar a los animales con ADO y GAH se encuentra que aunque los valores de los hidroxiaácidos se encuentran disminuidos en relación al grupo con GAH, estos cambios no son estadísticamente significativos con excepción de MAL, lo cual habla de que el efecto de ADO se encuentra parcialmente anulado por la presencia del inhibidor de la LMA. Esto sugiere que el efecto hepatoprotector de ADO tiene que ver con el funcionamiento de LMA aunque al parecer no es un efecto directo sobre la lanzadera de malato-aspartato.

Por otro lado, es interesante notar que los ùnicos resultados con significado estadístico entre GAH y GAH más ADO (tablas 14 y 15), son una disminuciòn de MAL, un aumento de ATP y una disminuciòn de ADP. Considerando que el transporte de MAL a travès de la membrana mitocondrial interna no està afectado por la presencia de GAH (la inhibiciòn està lejos de este paso [ver figura 12]), se pueden inferir dos posibilidades: que hubo transporte aumentado de MAL hacia la mitocondria o que se generò una mayor cantidad de NADPH para síntesis de lípidos por la enzima málica. Lo segundo se descarta porque los valores de TAG están disminuidos en presencia de ADO y no aumentados como es de esperarse si esta es la hipótesis correcta. Luego entonces esto sugiere que el efecto de ADO se relaciona probablemente a un

aumento en el transporte de MAL hacia la mitocondria aún en presencia de un inhibidor de LMA. Este hecho unido a una relación ATP/ADP aumentada y a una elevación de la suma de ATP+ADP en el caso de ADO más GAH comparado con GAH solo (tabla 15), lleva a sugerir que el efecto de ADO se encuentra a nivel de la cadena respiratoria debido a una mayor disponibilidad de nucleótidos de adenina que pueden ser fosforilados.

Como se mencionó al principio de este inciso, este mecanismo fue descartado por el grupo de Hernandez-Muñoz *et al*⁴³, pese a que sus resultados no eran totalmente negativos. considerando que los nucleótidos de adenina están aumentados ligera y tempranamente cuando se administra etanol y ADO, comparado contra el control de etanol solo en los resultados reportados por este grupo de investigadores⁴³, y que cuando se inhibe la lanzadera se vuelven a encontrar valores altos de estos nucleótidos (ver tabla 15) en presencia de ADO, se sugiere que el efecto de la misma, es proveer precursores de purinas que afectan a la cadena respiratoria aumentando tanto la reoxidación del NADH mitocondrial como el transporte de MAL. Como aquí se está considerando que el efecto de adenosina es de tipo metabólico los resultados con EHNA, el análogo de ADO, sugieren que la ADO endógena, que no es desaminada debido a la presencia de EHNA, pese a ser baja en concentración, es suficiente para causar un aumento en la oxidación del etanol por los hepatocitos, por lo que para obtener el efecto hepatoprotector en animales integros

no se deben ver aumentos exagerados en las pozas de ATP y ADP o en la relación ATP/ADP en el hígado.

El aumento en el transporte transmembrana de MAL producido por ADO, que propicia la reoxidación del NADH citoplásmico acelerando la oxidación del etanol tiene una explicación fundamental: como la cadena respiratoria está activada por la presencia de ADO, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos está activado también. Esta activación producirá un aumento en la oxidación intramitocondrial de MAL a OAA, la condensación del mismo con acetil-CoA a citrato, pero en vez de salirse este último de la mitocondria completando el ciclo lipogénico de citrato-piruvato, el citrato continuará en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (fig. 12). Esta hipótesis fundamenta nuevamente el hecho de que ADO tiene un efecto de tipo metabólico y no hormonal (o, en el último de los casos, ambos combinados) para acelerar la oxidación del etanol y disminuir la lipogénesis hepática.

La otra posible explicación de la disminución de MAL pudiera ser que entra a gluconeogénesis. Para demostrar esto se estudiaron los niveles de fosfoenolpiruvato (PEP; tabla 15) como indicadores de la entrada de esqueletos de carbono hacia la síntesis de glucosa.

En presencia de etanol tanto GAH como ADO producen un aumento significativo de PEP. Cuando se encuentran combinados

el aumento existe pero no es significativo. Con estos resultados se concluye que tanto ADO como GAH tienen un efecto gluconeogénico en el hígado por diferentes mecanismos que no se potencian cuando se mezclan.

El efecto de ADO parece estar en relación a la generación de OAA citoplásmico el cual se encuentra aumentado en su presencia (tabla 14), mientras que el efecto de GAH pudiera ser la inhibición de la glucólisis por aumento de PIR (tabla 14) generado por la enzima málica descarboxilante como respuesta a la inhibición de LMA (fig. 12). Cuando ADO y GAH se utilizan en conjunto, MAL entra a la mitocondria por efecto de ADO por lo que no se acumulará PIR, mientras que la inhibición de la lanzadera por GAH producirá que aspartato no salga y no se genere OAA citoplásmico hablando de un ciclo de ácidos tricarbóxicos muy activo. La falta de acúmulo de PIR y de generación de OAA citoplásmico serán los responsables de la no activación de la gluconeogénesis en presencia sinérgica de ADO y GAH.

3.3. DESEQUILIBRIO DE LAS DESHIDROGENASAS CITOPLASMICAS

3.3.1. Datos de la literatura

Estudiando las referencias clásicas sobre las determinaciones de los estados redox celulares se observó que había estudios concluyentes sobre como las deshidrogenasas NAD-

dependientes mitocondriales comparten la misma poza de NAD y NADH y que se encuentran en equilibrio químico in vivo²¹, pero que no existen los mismos estudios para las enzimas NAD-dependientes del citosol ni para las NADP-dependientes, sino que directamente se infiere que este equilibrio químico debe suceder en todos los sistemas redox intracelulares. En este trabajo hemos determinado dos sistemas NAD-dependientes citoplásmicos considerados en el equilibrio in vivo, los cuales no se comportan como lo reportado para los sistemas mitocondriales. Los resultados muestran que al obtener las relaciones NAD/NADH por medio de los sistemas de las deshidrogenasas de LAC y de GAP existen diferencias tan grandes bajo diferentes condiciones que sugieren que estas enzimas o no se encuentran en el equilibrio o se encuentran microcompartimentalizadas de tal forma que no comparten proporcionalmente las pozas de NAD o NADH.

Para fundamentar los resultados obtenidos en el laboratorio estudiamos diversas referencias en donde metabolitos relacionados con las deshidrogenasas NAD- y NADP-dependientes del citosol hepático fueron determinados⁷⁴⁻¹¹⁰, obtuvimos con ellos los potenciales redox y comparamos estos resultados con los nuestros. Demostramos con estas determinaciones de los potenciales redox, tanto de la literatura como nuestros, que en el citosol hepático existen condiciones bajo las cuales las deshidrogenasas NAD- y NADP-dependientes consideradas en equilibrio in vivo, se comportan como si estuvieran compartimentalizadas o bajo el efecto de algún tipo de regulación.

En el caso de los sistemas mitocondriales, Krebs²¹ demostrò que tanto la deshidrogenasa de BHB como la de glutamato, ambas enzimas mitocondriales hepáticas NAD-dependientes, compartían la misma poza de NAD y NADH y por ende la relación NAD/NADH mitocondrial puede ser determinada con cualquiera de los dos sistemas enzimáticos²¹. Es más, utilizando la ecuación 2 para cada una de las dos enzimas y haciendo una igualdad se obtiene:

$$K_c = \frac{K'(\text{BDH})}{K'(\text{GDH})} = \frac{[\text{ACETOACETATO}] \cdot [\text{GLUTAMATO}]}{[\text{3-OH BUTIRATO}] \cdot [\text{CETOGLUTARATO}] \cdot [\text{NH}_4^+]} \dots 3$$

siendo los valores de K_c de este sistema, estudiados por el Dr. Krebs no solo semejantes entre si sino que coinciden con el valor teórico obtenido con las constantes de equilibrio in vitro ($K_{\text{BDH}}/K_{\text{GDH}}$,²¹). Estos resultados, sugieren que ambas enzimas se encuentran en equilibrio químico in vivo y que comparten la misma poza de NAD y NADH. En comparación, no existe nada concluyente para el compartimento citoplásmico que permitiera fundamentar los

hallazgos experimentales. En la tabla 16 se encuentran los valores reportados de metabolitos obtenidos por análisis enzimático de extractos hepáticos ácidos de ratas tratadas en tres diferentes maneras: alimentación ad libitum, ayuno entre 24 y 48 hrs. y tratamiento con aloxán o suero anti-insulina para

	ALIMENTADAS AD LIBITUM	AYUNO ± DE 24 HRS	DIABETES ALOXAN	DIABETES ANTIINSULINA
LAC	1760	680	2300	1800
PIR	177	55	54	137
GAP	374	179	303	246
DAP	36	12	20	26
MAL	380	490	527	400
OAA	6	24	2	
BHB	144	1790	7730	
AAA	55	50	375	
GLU	2410	2610	960	
oCG	140	86	45	
NH ₄	470	560	660	
G6P	266	140	207	
FBH	19	20	33	
ICT	20	13		

Tabla 16: Promedio de los metabolitos reportados en la literatura con los que se pueden obtener los diferentes estados de oxidorreducción celular. Los valores están en nmol/g de peso húmedo. Las referencias son 33, 129-141. Las abreviaturas corresponden a la lista presentada en la hoja -vi-.

inducir diabetes^{21, 24-210}. En la tabla 17 se encuentran los valores de los potenciales redox obtenidos con la información de la tabla 16 y las constantes de equilibrio listadas en la tabla 11.

Analizando la tabla 17 se ve, como fue reportado previamente²¹, que las dos deshidrogenasas NAD-dependientes localizadas en la mitocondria (de BHB y GLU) dan valores muy semejantes en cada uno de los tratamientos, por lo que se deduce que se encuentran compartiendo la poza de NAD y NADH y en

	ALIMENTADAS AD LIBITUM	AYUNO ± DE 24 HRS	DIABETES ALOXAN	DIABETES ANTIINSULINA
<u>NAD/NADH CITOPLASMICO</u>				
LBH	906	729	212	686
GDH	735	512	504	806
MDH	678	2102	163	
<u>NAD/NADH MITOCONDRIAL</u>				
BQH	7.8	5.6	9.6	
GLUDH	7.3	4.7	10.8	
<u>NADP/NADPH</u>				
G6PDH	0.029	0.059	0.066	
MDDH	0.016	0.004	0.003	
ICDH	0.014	0.006		

Tabla 17: Valores de las relaciones NAD/NADH y NADP/NADPH a partir de los valores de metabolitos reportados en la literatura y que se encuentran resumidos en la tabla 20. Las abreviaturas se encuentran enlistadas en la página -xi-.

condiciones in vivo están en equilibrio, existiendo esto independientemente del tratamiento del animal²¹. Esto mismo esta reproducido con dos de las enzimas NADP-dependientes (málica descarboxilante e isocitrica) pero el tercer sistema NADP-dependiente (de glucosa-6-fosfato) da valores alejados de los encontrados con sus contrapartes, especialmente en los casos de ayuno y diabetes⁹⁴⁻¹¹⁰. El problema es aún mayor entre las deshidrogenasas NAD-dependientes del citosol⁹⁴⁻¹¹⁰: en todas las condiciones estudiadas hay una diferencia de por lo menos 30% entre las relaciones obtenidas por los dos sistemas característicamente citosólicos (de LAC y de GAP). Revisando el sistema bicompartamentalizado de la deshidrogenasa de malato NAD-dependiente, se ve que, en condiciones de alimentación, el valor es similar al de la deshidrogenasa de GAP, pero es el más modificado por ayuno y diabetes.

Si se manejan los datos reportados en la tabla 17 de la manera en que Krebs²¹ lo realizó para obtener la ecuación 3 y se obtienen las K_c de pares de deshidrogenasas dependientes de la misma coenzima se demuestra una vez más el problema de la falta de reproducción de los valores de los potenciales redox en el citosol. En la tabla 18 se encuentran los resultados a este respecto. Es interesante hacer notar que en los pares de deshidrogenasas en que si se encuentran valores semejantes de los potenciales, no solamente sus K_c son iguales sino que coinciden dentro del error experimental con los valores teóricos de K_c (usando los valores reportados de las constantes de equilibrio in

vitro). En los dos casos en los que los valores de los potenciales no concuerdan, los valores de K_c no siguieron una misma tendencia. El caso más interesante es el relacionado con la deshidrogenasa de lactato y α -glicerol fosfato (LDH/GDH en la tabla 18), donde el valor teórico coincide con los grupos de alimentación ad libitum y ayuno, mientras que los valores obtenidos para los dos grupos de diabetes están fuera del rango. Esto sugiere que en las condiciones cercanas a lo fisiológico, estas dos deshidrogenasas se encuentran en equilibrio. Sin embargo, condiciones patológicas como es la diabetes, modifican este equilibrio. En la comparación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa contra la deshidrogenasa descarboxilante de malato

	VALOR TEORICO	ALIMENTADAS AD LIBITUM	AYUNO DE 24 HRS	DIABETES
LDH/GDH	0.847	0.811	0.702	2.377/1.174
LDH/MDH	4.76	0.75	2.88	0.77
GDH/MDH	5.62	0.92	4.10	0.32
BDH/GLUDH	7.9	7.3	6.6	8.4
MDDH/ICDH	0.037	0.041	0.025	
MDDH/G6PDH	14.33	8.51	0.78	0.64

Tabla 18: K_c 's de pares de deshidrogenasas que se consideran se encuentran en equilibrio químico in vivo y que comparan la misma poza de dinucleótidos (NAD o NADP) obtenidos a partir de los resultados reportados en las tablas 20 y 21. El valor teórico fue obtenido utilizando las constantes de equilibrio in vitro reportadas en la literatura y resumidas en la tabla 8. La columna de diabetes corresponde en general al tratamiento con aloxán ya que solamente se pudo obtener la K_c del par LDH/GDH para el tratamiento con suero anti-insulina (ver valores en la tabla). El significado de las abreviaturas empleadas se encuentra en la página -xi-.

(MDDH/G6PDH en la tabla 1B), los valores experimentales son completamente diferentes del obtenido por sus constantes de equilibrio; mientras que los valores obtenidos comparando la deshidrogenasa descarboxilante de malato con la de isocitrato (MDDH/ICDH en la tabla 1B) son similares entre si y con el valor teórico. Esto quiere decir que, mientras que las deshidrogenasas de malato e isocitrato se encuentran en equilibrio y comparten las pozas de NADP y NADPH, la deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato se encuentra independiente de las anteriores, pese a que se ha considerado que esta última existe en equilibrio químico in vivo. Estos resultados sugieren que el equilibrio entre deshidrogenasas puede modificarse por condiciones externas y que existe un grado de control o compartimentalización sobre algunas de estas enzimas en condiciones normales.

Aunque los resultados para la relaciones NAD/NADH y NADP/NADPH obtenidos por medio de estos sistemas no son del todo generalizables, algunos resultados y conclusiones serán válidos siempre y cuando se hable de relación NAD/NADH de los diferentes sistemas de deshidrogenasas más que hablar de relaciones de compartimentos celulares específicos. Es decir se deberá hablar de la relación NAD/NADH del sistema de la deshidrogenasa de LAC o de GAP. Esto no lleva solo a un consideración escolástica únicamente sino a la comprensión más a fondo del control metabólico por los potenciales redox. Volveremos a este punto después de discutir nuestros resultados a este respecto.

3.3.2. Estudios sobre el desequilibrio de las deshidrogenasas citoplásmicas

Como se mencionò anteriormente, encontramos resultados que apuntan hacia un no-equilibrio para la captaciòn de equivalentes reductores entre diversas deshidrogenasas en el citoplasma hepàtico corroborado por datos en la literatura (inciso 3.3.1) y que ADO y etanol afectan este no-equilibrio entre las deshidrogenasas de LAC y GAP. Esto nos pareciò de importancia capital para entender la regulaciòn metabòlica por los sistemas redox celulares. Para estudiar esto tratamos a los animales de experimentaciòn con ayuno ùnicamente o con administraciòn intragàstrica de glucosa o etanol y administraciòn intraperitoneal de soluciòn salina o ADO, sacrificando a los animales a las 4 u 8 horas del tratamiento, obteniendo muestras de hìgado determinàndoles LAC, PIR, GAP, y DAP como se detalla en la tabla 8. Los resultados se encuentran en la tabla 19 en donde tambièn se encuentran los valores de las relaciones NAD/NADH para cada uno de los sistemas y el valor de K_c correspondiente.

Como se puede ver en la tabla 19, el valor teòrico de K_c (obtenido a partir de las constantes de equilibrio de las dos deshidrogenasas [1.17]) concuerda con el grupo de ayuno (1.01). La presencia de glucosa aumenta la K_c casi al doble con o sin tratamiento con adenosina. Esto lo hace manteniendo los valores de la relaciòn NAD/NADH obtenidos por medio de la deshidrogenasa

de lactato y aumentando el valor de esta relación obtenida por medio de la deshidrogenasa de α -glicerol fosfato.

La presencia de etanol, a las cuatro horas, produce la ya esperada disminución de los valores de la relación NAD/NADH, bajando el valor de K_c ligeramente lo que habla de una favorecida captación de NADH por el sistema de GAP. El tratamiento con etanol y ADO produce, a las cuatro horas, una disminución de ambas relaciones NAD/NADH en comparación a los controles, pero

	LAC	PIR	NAD/NADH _{LAC}	GAP	DAP	NAD/NADH _{DAP}	K_c
TEORICO							1.17
AYUHO	379.3	17.6	418.0	305.9	14.3	361.1	1.01
GLC ₄	684.7	36.6	481.6	206.3	20.1	749.5	1.82
GLC+ADO ₄	1399.6	60.3	388.1	374.7	26.8	550.2	1.66
ETH ₄	299.8	5.70	171.3	526.1	7.40	108.2	0.74
ETH+ADO ₄	371.9	3.70	89.6	574.4	13.5	180.8	2.36
ETH ₈	551.8	6.30	102.9	753.7	15.2	155.1	1.77
ETH+ADO ₈	284.8	6.30	199.3	655.9	12.6	147.8	0.87
ETH+GAH ₄	1917.8	16.2	76.10	1594.6	13.1	63.2	0.97
ETH+GAH+ADO ₄	1760.0	13.7	70.10	1489.6	17.3	89.3	1.49

Tabla 19: Valores de LAC, PIR, GAP y DAP en diversas condiciones estudiadas en el laboratorio. GLC, glucosa; ADO, adenosina; ETH, etanol; GAH, γ -hidrazida de ácido glutámico. Los subíndices corresponden a la duración del tratamiento (4 y 8 hrs). Estos datos fueron utilizados para determinar los valores de las relaciones NAD/NADH citoplásmicas a partir de dos sistemas de deshidrogenasas que se consideran en equilibrio in vivo: la deshidrogenasa de lactato y la de α -glicerol fosfato. También se reporta la K_c obtenida con este par de deshidrogenasas. La correspondencia de las abreviaturas se encuentra en la hoja -xi-.

cuando se compara con el grupo de etanol solo a las cuatro horas, la relación $NAD/NADH_{LDH}$ disminuyó mientras que la relación $NAD/NADH_{GAPDH}$ aumentó, con lo que encontramos la K_c más alta en todo el grupo experimental. Este valor de K_c alto habla de una captación de equivalentes reductores muy favorecida por la deshidrogenasa de lactato debido a la presencia de adenosina.

Lo más llamativo de los cambios sucede a las 8 horas en donde el etanol aumenta la K_c , mientras que el valor de K_c con etanol más ADD a este tiempo, es normal. Esto sugiere que ADD tiene otro efecto a nivel de sistemas redox: favorece la temprana captación de equivalentes reductores citosólicos por el sistema de la deshidrogenasa de lactato cuando el hígado se encuentra intoxicado por etanol, lo cual conlleva también un regreso temprano de la K_c a valores normales aunque los valores de las relaciones $NAD/NADH$ estén todavía bajas con respecto a los controles.

Esto último podría estar en relación al efecto que tiene adenosina para disminuir la síntesis de TAG en hígados intoxicados con etanol, favorecida por la captación preferencial de equivalentes reductores por el sistema de la deshidrogenasa de lactato. La presencia de GAPH a las 8 horas aumenta los niveles de NADH en el citosol constatado por relaciones $NAD/NADH$ muy bajas, pero permite que ADD muestre nuevamente el efecto de desequilibrio de deshidrogenasas visto a las cuatro horas.

3.4. METABOLISMO DE LIPIDOS Y ESTADO REDOX

Es esperado que la degradación de lípidos este afectada por la relación NAD/NADH ya que estas coenzimas están directamente involucradas en estos procesos¹¹. Tanto la oxidación de ácidos grasos como la oxidación del glicerol de los TAG involucran una reacción NAD-dependiente. No es tan obvio pensar que también la síntesis de lípidos este afectada de igual manera: mientras que la generación de glicerol si involucra procesos NAD-dependientes, la síntesis de novo de ácidos grasos es NADP-dependiente (aunque no hay que descartar que la elongación de los mismos es NAD-dependiente¹²). Aun así, con estos principios básicos de exclusión para la síntesis de lípidos en relación a los niveles de NAD y NADH, Hernandez-Muñoz et al¹³ encontraron que los niveles de TAG hepáticos tienen una correlación lineal con los valores de la relación NAD/NADH (ver fig. 15).

Debido a que nuestros sistemas producían cambios más drásticos tanto en los valores de TAG y potenciales redox, decidimos estudiar su correlación con nuestros sistemas. En la figura 13 se muestra la correlación encontrada que incluye no nada más nuestros resultados sino que se encuentran también incluidos valores de la literatura¹³⁻¹⁵. Un análisis inicial mostró una buena correlación de tipo hiperbólico habiendo sido

discutida y reportada de esta manera¹¹³. Un análisis de la curva exhaustivo y con un sistema computacional más sofisticado mostró una relación de tipo exponencial con una correlación muy aceptable considerando que los resultados graficados provienen de diferentes laboratorios. Pero, cuál es el significado de dicha correlación a nivel bioquímico? Las explicaciones posibles son dos fundamentalmente: una disminución en la degradación de lípidos por el hígado debido a la ley de acción de masas que está favoreciendo el NADH o un aumento en la síntesis por translocación de equivalentes reductores del NAD al NADP.

La segunda explicación cuadra mejor con el análisis matemático de la gráfica y con nuestros resultados. Existen dos sistemas de oxidorreducción citoplásmica que se encuentran, en condiciones fisiológicas funcionando por separado, el sistema NAD-dependiente y el sistema NADP-dependiente²⁴. Las reacciones que generan equivalentes reductores para un sistema son

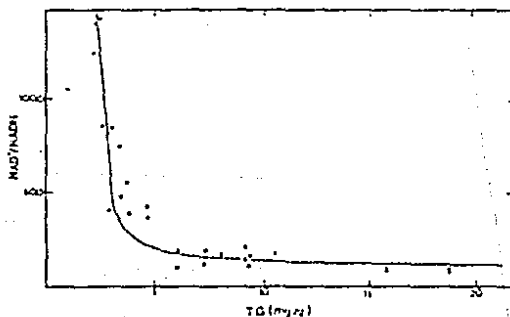
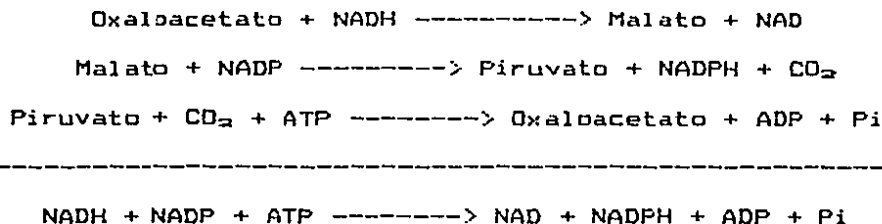


Figura 13: Curva exponencial de triglicéridos contra la relación NAD/NADH en diversas condiciones experimentales.

independientes de las que los generan para el otro en condiciones fisiológicas²⁴. Así vemos que el ciclo de Krebs, que es la vía fundamental de reducción de NAD, está completamente separada, hasta por una membrana, del ciclo de las pentosas, que es la vía de reducción de NADP. Esta generación independiente de equivalentes reductores de ambas vías empieza a fallar cuando la concentración de NADH aumenta sobre cierto límite. En ese momento, otros mecanismos que pueden translocar los equivalentes de un dinucleótido a otro entran en función. Así el ciclo de las pentosas se vuelve muy poco importante en relación a la enzima mállica funcionando en el ciclo de malato-piruvato²¹. Si se ponen las dos reacciones redox citoplásmicas más la carboxilación del piruvato que son parte de este ciclo y se suman, se tiene:



donde está perfectamente claro que la translocación del equivalente reductor de un sistema a otro depende de energía cuando el ciclo de malato-piruvato funciona activamente. Considerando que esta es la explicación, el sistema sugiere que la generación de NADPH por translocación del NADH sigue un comportamiento exponencial. Dicho sea de paso, esta dependencia de energía tan directa para llevar a cabo la translocación del equivalente

reductor también explica porque el ciclo de malato-piruvato es más lento que la lanzadera de malato-aspartato que no depende directamente de energía.

4. CONCLUSIONES

4.1 OBTENCION DE EXTRACTOS ACIDOS DE HIGADO

Como se mencionò en el inciso sobre metodología, en esta tesis demostramos que la obtención de muestras por homogenización deproteinizadora directa con ácido perclórico, bajo estrictas condiciones estándar es el método más adecuado para obtener extractos ácidos de hígado contraponiéndose a la metodología clásica de las pinzas de congelamiento rápido.

4.2. ENSAYO MULTIENZIMATICO

A lo largo del trabajo en el laboratorio se diseñò un sistema multienzimático para la determinación de cetoácidos (PIR, DAP, DAA y AAA). Este sistema multienzimático facilita la obtención de resultados con menores requerimientos de tiempo, muestra y manejo de la misma. Se concluye que es posible generar otros sistemas multienzimáticos para otros metabolitos siguiendo los lineamientos generales mencionados para el aquí descrito.

4.3. EFECTO DE GAH

En esta tesis queda demostrado que GAH produce un efecto dual a nivel de la lanzadera de malato-aspartato en el hígado. El efecto depende de la dosis: activación con dosis bajas e inhibición con dosis altas. Utilizando GAH para inhibir la lanzadera, fue posible estudiar como esta inhibición afecta diversas vías metabólicas. La principal vía afectada fue la lipogénesis. Estudiando los niveles de TAG se encontró que la inhibición de la lanzadera produce un aumento en la síntesis de los mismos.

4.4. EFECTO DE ADENOSINA

En esta tesis, se encontró que ADO tiene dos efectos sobre los estados redox celulares: uno favorece la entrada de MAL hacia la mitocondria; el otro desequilibra la captación de equivalentes reductores por dos de las deshidrogenasas citoplásmicas. El primer efecto parece estar en relación a un aumento de nucleótidos de adenina que activan a la cadena respiratoria con la favorecida entrada de NADH a la misma y el subsecuente estímulo sobre el transporte de MAL a la mitocondria (lanzadera de malato-aspartato).

4.5. EFECTO DE NAD/NADH CITOSOLICO SOBRE LOS LIPIDOS

Con los resultados obtenidos de GAH y ADO en hígados tratados con y sin etanol se encontró una relación muy importante entre los valores de la relación NAD/NADH y los niveles de TAG hepáticos. Esta relación de tipo exponencial (fig. 16) muestra como los estados redox afectan al metabolismo hepático y lo regulan. La explicación a este fenómeno está en relación a la interacción que existe entre los cocientes de NAD/NADH y NADP/NADPH citoplásmicos al actuar dos deshidrogenasas citoplásmicas sobre una misma molécula (MAL) siendo dependientes de diferente dinucleótido.

Considerando lo dicho por Krebs acerca de la posibilidad de que una misma enzima que no tiene especificidad por un dinucleótido o el otro produzca un equilibrio entre las pozas de estos⁴⁵, concluimos que nuestros resultados muestran el caso contrario: dos deshidrogenasas que no comparten el dinucleótido sino el sustrato (MAL deshidrogenasa NAD-dependiente y MAL deshidrogenasa descarboxilante NADP-dependiente) están produciendo que en ciertas condiciones se equilibre el valor de los cocientes. Estas condiciones donde se equilibra el valor de los cocientes tienen en común una elevación del valor de MAL y una elevación de triacilglicéridos.

4.6. CICLO DE CITRATO PIRUVATO

En esta tesis se demuestra la importante participación del ciclo de citrato-piruvato en la regulación del hígado especialmente en lo que a metabolismo de lípidos se refiere. Dicha demostración se llevó a cabo en condiciones tales que la lanzadera de malato-aspartato se vuelve ineficiente produciendo una alteración tal en el metabolismo hepático que genera una cantidad desmedida de TAG.

4.7. DESEQUILIBRIO DE DESHIDROGENASAS CITOSOLICAS

Nuestros resultados muestran que lo demostrado por Krebs en la mitocondria respecto al equilibrio de deshidrogenasas para la utilización de equivalentes reductores²¹, no es completamente cierto en el citoplasma. Esta falta de equilibrio lleva al punto en el que es difícil determinar los potenciales redox citoplásmicos sin caer en algún error conceptual.

Los resultados con etanol y ADO demuestran que no solo es una consideración sin importancia ya que al parecer parte del efecto lipotrópico y hepatoprotector de ADO depende de un temprano desequilibrio de las dos deshidrogenasas citosólicas más importantes (LAC y GAP).

4.8. EFECTO DIRECTO DEL ETANOL SOBRE LIPOGENESIS HEPATICA

Los resultados en esta tesis, que representan varias maneras de atacar el mismo problema sugieren que el acúmulo de TAG en el hígado por una ingesta desmedida, de etanol es un efecto directo sobre el metabolismo hepático y no una alteración en la movilización de grasas.

4.9. TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES COMO REGULADORES

A lo largo de esta tesis se ha demostrado como diversas vias metabólicas se encuentran afectadas por los flujos de metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna. Es bien sabido que existen vias bicompartimentalizadas como son la gluconeogénesis y la ureogénesis que podrán ser reguladas directamente por los flujos transmembrana³⁰⁻³¹. Aquí demostramos que otras vias localizadas en un solo compartimiento también se encuentran afectadas por los flujos transmembrana. El caso más estudiado en esta tesis fue la síntesis de TAG en hígado que depende del funcionamiento de la lanzadera de malato-aspartato y del ciclo de malato-piruvato. La pregunta siguiente es: Cuáles son los sistemas reguladores de dichos flujos? Esta pregunta se puede responder en base a nuestros resultados que sugieren que la presencia de translocadores para algunos metabolitos y no otros, la unidireccionalidad de algunos translocadores, la generación de

ciclos para movilizar metabolitos que no poseen translocadores (DAA, NADH, acetil-CoA), los requerimientos energéticos de dichos ciclos y muy especialmente el efecto de los estados redox sobre ellos, son los principales reguladores de estos flujos transmembrana y que a su vez afectan a la gran mayoría de las vías incluidas en el metabolismo intermediario.

5. BIBLIOGRAFIA

1. French, S.J. [1941] en in Torch and Crucible, The Life and Death of Antoine Lavoisier. Princeton, USA.
2. Mckee, D. [1935] en Antoine Lavoisier, The father of modern Chemistry. London, UK.
3. Lavoisier A. [1777] Rêflexions sur le phlogistique.
4. Dubos, R.J. [1950] en Louis Pasteur; Free lance of Science Boston, USA.
5. Vallery-Radot, R. [1900] en La vie de Pasteur. Paris, Francia.
6. Atkinson, D.E. [1977] en Cellular Energy Metabolismo and its Regulation. Academic Press. New York; London.
7. Klingenberg, M., & Bucher, T. [1960] Annu. Rev. Biochem. 29,669.
8. Krebs, H.A. [1981] Reminiscences and Reflexions. Oxford University Press. London, UK.

9. Krebs, H.A. [1976] en The Urea Cycle [Grisiola, S., Baguena, R., & Mayor, F. eds.] John Wiley & Sons. New York, USA.
10. Krebs, H.A., & Hansleit, K. [1932] Z. Physiol. Chem. 210,33.
11. Linford, J.H. [1966] An Introduction to Energetics. Butterworths. London UK.
12. Tinoco, I., Sauere, K., & Wang, J.C. [1978] Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences. Prentice Hall International. New Jersey, USA.
13. Wyatt, P.A.H. [1967] Energy and Entropy in Chemistry. Macmillan. London, UK.
14. Banks, B.E.C. & Vernon, C.A. [1970] J. Theor. Biol. 29,301.
15. Chance, B., & Williams, G.R. [1956] Adv. Enzymol. 17,65
16. Chance, B., & Estabrook, R.W, [1965] Control of Energy Metabolism. Academic Press. New York, USA.
17. Newsholme, E.A., & Leech, A.R. [1983] en Biochemistry for the Medical Sciences. John Wiley & Sons Ltd. London, UK.
18. Lipmann, F. [1941] Adv. in Enzymol. 1,99
19. Nicholls, D.G. [1982] Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory. Academic Press. London, UK.
20. González-Halpen, D., & Gomez Lojero, C., [1982] Boletín de Educación Bioquímica 1,4.
21. Krebs, H.A. [1967] Natl. Cancer Ins. Monog. 27,331.
22. Mc. Garry, J.D., & Foster, D.W. [1980] Annu. Rev. Biochem. 49,395
23. Bañawy, A.A.B. [1978] Clinics in Endocrinol. Metabol. 7, 247.

24. Thurman, R.G. [1977] Alcohol and Aldehyde Metabolising Systems. Academic Press. New York, USA.
25. Grunnet, N., Quistorff, B., and Thieden, H.I.D. [1973] Eur. J. Biochem., 42, 51.
26. Krebs, H.A. [1973] Symp. Soc. Expt. Biol. 27,299.
27. Exton, J.H. [1972] Metabolism 21,945. ,
28. Dalziel, K. [1980] FEBS Lettr. 117, K45
29. Dawson, A.G. [1979] Trends in Biochem. Sci. 4,171
30. Cederbaum, A.I., Dicker, E., and Rubin, E. [1977] Arch. Biochem. Biophys. 183,638
31. Aoki, T.T., Finley, R.J., & Cahell, G.F. [1978] Biochem. Soc. Symp. 43,17.
32. Harris, D.A. [1982] Biochemical Education 10,50.
33. Berry, M.N., & Friend, D.S. [1969] J. Cell. Biol. 43,506.
34. Lieber, C.S. [1977] en Metabolic aspects of alcoholism (Lieber, C.S., ed) pp 1-30 University Park Press, Baltimore.
35. Lieber, C.S., and DeCarli, L.M. [1977] en Metabolic aspects of alcoholism (Lieber, C.S., ed) pp. 31-79. University Park Press, Baltimore.
36. Truitt, E.B., and Duritz, G. [1966] en Biochemical factors in Alcoholism. (Maickel, R.P, ed.) p. 61. Pergamon Press, New York.
37. Kricka, L.J., & Clark, P.M.S. [1979] Biochemistry of Alcohol and Alcoholism. Ellis Horwood, Ltd. Chichester, UK.
38. Lieber, C.S., and Davidson, C.S. [1962] Am. J. Med. 33,319.

39. Veech, R.L., Guynn, R., and Veloso, D. [1972] Biochem. J. 127, 387.
40. Grunnet, N., Quistorff, B., and Thieden, H.I.D. [1973] Eur. J. Biochem., 42, 51.
41. Chappell, J.B. [1968] Br. Med. Bull. 24, 150.
42. Tapia, et al [1962] Biochem. Pharmacol. 11, 976.
43. Hernandez-Muñoz, R., Santamaría, A., García-Sainz, J.A., Piña, E., and Chagoya de Sánchez, V. [1978] Arch. Biochem. Biophys. 190, 155.
44. García-Sainz, A., Hernandez-Muñoz, R., Glender, W., Piña, E., and Chagoya de Sánchez, V. [1980] Biochem. Pharmacol 29, 1709.
45. García-Sainz, A., Hernández-Muñoz, R., Santamaría, A., Piña, E., & Chagoya de Sánchez, V. [1979] Biochem. Pharmacol. 28, 1409.
46. Czok, R., and Lamprecht, W. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol III, pp. 1446-1451, 2nd Ed., Academic Press, New York.
47. Michal, G., and Beutler, H.O. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol III, pp. 1314-1319, 2nd Ed., Academic Press, New York.
48. Wahlefeld, A.W. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol III, pp. 1604-1608, 2nd Ed., Academic Press, New York.
49. Mellanby, J., and Williamson, D.H. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol IV, pp. 1840-1843, 2nd Ed., Academic Press, New York.

50. Eranko, O. [1954] Acta Anat. (Basel) 22, 331.
51. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., and Bucher, Th. [1959] Biochem. Z. 332, 18.
52. Wollenberg, A., Restau, O., and Schoffa, G. [1960] Pflugers. Arch. ges. Physiol. 270, 339.
53. Hess, B., and Brand, K. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed) Vol I, pp 396-409, 2nd Ed., Academic Press, New York.
54. Smith, F.J. [1973] Clin. Chem. 19, 1077.
55. Bergmeyer, H.U. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol I, pp. 103-121, 2nd Ed., Academic Press, New York.
56. Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Grassl, M., Michal, G. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol I, pp. 308-317, 2nd Ed., Academic Press, New York.
57. Gutman, I., and Wahlefield, A.W. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol III, pp. 1464-1468, 2nd Ed., Academic Press, New York.
58. Gutman, I., and Wahlefield, A.W. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol III, pp. 1585-1589, 2nd Ed., Academic Press, New York.
59. Michal, G., and Lang, G. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol III, pp. 1415-1418, 2nd Ed., Academic Press, New York.
60. Williamson, D.H., and Mellanby, J. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol IV, pp. 1836-1839, 2nd Ed., Academic Press, New York.

61. Lamprecht, W., and Trautschold, I. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol IV, pp. 2101-2110, 2nd Ed., Academic Press, New York.
62. Jaworek, D., Gruber, W., Bergmeyer, H.U. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol IV, pp. 2127-2131, 2nd Ed., Academic Press, New York.
63. Bernt, E., Gutman, I. [1974] en Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol III, pp. 1499-1505, 2nd Ed., Academic Press, New York.
64. Lowry, D.H., and Passonneau, J. V. [1972] A Flexible System of Enzymatic Analysis pp. 120-128, Academic Press, New York.
65. Mayer, S.E., Stull, J.T., and Wastilla, W.B. [1974] en Methods in Enzymology (Hardman, J.G., and O'Mally, B.W., eds.) Vol 38, pp 3-9, Academic Press, New York.
66. Bucher, Th., Krejcar, K., Russmann, W., Schitzer, H., and Wesserman, R. [1964] en Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry (Chance, B., Eisenhardt, R.H., Gibson, B.H. and Ktonber-Hom, K., eds.) pp. 255-260, Academic Press, New York.
67. Knoche, J., and Hartmann, F. [1961] Biochem. Z. 334, 269.
68. Willand, G. [1968] Adv. in Metabolic Disorders 3, 1.
69. Thorn, W., and Jacobs, G. [1962] Biochem. Z. 335, 440.
70. Start, C., adn Newsholme, E.A. [1968] Biochem. J. 107, 411.
71. Rawat, A.K. [1968] Europ. J. Biochem. 6, 585.
72. Williamson, D.H., Lund, P., and Krebs, H.A. [1967] Biochem. J. 103, 514.

73. Kalkhoff, R.K., Hornbrook, K.R., Burch, H.B., and Kipnis, D.M. [1966] Diabetes 15, 451.
74. Zakim, D.A., Pardine, R.S., Herman, R.H., and Sauberlich, H.E. [1967] Biophys. Biochem. Acta. 242, 144.
75. Dale, R.A. [1965] J. Physiol. 181, 701.
76. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., Reim, M., and Hubrer, J. [1961] Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 163.
77. Berry, M.N., Williamson, D.H., and Wilson, M.B. [1964] Biochem. J. 94, 17C.
78. Soling, H.D., Kattermann, R., Schmidt, H., and Knerr, P. [1965] Biophys. Biochem. Acta. 115, 1.
79. Kerr, S.E., and Ghantus, M. [1937] J. Biol. Chem. 117, 217.
80. McLaughlin, A.C., Takeda, H., and Chance, B. [1979] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5445.
81. Jue, T., Arias-Mendoza, F., Gonnella, N., Shulman, G., & Shulman R.G. [1985] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5246.
82. Chance, B. [comunicación personal]
83. Crabtree, B., & Newsholme, E.A. [1972] Biochem. J. 126, 49.
84. Crabtree, B., & Newsholme, E.A. [1978] Eur. J. Biochem. 89, 19.
85. Trebs, H.A., & Veech, R.L. [1969] Adv. Enzyme Reg. 7, 397.
86. Jones, R.S. [1952] J. Biol. Chem 198, 313.
87. Williamson, R.D. [1953] J. Biol. Chem. 203, 595.
88. Williamson, R.D. [1955] J. Biol. Chem. 216, 67.
89. Lomschke et al [1974] Life Sci. 15, 1327.

90. Elko, E.E., Wooles, W.R., and Di Luizio, N.R. [1961] Am. J. Physiol. 201, 293
91. Sullivan, A.C., and Triscari, J. [1977] Am. J. Clin. Nutr. 30, 767
92. Szillat, D., & Bukowieki, L.J. [1983] Am. J. Physiol 245 [Endocrinol Metab. 8], E555.
93. Green, R.D. [1980] Life Sci. 26, 399.
94. Felts, J.M., & Berry, M.N. [1971] Biochem. Biophys. Acta 231, 1.
95. Henderson, V.F., Brox, L., Zumbor, G., Hunting, D., & Lomax, C.A. [1977] Biochem. Pharmacol. 26, 1967.
96. Williamson, D.H., Lund, P., and Krebs, H.A. [1967] Biochem. J. 103, 514.
97. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., and Bücher, T. [1959] Biochem. Z. 332, 18.
98. Start, C., and Newsholme, E.A. [1968] Biochem. J. 107, 411.
99. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., Reim, M., and Hübner, H.J. [1961] Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 163.
100. Kalkhoff, R.K., Hornbrook, K.R., Burch, H.B., and Kipnis, D.M. [1966] Diabetes 15, 451.
101. Hohorst, H.J., Arese, P., Bartels, H., Stratmann, D., and Tlake, H. [1965] Ann. N.Y. Acad. Sci. 119, 974.
102. Zakim, D.A., Pardini, R.S., Herman, R.H., and Sauberlich, H.E. [1967] Biochem. Biophys. Acta 114, 242.
103. Hornbrook, K.R., Burch, H.B., and Lowry, O.H. [1965] Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 206.

104. Sacktor, B., Wilson, J.E., and Tiekert, C.G. [1966] J. Biol. Chem. 241, 5071.
105. Hems, D.A., and Brosnan, J.T. [1970] Biochem. J. 1220, 105.
106. Rawat, A.K. [1968] Europ. J. Biochem. 6, 585.
107. Dale, R.A. [1965] J. Physiol. 181, 701.
108. Henley, K.S. [1968] J. Lab. Clin. Med. 71, 183.
109. Williamson, D.H., Veloso, D., Ellington, E.V., and Krebs, H.A. [1969] Biochem. J. 114, 575.
110. Burch, H.B., Max, P., Chyu, K., and Lowry, O.H. [1969] Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 619.
111. Greville, J.E., & Tubbs, P.K. [1968] Essays in Biochem. 4, 155.
112. Gurr, M.I., & James, A.T. [1971] Lipid Biochemistry. Chapman and Hall Ltd. London, UK.
113. Pifia-Garza, E., Garcia-Sainz, A., Chagoya de Sanchez, V., and Arias-Mendoza F. [1983] Gaceta Med. Mex. 119, 1.

A N E X D S

Etanol: catabolismo y efectos metabólicos

I. INTRODUCCION

ENRIQUE PIÑA-GARZA *

Después del agua, la molécula que tal vez cuente con mayor atractivo para el hombre sea la del etanol. Ambas moléculas comparten algunas propiedades físicas y químicas, pero sin lugar a dudas el atractivo original del etanol reside en la respuesta temprana que provoca en el sistema nervioso central humano cuando es ingerido en exceso. La respuesta y sus consecuencias han estrechado los la-

zos del hombre con el etanol desde tiempo inmemorial. No deja de ser interesante que en la naturaleza sólo dos especies manifiestan tanto interés por el etanol: el *Homo sapiens* y el *Saccharomyces cerevisiae*.

Por todos lados hay evidencia del interés humano por el etanol. Tres ejemplos: durante el año 1981 cada número mensual del *Index Medicus* enlistó cerca de 200 artículos en relación con el etanol; el órgano informativo de la Universidad, la Gaceta UNAM que aparece dos veces por semana, publicó artículos sobre el etanol en cuatro números diferentes entre noviembre de 1981 y marzo de 1982; y este es el segundo simposio sobre etanol durante el presente año de labores de la Academia Nacional de Medicina.

De las múltiples interfases hombre-etanol, en esta ocasión se hablará de su catabolismo y de los efectos metabólicos del mismo. Para enfatizar la



HEMEROB LIOTECA
"VALENTIN GONZ IARIAS"
Facultad de Medicina
U. N. A. M.

Recibido: 6 de julio de 1982.

Aceptado: 13 de octubre de 1982.

Presentado en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el 17 de marzo de 1982.

* Académico numerario, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

importancia del catabolismo del etanol, baste comparar la cantidad de moles ingeridos en 24 horas como nutrimentos (cuadro 1) con los moles de

Cuadro 1. Ingestión diaria de algunos tipos de nutrimentos, calculada en moles.

Nutrimento	Gramos	Peso molecular promedio	Moles
H ₂ O	2 000	18	110
Carbohidratos	250	180	1.4
Grasas	100	275	0.35
Proteínas	75	100 000	0.000 75*
Cl ⁻	3.5	35.5	0.1
Na ⁺	2.3	23	0.1
K ⁺	2.3	39	0.06
Niacina	0.015	121	0.000 1
Tiamina	0.001 5	302	0.000 005

* Calculado como aminoácidos se obtiene un valor aproximado de 0.75 moles.

Cuadro 2. Moles aproximados de etanol contenidos en algunas bebidas.*

Bebida	% de etanol	"Unidad de bebida"	Moles
Pulque	3	Litro	0.6
Cerveza	6	Botella	0.35
Vino	12	Vaso	0.4
Vino	12	Botella	1.6
Tequila	40	Coctel	0.35
Cognac	40	"	0.35
Whisky	40	"	0.35
Ron	40	"	0.35
Vodka	40	"	0.35

* Calculado con base en el porcentaje de etanol en volumen/volumen. Se tomó 46 como peso molecular del etanol y una densidad de 0.8.

etanol contenidos en algunas bebidas alcohólicas (cuadro 2). Como se ve, es muy semejante el número de moles de lípidos, ingeridos en 24 horas con una dieta promedio, al número de moles de etanol contenidos en una cerveza. También son semejantes los moles de carbohidratos, calculados como glucosa, en una dieta diaria promedio y los moles de etanol en una botella de vino de mesa.

Como puede colegirse en estos cálculos, la ingestión de un coctel o de un aperitivo representa la carga de un gran número de moles de etanol. El organismo humano habrá de contar con eficientes mecanismos para degradarlo y para resolver los problemas osmóticos a que dan lugar estos proce-

dos. Por otro lado los datos así presentados estimulan el interés por la investigación, al manifestarse nuestra ignorancia en los casos donde la ingestión crónica de elevadas cantidades de etanol, durante varios años, no desemboca en graves cuadros patológicos. Revisemos la degradación y las consecuencias metabólicas de la degradación de la molécula, que por derecho propio el hombre ha hecho, vulga la expresión, la más humana.

II. OXIDACIÓN DEL ETANOL Y SU REPERCUSIÓN METABÓLICA

ADOLFO GARCÍA-SAINZ *

Características del etanol como metabolito

El etanol es un componente habitual de la dieta humana. Aunque es producido endógenamente por la flora intestinal, esto ocurre en cantidades mínimas y es el aporte exógeno el importante. El etanol tiene un valor calórico alto, de aproximadamente 3 kilojoules (7.5 kilocalorías) por gramo, superior al de los carbohidratos y discretamente inferior al de los lípidos. Dado este alto valor calórico, el metabolismo del etanol es responsable de hasta 10 por ciento de las calorías de la dieta humana normal (evidentemente este valor se encuentra matizado por diversos factores culturales y varía de población a población) y puede representar hasta 30-35 por ciento del aporte energético del alcohólico. Es importante hacer notar aquí que el aporte energético proporcionado por el etanol es de "calorías vacías", es decir, que no se acompañan de elementos plásticos esenciales de la dieta. Esto, aunado a los trastornos gastrointestinales que produce el consumo de alcohol, conduce a la desnutrición observada frecuentemente en el alcohólico.

El alcohol es fundamentalmente utilizado por el hígado, quizá en una proporción superior a 90 por ciento. Esto hace que el etanol se convierta en una avalancha energética para el hígado, el cual se ve obligado a manejarla con profundas modificaciones en su metabolismo general. Por otro lado el etanol debe ser metabolizado; sólo 2 a 10 por ciento se elimina como tal por vía renal o pulmonar. No existen en el organismo mecanismos de almacenamiento ni retroalimentación en su oxidación. Esto hace que sea la actividad de las enzimas que lo manejan y la disponibilidad

* Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

ENRIQUE PIÑA-GARZA Y COL.

Cuadro 3. Características del metabolismo del etanol.

- a) Alto valor calórico
- b) Escasa eliminación renal o pulmonar
- c) Falta de un mecanismo de almacenamiento
- d) No hay mecanismo de retroalimentación para su oxidación
- e) Oxidación fundamentalmente hepática

de sus cofactores los que regulen su oxidación. Estos conceptos se encuentran resumidos en el cuadro 3.

Sistema de oxidación

La oxidación del etanol, inicialmente a acetaldehído y posteriormente a acetato, se realiza en dos compartimentos celulares: el citoplasma y la mitocondria. En el citoplasma puede ocurrir en tres sistemas principales: a) el sistema de la alcohol deshidrogenasa; b) el sistema de oxidación microsomal; c) por medio de la catalasa.

El camino de la deshidrogenasa alcohólica, el principal, se encarga de metabolizar prácticamente la totalidad del etanol cuando las concentraciones en sangre son moderadas y más de 70 por ciento cuando son altas. Esta enzima no es específica para el etanol, ya que oxida una serie de alcoholes e incluso está involucrada en la deshidrogenación de esteroides y en la α -oxidación de los ácidos grasos. La enzima utiliza como coenzima al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) generándose acetaldehído y dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH). Esta generación y acumulación de equivalentes reductores en forma de NADH es responsable de muchas de las alteraciones metabólicas que el etanol ocasiona.

El sistema de oxidación microsomal ha sido estudiado por bastante tiempo. La primera observación que se hizo sobre este sistema es de tipo morfológico: se observó que en ratas mantenidas con una dieta que contenía etanol ocurría proliferación del sistema microsomal. Estudios bioquímicos posteriores han permitido la caracterización y purificación de los componentes de este sistema, el cual exhibe una K_m relativamente alta y V_{max} baja. Por tal motivo su contribución a la oxidación del etanol es relativamente pobre cuando los niveles séricos de etanol son bajos, si bien su actividad puede contribuir hasta en 50 por ciento a la oxidación del etanol cuando su concentración sanguínea es alta. Este sistema tiene la ventaja metabólica de que no genera equivalentes reductores, sino que los utiliza en forma de NADPH y genera la coenzima oxidada, acetaldehído y agua. Su importancia en la oxidación del etanol se estima en general como pequeña, pero es necesario tener en cuenta dos consideraciones importantes. Por una parte, al ser inducido por el consumo del tó-

sico, la contribución del sistema aumenta; por otra, no tiene una especificidad grande por el etanol y participa en la oxidación de muchos productos xenobióticos, por lo que la oxidación de ciertos medicamentos es más rápida de lo normal (por inducción del sistema) o más lenta (por competencia con el etanol durante la intoxicación etílica aguda).

La catalasa también es capaz de oxidar el etanol. La participación de esta enzima en el metabolismo del etanol es considerada como casi nula. El principal factor limitante es la producción de peróxido de hidrógeno, que en condiciones basales es extraordinariamente baja.

El acetaldehído generado por cualquiera de estas tres formas de oxidación viaja a la mitocondria, donde una acetaldehído deshidrogenasa lo convierte en acetato con generación de NADH. Esta acetaldehído deshidrogenasa no ha podido ser caracterizada con rigor; se han descrito varias enzimas capaces de actuar sobre el acetaldehído con diferentes constantes cinéticas. Por otro lado se desconoce la especificidad absoluta de la enzima, por lo que algunos autores prefieren para ella el nombre de aldehído deshidrogenasa. El NADH formado es utilizado en la mitocondria para la generación de energía o la reducción de metabolitos. El acetato puede ser activado a acetil-CoA y utilizado ya sea en hígado o en otros tejidos (cuadro 4).

Cuadro 4. Sistemas de oxidación del etanol.

alcohol deshidrogenasa	
a) Etanol	Acetaldehído
NAD	NADH H
Sistema de oxidación microsomal	
b) Etanol	Acetaldehído
NADPH	NADP
H	
+	+
O ₂	2 H ₂ O
Catalasa	
c) Etanol	Acetaldehído
H ₂ O ₂	2 H ₂ O
Aldehído deshidrogenasa	
Acetaldehído	Acetato
NAD	NADH H

Compartimentalización de los equivalentes reductores y mecanismos de translocación

Como puede apreciarse en la figura 1, lo que ocasiona el metabolismo del etanol en general es una avalancha de equivalentes reductores en forma de

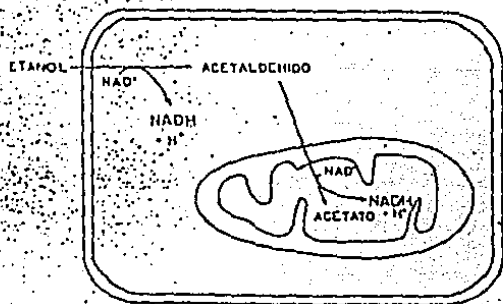


Fig. 1.

NADH en los compartimentos citoplásmico y mitocondrial. La cantidad de NAD⁺ intracelular es extraordinariamente pequeña, por lo que para que proceda la oxidación del etanol y la del acetaldehído el NADH formado debe oxidarse para generar NAD⁺ y permitir que este acepte los equivalentes reductores. Existe una amplia evidencia en el sentido de que el factor limitante en la oxidación del etanol es la reoxidación de los equivalentes reductores.

Los equivalentes reductores generados en la mitocondria pueden ser utilizados por la cadena respiratoria para la obtención de energía. Generalmente la producción de equivalentes reductores por la aldeshido deshidrogenasa supera a la capacidad de utilización y así se produce un desbalance en el estado redox de la mitocondria; por otro lado la oxidación de los equivalentes reductores procedentes del acetaldehído se oxidan en lugar de los que generan otros metabolitos, por ejemplo la oxidación de los ácidos grasos; produciéndose entonces un freno metabólico por acumulación de NADH.

La oxidación del NADH generado por la alcohol deshidrogenasa es más compleja. Por un lado puede reoxidarse donando sus equivalentes reductores al piruvato, dando origen a acidois láctica; por otro lado el NADH no puede penetrar a la membrana interna de la mitocondria, por lo cual los equivalentes reductores son donados a un metabolito que los transporta. Existen sistemas transportadores de equivalentes reductores llamados lanzaderas o *shuttles*; el de α -glicerosofato (fig. 2) y el malato-aspartato (fig. 3). El primer sistema es el termodinámicamente más favorecido, pero no parece tener funcionalidad, ya que la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial es muy baja y se convierte en limitante; el segundo ciclo es bidireccional, es decir transloca equivalentes reductores en ambos sentidos y parece ser el principal en el hepatocito.

Estado redox

Desde los estudios iniciales de Hohorst, posterior-

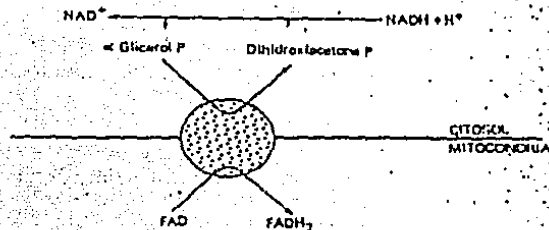


Fig. 2.

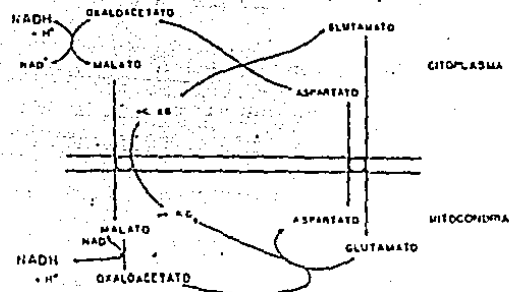


Fig. 3. α KG indica α -cetoglutarato.

mente ampliados por H. A. Krebs y sus colaboradores, sabemos que las deshidrogenasas citoplásmicas generalmente no son enzimas reguladoras y que por lo tanto se encuentran sujetas únicamente a su equilibrio químico en las condiciones termodinámicas existentes en la célula (temperatura, fuerza iónica, pH y otras). Por otro lado, la cantidad de NAD⁺ existente es muy pequeña y la fracción "activa", es decir, la que participa en el metabolismo, no es posible medirla químicamente. Sin embargo, conociendo la constante de equilibrio aparente de las deshidrogenasas y sabiendo que existe una sola poza citoplásmica de NAD⁺, es posible calcular la relación entre las formas oxidada y reducida de dicha coenzima, lo que llamamos estado redox. En el compartimento mitocondrial sucede algo similar. Es pertinente hacer notar aquí que hay deshidrogenasas reguladoras, como la piruvato deshidrogenasa o la α -cetoglutarato deshidrogenasa, que se encuentran en una situación de no equilibrio, y cuyas enzimas que se encuentran en equilibrio, y cuya constante aparente se conoce son, para el compartimento citoplásmico, la deshidrogenasa láctica y la deshidrogenasa de α -glicerosofato; para el compartimento mitocondrial, la β -OH butirato deshidrogenasa y la

glutamato deshidrogenasa. Por lo tanto las parejas de oxidorreducción correspondientes (lactato/piruvato, α -glicerofosfato/dihidroxiacetona fosfato, β -OH butirato/acetoacetato, α -cetoglutarato-amoniaco/glutamato) son las que se determinan con mayor frecuencia en los estudios metabólicos.

Efectos del etanol sobre el estado redox

Como es de esperarse, la administración de etanol produce marcados efectos sobre el estado redox en ambos compartimentos celulares. En el compartimento citoplásmico la relación $NAD^+/NADH$ es de aproximadamente 900 y bajo la acción del metabolismo del etanol baja a 175, por acumulación de la forma reducida. En el compartimento mitocondrial la relación $NAD^+/NADH$ es de aproximadamente 20 y desciende, bajo la acción del etanol hasta 8 (cuadro 5).

Repercusión sobre el metabolismo en general

Es claro que al aumentar la proporción de $NADH$ en el citoplasma, los metabolitos oxidados sean convertidos en su pareja reducida. Así el piruvato formado tenderá a convertirse en lactato, dando lugar a una acidosis láctica en el alcohólico. Esta acidosis láctica disminuye la solubilidad de los uratos y dificulta su eliminación renal. Ello explica la frecuente precipitación de una crisis gotosa después de la ingestión de alcohol. Por otro lado, si bien durante los períodos de ayuno la glucemia es mantenida por gluconeogénesis hepática y una parte importante de los esqueletos de carbono de los aminoácidos entran a la gluconeogénesis a nivel del piruvato, cuando el estado redox desvía al piruvato hacia lactato estos esqueletos de carbono no son utilizados para la formación de glucosa. Este fenómeno pudiera explicar la hipoglucemia que se observa en algunos alcohólicos que por largo tiempo permanecen sin ingerir otra cosa que el alcohol.

El metabolismo lipídico se ve fuertemente afectado por el metabolismo del alcohol. Bien es sabido que el consumo de alcohol conduce a un acúmulo de triacilglicéridos en el hígado (hígado graso o hepatosteatosis). Este acúmulo parece deberse a dos factores conjugados. Por un lado se produce vasodilatación del lecho portal, lo cual aumenta la captación hepática de ácidos grasos provenientes de los depósitos. Estos ácidos grasos no pueden ser oxidados, ya que el estado redox mitocondrial frena la β -oxidación y por lo tanto son esterificados con el elevado nivel de α -glicerofosfato que existe por el estado redox citoplásmico (cuadro 5). Por otro lado este hígado graso contribuye a un aumento en la producción y liberación de triacilglicéridos a la circulación, ocasionando una hipertriacilglicerolemia. La β -oxidación se encuentra disminuida por la acetil coenzima A, generada por este proceso y por la piruvato deshidrogenasa, no es utilizada eficientemente por el ciclo de Krebs, ya que

Cuadro 5. Efecto del etanol sobre el estado redox.

	Control	Etanol
Alfa glicerofosfato (nmol/g)	218	1163
Dihidroxiacetona fosfato (nmol/g)	25	26
$NAD^+/NADH$ (citoplásmico)	869	175
3-hidroxibutirato (μ mol/g)	291	671
Acetoacetato (μ mol/g)	240	223
$NAD^+/NADH$ (mitocondrial)	17	8

el estado reducido de la mitocondria se constituye en un freno. La acetil coenzima A es entonces canalizada hacia la formación de cuerpos cetónicos. La cetoacidosis que se genera se suma a la acidosis láctica.

Daño hepático

En el párrafo previo mencioné la génesis de hígado graso por el consumo de etanol. Esta es una alteración aguda del consumo de etanol. Sin embargo, existen alteraciones crónicas de gravedad como son la hepatitis alcohólica y la cirrosis. Mucho se ha discutido la interrelación de estos procesos; las evidencias actuales señalan la generación secuencial de hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis. Sin embargo, los nexos entre ambos procesos y los factores que hacen que un hígado graso evolucione hacia la normalidad o hacia la hepatitis y la cirrosis son desconocidos. También mucho se ha discutido acerca de si el etanol es el causante de todos estos problemas o si es la desnutrición que acompaña al alcoholismo, o bien si son los otros componentes de las bebidas alcohólicas. Estudios realizados por el grupo de Lieber en primates han mostrado la generación de hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis por la administración de etanol en la dieta. Esta dieta fue por otro lado suficiente tanto en cantidad como en calidad y bien aceptada por los primates. Estos datos son la demostración experimental de que el etanol *per se* es un hepatotóxico. En México la incidencia de cirrosis hepática es relativamente alta (cuadro 6) y es necesario realizar más investigación tanto básica como clínica sobre estos problemas.

Cuadro 6. Muertes debidas a cirrosis hepática por 100 000 habitantes mayores de 25 años.

Francia	57.2
Portugal	55.1
Italia	52.1
República Federal Alemana	39.6
España	38.3
Estados Unidos	28.6
México	25.2
Japón	21.8
Bélgica	20.5
Canadá	19.6
Polonia	17.2
Noruega	7.6
Holanda	7.4
Inglaterra	5.7

Fuentes: World Health Statistics Annual (1972). Compendio de Estadísticas Vitales SSA (1975).

REFERENCIAS

1. Lieber, C. S.: *Metabolism of ethanol*. En: *Metabolic aspects of alcoholism*, Lieber, C. S. (Ed.) Baltimore, University Park Press, 1977, p. 1.
2. Lieber, C. S. y DeCarli, L. M.: *Metabolic effects of alcohol on the liver*. En *Op. cit.* en 1, p. 31.
3. Hernández-Muñoz, R.; Santamaría, A.; García-Sainz, J. A.; Piña, E. y Chagoya de Sánchez, V.: *On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine*. Arch. Biochem. Biophys. 190:155, 1978.
4. García-Sainz, J. A.; Hernández-Muñoz, R.; Glender, W.; Piña, E. y Chagoya de Sánchez, V.: *Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism*. Biochem. Pharmacol. 29:1709, 1980.

III. EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ETANOL

VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ *

Una manifestación clínica de la intoxicación aguda con etanol es la aparición del hígado grasoso o hepatoesteatosis, que se caracteriza por ser una acumulación reversible de triacilglicéridos (TAG). Este aumento en el contenido de grasa hepática refleja una alteración del equilibrio dinámico que mantiene la concentración de los lípidos hepáticos dentro de los valores normales. Los prin-

Investigación realizada con apoyo parcial del CONACyT (PNCB 1344).

* Departamento de Bioenergética, Centro de Investigación en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

cipales factores que mantienen este equilibrio dinámico son: a) biosíntesis de lípidos; b) consumo como fuente de energía; c) transporte de lípidos de los depósitos al hígado y de movilización de lípidos del hígado a los depósitos.

Así se observa que en condiciones de ayuno (fig. 4), la lipasa hormonasensible del tejido adiposo estimula la lipólisis de los TAG de los depósitos, liberándose glicerol y ácidos grasos. El primero pasa a la circulación y de allí al hígado y a los tejidos extrahepáticos para su utilización. De los ácidos grasos, producto de la lipólisis, una parte se utiliza en la reesterificación en el mismo tejido y otra es transportada por la sangre, para ser utilizada en otros tejidos, para lo cual se requiere que los ácidos grasos sean activados, para formar el acil-derivado de la coenzima A (CoA). Este último es oxidado en la mitocondria generando energía, dióxido de carbono y agua; o bien es esterificado al α -glicerofosfato para la síntesis de TAG y fosfolípidos; este último proceso es particularmente activo en el hígado. Los TAG hepáticos son posteriormente transportados a los depósitos por medio de las lipoproteínas de muy baja densidad, las pre- β . El equilibrio dinámico de estos eventos metabólicos mantendrá los niveles normales de lípidos en el hígado y en la sangre y se ajustará a condiciones fisiológicas, como es el periodo de ingesta normal.

Una situación que puede considerarse anormal es la presencia, en un momento dado, de una dosis masiva de etanol. En la misma figura 4 se señalan con líneas gruesas los cambios inducidos por el etanol en esta dinámica. Los primeros informes acerca de la hiperlipidemia después de la ingestión de bebidas alcohólicas datan de aproximadamente 50 años y el hecho ha sido ampliamente comprobado por numerosos investigadores. El aumento de lípidos del plasma se refleja principalmente en TAG y en un patrón anormal de lipoproteínas séricas, al haber un incremento de las lipoproteínas de muy baja densidad o pre- β . Al analizar el efecto del etanol en el metabolismo del tejido adiposo y del hígado se enumeran las modificaciones de la dinámica de lípidos que resultan en la aparición del hígado grasoso y de la hiperlipidemia.

En el tejido adiposo el etanol inhibe la transformación de glucosa en glicerol de los glicéridos, ejerciendo una acción antilipogénica.¹ Por otra parte, su acción sobre la lipólisis ha sido muy controvertida; varios investigadores señalan un aumento importante de este proceso, que se manifiesta por incremento de glicerol y de ácidos grasos libres en la sangre;² pero también existen comunicaciones en el sentido de que no ocurre este cambio después de la administración de etanol.⁴ Es importante recordar al respecto que los niveles de ácidos grasos circulantes son una resultante del aporte debido a la lipólisis del tejido adiposo y de la captación por los otros tejidos, principalmente el hepático. Más demostrativos en relación a este punto son los experimentos de Scheig e Is-selbacher,² quienes demuestran que la composición de los ácidos grasos que constituyen los TAG acumulados en el hígado por acción del etanol

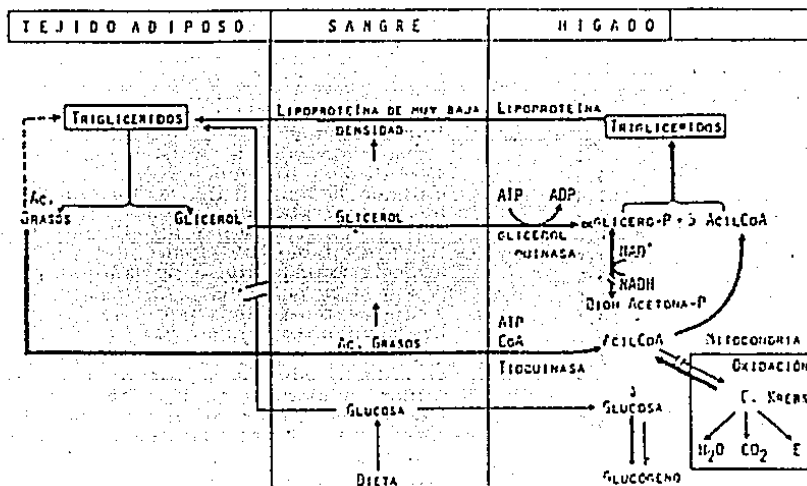


Fig. 4. Dinámica de lípidos entre hígado, sangre y tejido adiposo. Las líneas oscuras representan los pasos estimulados por la presencia del etanol y las líneas con intercepto, los pasos metabólicos disminuidos por la presencia del tóxico. α -glicero-P = alfa glicerofosfato; DIOH Acetona-P = dihidroxiacetona fosfato; CoA = coenzima A.

semeja la de los TAG del tejido adiposo, lo que se explica por aumento en la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo hacia el hepatocito.³ Posiblemente este efecto del etanol esté mediado por la acción lipolítica de las catecolaminas, ya que se ha comunicado aumento en la excreción urinaria de tales compuestos después de la ingestión del etanol.^{6,7} Importante al respecto es el hecho de que la suprarrenalectomía o la administración de bloqueadores adrenérgicos impiden la formación del hígado graso inducido por el etanol.^{8,9}

El hígado es el sitio que metaboliza cerca de 90 por ciento del etanol. En intoxicaciones agudas la vía principal de su catabolismo es al través de la deshidrogenasa alcohólica, de localización citoplásmica, lo cual requiere para su actividad del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺). La actividad enzimática es alta y se acepta que el factor limitante de la oxidación del etanol es la disponibilidad de coenzima oxidada NAD⁺. El metabolismo del etanol modifica marcadamente el estado redox citoplásmico de la pareja de dinucleótidos de nicotinamida y adenina,^{10,11} inclinándolo hacia el lado reducido. Una consecuencia del cambio es la disminución en la disponibilidad de NAD⁺ que abate la transformación del α -glicerofosfato a dihidroxiacetona fosfato. Si se considera además que hay una mayor fluencia de glicerol del tejido adiposo, habrá un aumento importante en la poza hepática del α -glicerofosfato. En la mitocondria puede ocurrir una síntesis *seu*, etc., ya que el acetaldehído, formado por la deshidrogenasa alcohólica en el citoplasma, es oxidado en su mayor parte por la deshidrogenasa del acetaldehído mitocondrial, que también es dependiente de NAD⁺ y puede ocasionar disminución en la concentración de NAD⁺ necesario para la oxidación de los ácidos grasos.¹² La concentración de ácidos

grasos en el hígado debe estar muy elevada en presencia del etanol, ya que se observa mayor afluencia de tales ácidos grasos provenientes del tejido adiposo, inhibición utilizada para obtener energía debido a la presencia de etanol y aumento en su síntesis.¹² El incremento de sustratos, ácidos grasos y α -glicerofosfato producirá un aumento importante en la síntesis de TAG. Se ha descrito que el etanol aumenta la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado,¹³ a las cuales se asocian los triglicéridos para ser transportados a los depósitos. La inducción de estas proteínas es una respuesta al aumento de TAG ya señalado y la explicación de la hiperlipemia postetanolica en la que se encuentran aumentados los TAG plasmáticos y las lipoproteínas pre- β . Este aumento en movilización de TAG hepáticos no es suficiente para mantenerlos dentro de cifras normales, presentándose el acúmulo de estos compuestos y el hígado graso.

Es conveniente comentar algunos antecedentes que justifiquen el uso de la adenosina en los estudios del metabolismo del etanol y sus efectos. La adenosina es un nucleósido de adenina que existe normalmente en las células a muy bajas concentraciones, pues tiene un recambio metabólico muy rápido.¹⁴ Como resultado de las investigaciones realizadas en el laboratorio en relación a los efectos de la adenosina en el metabolismo intermedio, surgió la posibilidad que pudiera ser de

utilidad en el proceso de inducción del hígado graso por intoxicación aguda con etanol.

A continuación se enumeran los efectos bioquímicos de la adenosina en el metabolismo intermedio del hígado y del tejido adiposo que impulsaron a utilizarla en este modelo.

1. Aumento de 40 por ciento en la poza de trifosfato de adenosina (ATP) y nucleótidos de adenina y consecuente elevación de la carga energética en la célula hepática.¹⁵
2. Aumento de síntesis de glucógeno y de la actividad de la glucógeno sintetasa del hígado.^{16,17}
3. Aumento quintuple de la lipogénesis en el tejido adiposo del epidídimo.¹⁸
4. Acción antilipolítica de la adenosina *in vitro*.¹⁸
5. Inhibición de la activación y oxidación de los ácidos grasos en el hígado.¹⁹
6. Aumento del estado oxidado de la mitocondria de hígado.²⁰

Los cambios metabólicos que se obtienen por administración de adenosina son opuestos a los descritos para la intoxicación aguda con etanol y resulta muy interesante estudiar su correlación.

Experimental

Se utilizaron ratas macho de 170 a 210 g de peso, ayunadas por 16-20 horas; se les administró el etanol por sonda esófago-gástrica a la dosis de 5 g/kg de peso. Los animales controles recibieron una dosis isocalórica de glucosa por la misma vía. Inmediatamente después de la aplicación de la sonda los animales recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina (NaCl al 0.85%) o de adenosina (200 mg/kg peso). Los animales se sacrificaron a distintos tiempos después de la inyección. El detalle del método experimental y del material usado así como los resultados se publicaron con anterioridad.^{21,22}

Resultados

La administración de etanol produce un aumento de TAG hepáticos de casi cuatro veces en relación a los controles, a las ocho horas del tratamiento (Fig. 5). La administración simultánea de adenosina bloquea este efecto; las diferencias son estadísticamente significativas a las cuatro y ocho horas de tratamiento ($P < 0.005$ y $P < 0.01$ respectivamente). La adenosina *per se* casi no modifica el contenido hepático de TAG.

Se probó la posibilidad de que la adenosina no sólo evitara la formación del hígado graso inducido, sino que lo revierte una vez que ya estaba establecido. Los resultados del cuadro 7 señalan que la adenosina se administró seis horas después del etanol y los animales se sacrificaron dos horas más tarde. Se encontró que el acumulo de TAG se revierte significativamente después del

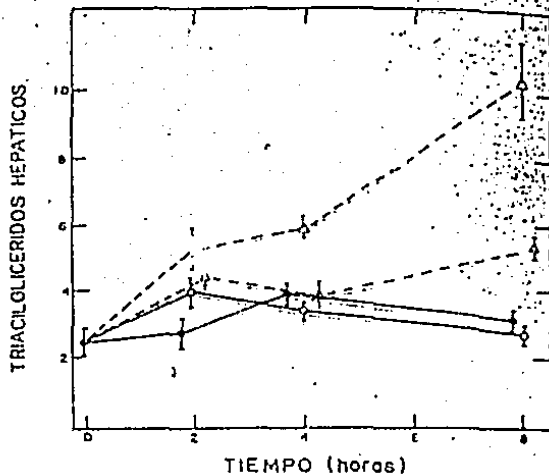


Fig. 5. Concentración de triacilglicéridos a distintos tiempos del tratamiento con etanol y/o adenosina. ○—○, glucosa + salina; ●—●, glucosa + adenosina; △—△, etanol + salina; ★—★, etanol + adenosina. La barra vertical representa el error estándar de un promedio de cinco animales.

Cuadro 7. Reversión parcial del hígado graso por etanol con adenosina.

Tratamiento*	Triacilglicéridos hepáticos (mg/g peso húmedo)
Glucosa + salina	3.09 ± 0.43 ^c (9)
Glucosa + adenosina	3.34 ± 0.79 (10)
Etanol + salina	12.85 ± 2.16 ^b
Etanol + adenosina	6.95 ± 1.11 ^a

* Etanol o glucosa se administraron 1 hora antes del sacrificio y adenosina o salina dos horas antes. Promedios ± error estándar de los animales, cuyo número se indica entre paréntesis.

^b $p < 0.001$ comparado con el grupo de glucosa + salina.

^c $p < 0.005$ comparado con el grupo de glucosa + salina.

^a $p < 0.05$ comparado con el grupo de etanol + salina.

amiento con adenosina. Considerando que la mayoría de los ácidos grasos acumulados en el hígado grasoso provienen del tejido adiposo y que este proceso se ve favorecido por la acción del etanol, aumentando la movilización de los ácidos grasos de los depósitos, se probó la posibilidad de que la adenosina, con base en su efecto antilipolítico, estuviera impidiendo esta acción del etanol. Los resultados se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 8. Efecto del etanol o glucosa y adenosina* o salina en los lípidos séricos.^a

	Ac. grasos libres (μ Eq/litro)	Triacilglicéridos (mg/100 ml)
Glucosa + salina	362 \pm 41 (5)	56.1 \pm 6.5 (4)
Glucosa + salina	444 \pm 26 (4)	59.8 \pm 3.7 (4)
Etanol + salina	369 \pm 20 (5)	101.3 \pm 12.8 ^b (6)
Etanol + adenosina	395 \pm 29 (6)	60.9 \pm 3.3 ^c (5)

* Las determinaciones se hicieron ocho horas después del tratamiento. Los valores representan promedios \pm error estándar del número de observaciones señaladas entre paréntesis.

^b p < 0.02 comparado con el grupo de glucosa + salina.

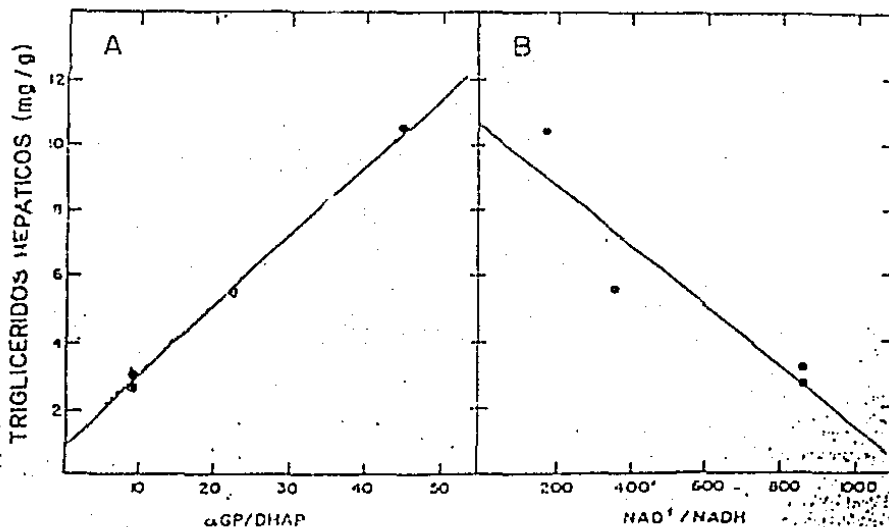
^c p < 0.02 comparado con el grupo de glucosa + salina.

en el que se puede ver que no hay cambio significativo en los niveles de ácidos grasos libres del plasma. Los resultados pueden no ser concluyentes, si se considera que el nivel de ácidos grasos plasmáticos va a depender de su liberación del tejido adiposo y de su utilización por los tejidos extrahepáticos, principalmente el hígado. En relación con este punto se ha descrito que el etanol aumenta el flujo sanguíneo en el hígado²⁴ y que ocasiona aumento en la captación de ácidos grasos por el hígado. Con todas estas consideraciones la acción del nucleósido sobre estos parámetros no es fácil de analizar y no se tiene una respuesta clara.

Una posible explicación de la acción de la adenosina, al normalizar los valores de TAG hepáticos después de administrar etanol, es que el nucleósido esté aumentando la movilización de los TAG hepáticos a los depósitos. Se cuantificaron los niveles plasmáticos de TAG, encontrándose el efecto ya descrito para el etanol; pero la adenosina no los aumenta, sino al contrario, los disminuye a sus valores normales, descartándose así esta posible participación de la adenosina.

Uno de los efectos más claros del etanol en el metabolismo hepático es la disminución del estado redox citoplásmico NAD⁺/NADH. Para valorar el efecto de la adenosina en este parámetro, se calculó la relación NAD⁺/NADH a partir de los sustratos oxidado y reducido de la deshidrogenasa

Fig. 6. Correlación entre el estado redox citoplásmico y la cantidad de triglicéridos en el hígado, ocho horas después del tratamiento. Las ecuaciones de regresión y los coeficientes de correlación son: A. y = 0.21 x + 0.94, r = 0.99; B. y = 0.009 x + 10.5, r = 0.91.



Cuadro 9. Efecto del etanol o glucosa y adenosina o salina en el estado redox del citoplasma del hepatocito.*

Tratamiento	GF* (nmol/g de peso húmedo)	DHAF** (nmol/g de peso húmedo)	NAD ⁺ / NADH
Ninguno	184 ± 29 (5)	35.0 ± 7.4 (5)	1456
Glucosa + salina	186 ± 14 (5)	38.6 ± 3.8 (5)	1599
Glucosa + adenosina	188 ± 26 (6)	41.5 ± 1.5 (6)	1694
Etanol + salina	664 ± 87 ^b (6)	33.7 ± 3.9 (6)	390
Etanol + adenosina	420 ± 38 ^{b,c} (5)	40.0 ± 4.8 (5)	733

* El tiempo de tratamiento fue de dos horas. Los resultados representan el promedio ± error estándar del número de observaciones (entre paréntesis).

^b p < 0.001 comparado con el grupo de glucosa + salina.

* p < 0.05 comparado con el grupo de etanol + salina.

* glicerofosfato. ** dihidroxiacetona fosfato.

del α -glicerofosfato, así como de su constante de equilibrio. Los resultados se presentan en el cuadro 9, y como se esperaba, la administración de etanol produce un aumento de casi tres veces en los niveles del sustrato reducido, α -glicerofosfato, y en presencia de adenosina se revierte parcialmente el aumento. Al calcular la relación NAD⁺/NADH, se ve que la adenosina sola o la carga de glucosa no afectan la relación NAD⁺/NADH citoplásmica, la cual disminuye de valor con el etanol. En el mismo cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos a las dos horas de tratamiento, los cuales fueron los mismos a otros tiempos estudiados.²¹ Los cambios del estado redox del par NAD⁺/NADH, o de la relación α -glicerofosfato/dihidroxiacetona fosfato, desempeñan un papel muy importante en el establecimiento del hígado grasoso inducido por etanol, como lo demuestra la correlación que se observa entre la cantidad de grasa neutra depositada en el hígado y los cambios de la relación NAD⁺/NADH del citoplasma, ocho horas después del tratamiento (fig. 6).

El efecto de la adenosina; inhibiendo la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y produciendo disminución en el nivel de los cuerpos cetónicos plasmáticos, se observa hasta en 77 por ciento en los animales tratados con glucosa y salina y en 54 por ciento en los tratados con etanol.²² En relación a este punto conviene señalar que la inhibición en la oxidación de los ácidos grasos producida por el etanol se acompaña de aumento en la síntesis de TAG, mientras que la observada con la adenosina es simultánea a una inhibición en la formación de TAG.

Es posible que la acción de la adenosina en algunos aspectos del metabolismo del etanol, como por ejemplo los cambios en estado redox del par NAD⁺/NADH citoplásmico, se explican a través de una disminución en la degradación del etanol. Se investigó este punto cuantificando los niveles de

etanol en sangre en los animales tratados con salina y con adenosina, distintos tiempos después del tratamiento. Se observó que la depuración de etanol es 20 por ciento mayor en los animales que fueron tratados con adenosina (fig. 7), además de que ocurre recuperación más rápida de la coordinación motora de estos animales.

Conclusiones

Los resultados permiten concluir que la adenosina es capaz de impedir el hígado grasoso inducido por la intoxicación aguda con etanol y de revertir parcialmente la hepatoesteatosis, una vez que ha quedado establecida por el tratamiento con el etanol.

La acción antilipolítica del nucleósido, mediada probablemente a través de la inhibición en la acción lipolítica de las catecolaminas,¹⁸ no se manifiesta claramente al ser medidos los niveles de los ácidos grasos libres en el plasma (cuadro 8). Sin embargo, es posible que tenga un papel muy importante en el efecto descrito, ya que dada la inhibición en la utilización de los ácidos grasos en el hígado por acción del nucleósido, y si la lipólisis aumentada por el etanol no estuviera disminuida por el nucleósido, habría un incremento muy importante en los ácidos grasos libres circulantes y sólo se observa un pequeño incremento (cuadro 8), sin significado estadístico.

La figura 6 muestra claramente la correlación entre el estado redox citoplásmico de la pareja NAD⁺/NADH y la acumulación de TAG en el hígado; por lo que el nucleósido, al aumentar la relación citoplásmica, está evitando la acumulación de grasa neutra en el hígado. Esto último puede ser el resultado de cuando menos dos efectos de la adenosina. Por un lado se observa que no hay acumulación del sustrato α -glicerofosfato,

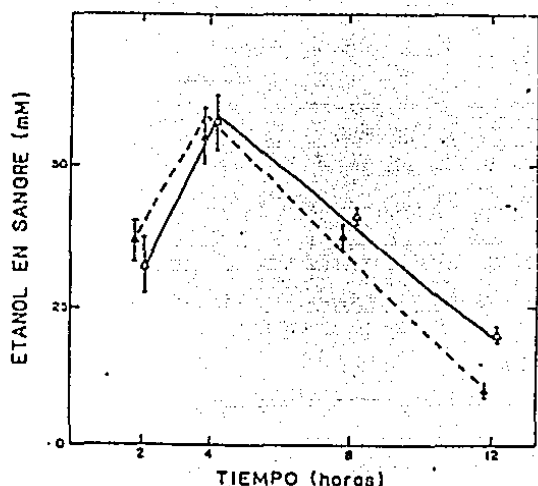


Fig. 7. Concentración de etanol en la sangre de ratos tratadas con salina o adenosina. Las barras verticales representan el error estándar del promedio de cuando menos cuatro animales. El coeficiente de correlación se calculó omitiendo el valor de dos horas. Δ — Δ , etanol + salina; $y = 4.7x + 77.3$, $r = 0.94$; \star — \star , etanol + adenosina; $y = .58x + 80.4$, $r = 0.95$.

ya que al disminuir el estado reducido del citoplasma se favorecerá la utilización del α -glicerofosfato por otros caminos metabólicos. Por otro lado, la inhibición en la activación de los ácidos grasos producida por la adenosina¹⁰ es fundamental para la posterior utilización de los ácidos grasos, por lo que así la adenosina está disminuyendo la concentración de los derivados acilados de la coenzima A, indispensables para la formación de TAG.

La hiperlipidemia normal en el grupo tratado con etanol y adenosina refleja que al no acumularse los TAG en el hígado, muy probablemente no existió el estímulo inductor para la síntesis aumentada de lipoproteínas de muy baja densidad.

Un aspecto muy interesante de los resultados es el hecho de que la adenosina, además de los efectos descritos, acelera la oxidación del etanol (fig. 4). Esto sugiere que en alguna forma se están utilizando más rápidamente los equivalentes reductores, generados en el citoplasma por acción de la deshidrogenasa alcoholica al actuar sobre el etanol; y en la mitocondria, por acción de la deshidrogenasa del acetilaldehído, al oxidar al propio acetilaldehído.

REFERENCIAS

1. Scheig, R.: Effects of ethanol on lipid metabolism in adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 248:48, 1971.

2. Scheig, R. y Isselbacher, K. J.: Pathogenesis of ethanol induced fatty liver. III. In vivo and in vitro effects of ethanol on hepatic fatty acid metabolism in rat. *J. Lipid Res.* 6:269, 1965.

3. Baraona, E.; Pitula, R. G. y Lieber, C. S.: Pathogenesis of postprandial hyperlipemia in rat fed ethanol-containing diets. *J. Clin. Invest.* 52:269, 1973.

4. Elko, E. E.; Woades, W. R. y Di Luino, N. R.: Alterations and mobilization of lipids in acute ethanol treated rats. *Am. J. Physiol.* 201:293, 1961.

5. Lieber, C. S.; Spritz, N. y DeCarli, I. M.: Role of dietary, adipose and endogenously synthesized fatty acids in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. *J. Clin. Invest.* 45:51, 1966.

6. Anton, A. H.: Ethanol and urinary catecholamines in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 6:462, 1965.

7. Perman, E. S.: The effect of ethyl alcohol on the secretion from the adrenal medulla in man. *Acta Physiol. Scand.* 41:241, 1958.

8. Malloev, S. y Bloch, J. L.: Role of hypophysis and adrenals in fatty infiltration of liver resulting from acute ethanol intoxication. *Am. J. Physiol.* 181:29, 1956.

9. Malloev, S.: Effect of adrenalectomy on ethanol and fat metabolism in the rat. *Am. J. Physiol.* 189:428, 1957.

10. Forsander, O. A.; Räsänen, N.; Salaspuro, M. y Mäenpää, P.: Influence of ethanol on the liver metabolism of fed and starved rats. *Biochem. J.* 91:259, 1965.

11. Forsander, O. A.; Mäenpää, P. H. y Salaspuro, M. P.: Influence of ethanol on the lactate/pyruvate and β -hydroxybutyrate/acetoacetate ratios in rat liver experiments. *Acta Chem. Scand.* 10:1770, 1955.

12. Lieber, C. S. y Schmid, R.: The effect of ethanol on fatty acid metabolism; stimulation of hepatic fatty acid synthesis in vitro. *J. Clin. Invest.* 40:394, 1961.

13. Scheig, R.: Ethanol, lipids, and adipose tissue metabolism. En: *Biochemistry and pharmacology of ethanol*. Majumdar, E. y Noble, E. P. (Eds.) Nueva York, Plenum Press, 1970, p. 603.

14. Lemley, M. H. y Lowy, B. A.: The formation of adenosine in rabbit liver and its possible role as a direct precursor of cytosolic adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 249:959, 1974.

15. Chagoya de Sánchez, V.; Brunner, A. y Pífa, E.: In vivo modification of the energy charge in the liver cell. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46:1441, 1972.

16. Chagoya de Sánchez, V. y Pífa, E.: Adenosine a gluconic and lipogenic compound. *FEBS Letters* 19:331, 1972.

17. Chagoya de Sánchez, V.; Brunner, A.; Sánchez, M. E.; López, C. y Pífa, E.: Utilization of adenosine as a tool in studies on the regulation of the liver glycogen biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 160:145, 1974.

18. Dole, V. P.: Insulin-like actions of ribonucleic acid, adenylic acid and adenosine. *J. Biol. Chem.* 237:2758, 1962.

19. Chagoya de Sánchez, V.; Alvarez, P.; Jiménez, B.; Vilalobos R. y Pífa, E.: Regulation of fatty acid oxidation by adenosine at the level of its extramitochondrial activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76:801, 1977.

20. Chagoya de Sánchez, V. y Pífa, E.: The redox state of NAD⁺/NADH systems in rat liver during in vivo inhibition of fatty acid oxidation by adenosine. *FEBS Letters* 37:321, 1977.

21. Hernández-Muñoz, R.; Santamaría, A.; García-Sainz, J. A.; Pífa, E. y Chagoya de Sánchez, V.: On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Arch. Biochem. Biophys.* 190:155, 1978.

22. García-Sainz, J. A.; Hernández-Muñoz, R.; Góndez, W.; Pífa, E. y Chagoya de Sánchez, V.: Effect of adenosine on ethanol induced modifications in liver metabolism in rats treated with allopurinol. Role of hepatic redox state and fatty acid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 29:1709, 1980.

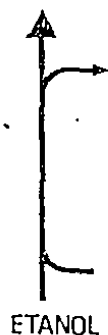
23. Maickel, R. P. y Yamada, K.: Dynamic biochemical processes involved in the production of fatty liver. En: *Advances in enzyme regulation*. Weber, G. (Eds.) Nueva York, Pergamon Press, 1970, p. 235.

24. Abrams, M. A. y Cooper, C.: Mechanism of increased hepatic uptake of unesterified fatty acid from serum of ethanol-treated rats. *Biochem. J.* 136:47, 1976.

IV. MODELOS EXPERIMENTALES DE HIGADO GRASOSO Y SU POSIBLE UTILIDAD A NIVEL CLINICO

FERNANDO ARIAS-MENDOZA *

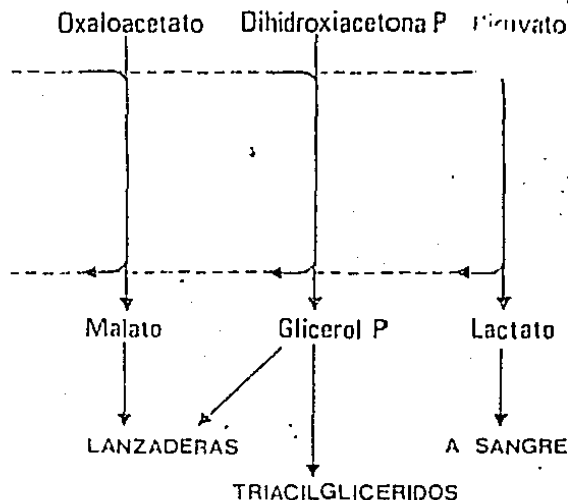
ACETALDEHIDO



$NADH + H^+$

NAD

Fig. 8. Vías de reoxidación del NADH citoplásmico generado en la primera reacción del catabolismo del etanol.



En estudios previos se han demostrado los cambios que a nivel hepático produce el etanol administrado en forma aguda.¹ Uno de los principales, es la elevación del contenido de triacilglicéridos (TAG) en el hepatocito,² aunado a aumento, en el citosol de dichas células, de la forma reducida de la coenzima dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH).³

También se ha comunicado que la velocidad de oxidación del etanol no depende únicamente de la deshidrogenasa que cataliza la reacción (deshidrogenasa alcohólica), sino de la disponibilidad de la misma coenzima en estado oxidado (NAD).⁴ Esto implica que el NADH deba reoxidarse, debido a que la poza de NAD⁺ es extraordinariamente pequeña.

La reoxidación del NADH es llevada a cabo principalmente por tres deshidrogenasas NAD⁺-dependientes (deshidrogenasa málica, deshidrogenasa de α -glicerofosfato y deshidrogenasa láctica), que se localizan en el citosol y para las que se ve favorecida la síntesis de sus productos reducidos, debido a disminución del valor de la relación NAD⁺/NADH (fig. 8).

Los productos antes mencionados son utilizados por la célula hepática en tres procesos metabólicos, que le permiten mantener un estado basal de oxidación del etanol: las lanzaderas (*shuttles*) mitocondriales de equivalentes reductores (utilizando malato y α -glicerofosfato) y la salida de lactato hacia el torrente circulatorio. Los dos últimos se ven involucrados en la fisiopatología de dos signos clínicos de la intoxicación etílica aguda: el hígado graso y la hiperlactacidemia.¹

El presente trabajo está enfocado hacia la producción de diversos grados de intoxicación etílica aguda en ratas, para determinar los cambios metabólicos producidos sobre los metabolitos dependientes de las deshidrogenasas involucradas en la reoxidación del NADH citosólico, correlacionándolos con los niveles de TAG hepáticos y con aquellos metabolitos que sean determinados en suero, que hablen finalmente, de un equilibrio en estos dos compartimientos del animal íntegro.

El objetivo es encontrar parámetros en el torrente circulatorio que reflejen el estado metabólico de la célula hepática en el hígado graso postetílico experimental y que puedan ser aplicados a condiciones clínicas de la misma índole, lo que permitiría obtener un enfoque más preciso sobre la relación que tiene el hígado graso con diversos padecimientos en los que ha sido postulado como antecedente obligado.

* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

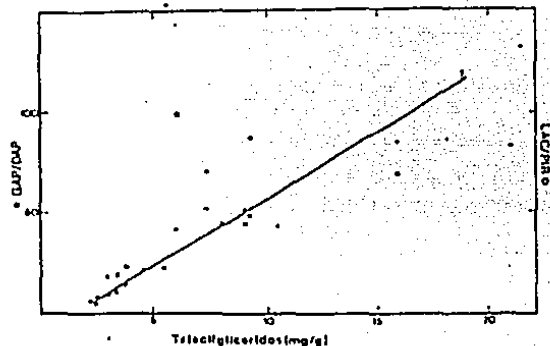


Fig. 9. Relación entre la concentración de triacilglicéridos hepáticos y las relaciones α -glicerofosfato/dihidroxiacetona fosfato (GAP/DAP \ast) y lactato/piruvato (LAC/PIR \circ). La curva teórica presentada es la regresión lineal con la relación GAP/DAP ($y = 6.4x - 6.4$; $r = 0.95$); Los puntos con la relación LAC/PIR no tienen correlación aceptable.

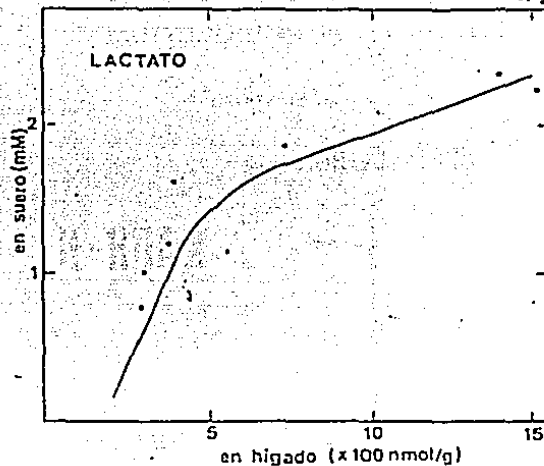


Fig. 11. Relación entre los valores hepáticos y séricos de lactato ($y = 31.0x^{0.41}$; $r = 0.87$).

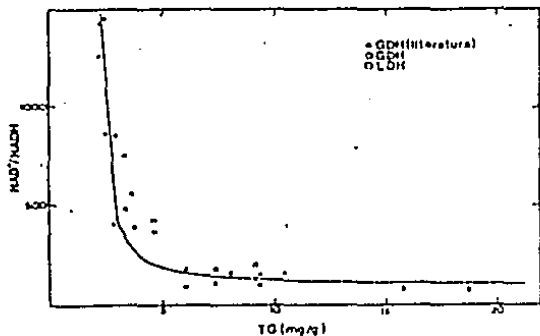


Fig. 10. Relación entre la concentración de triacilglicéridos hepáticos y los valores de la relación $NAD^+/NADH$ citosólico obtenida por el sistema de la deshidrogenasa de α -glicerofosfato (GDH \ast) o por el sistema de la deshidrogenasa láctica (LDH \square). También se incluyen los valores comunicados en la literatura (referencia \circ). La fórmula que representa la curva teórica es $y = 115.2x/(x-2.28)$ ($r = 0.98$).

La figura 9 muestra los promedios de las relaciones α -glicerofosfato/dihidroxiacetona fosfato y lactato/piruvato, obtenidos en las diversas condiciones experimentales, presentados contra los promedios de los valores de TAG en los mismos gru-

pos. Es de hacer notar que se mantiene una relación lineal entre la primera relación y los niveles de TAG, mientras que con la segunda se pierde esta relación. Considerando que ambas relaciones representan a dos sistemas enzimáticos que comparten las pozas de NAD^+ y $NADH$, pese a que no se encuentren en equilibrio, se realizaron las transformaciones pertinentes para obtener el llamado estado de oxidorreducción de las coenzimas, representados por el cociente $NAD^+/NADH$. Los resultados se presentan en la figura 10, mostrándose una gráfica de tipo hiperbólico con un coeficiente de correlación aceptable, en la que se incluyen todos los puntos experimentales y los publicados en la literatura.

En las figuras 11 y 12 se plantean los valores promedio de lactato y piruvato séricos contra los valores promedio de los mismos metabolitos en hígado. La gráfica exponencial de la figura 11 demuestra la necesidad de transporte activo a través de la membrana plasmática para la salida de lactato hacia el torrente circulatorio; mientras que lo indicado en la figura 12 es compatible con procesos de difusión simple para el transporte del piruvato.

Las dos gráficas anteriores muestran la posibilidad de conocer un valor teórico de lactato y piruvato hepáticos, a partir de los valores reales en el torrente circulatorio. Manejando los datos teóricos de los metabolitos en hígado, se puede inferir un valor aproximado de la relación $NAD^+/NADH$ citoplásmica; y a la vez, considerando la correlación de tipo hiperbólico entre esta relación y los niveles de TAG hepáticos, es posible determinar si las condiciones metabólicas hepáticas son las fisiológicas o si se ha presentado el cuadro de

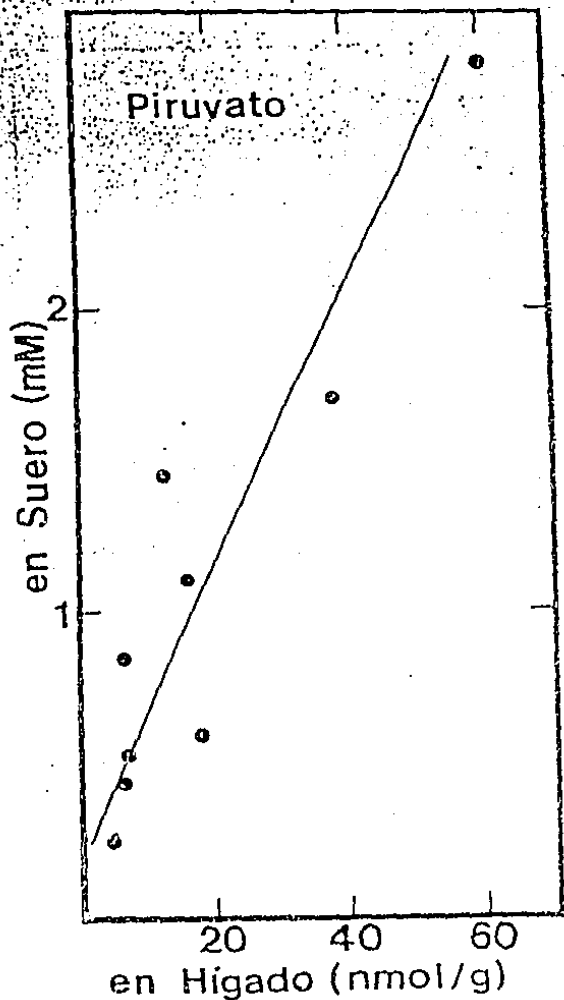


Fig. 12. Relación entre los valores hepáticos y séricos de piruvato ($y = 3.7 x + 44.4$; $r = 0.92$).

hígado graso. Cabe hacer notar en este punto, que la gráfica hiperbólica entre TAG y la relación $NAD^+/NADH$ puede ser considerada como la combinación de dos gráficas lineales. El brazo asintótico con el eje de las ordenadas representa los valores "fisiológicos" de ambos parámetros; mientras que el brazo asintótico con el eje de las abscisas representa los valores de "hígado graso" en nuestros sistemas. Con esto último, valores menores de 300 para la relación $NAD^+/NADH$, obtenidos por interferencia a partir de la concentración sérica de lactato y piruvato, están hablando de condiciones que favorecen dicho proceso en el hígado.

REFERENCIAS

1. Lieber, C. S.: *Metabolism of ethanol*. En: *Metabolic aspects of alcoholism*. Lieber, C. S. (Ed.) Baltimore, University Park Press, 1977, p. 1.
2. Lieber, C. S. y Schmid, R.: *The effect of ethanol on fatty acid metabolism: stimulation on hepatic fatty acid synthesis in vivo*. *J. Clin. Invest.* 40:391, 1961.
3. Hernández Muñoz, R.; Santamaría, A.; García-Saint, J. A.; Piña, E. y Chagoya de Sánchez, V.: *On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine*. *Arch. Biochem. Biophys.* 190:155, 1978.
4. Guderhaum, A. J.: *Characterization of shuttle mechanism for the transport of reducing equivalents in mitochondria*. *Arch. Biochem. Biophys.* 138:563, 1973.