

174  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE LA INGESTA CRÓNICA MODERADA  
DE ETANOL EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA  
A LO LARGO DE OCHO SEMANAS DE TRATAMIENTO

TESIS SOMETIDA A LA CONSIDERACION  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS PARA  
OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

HECTOR RIVEROS ROSAS.

MEXICO, D. F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## RESUMEN

Son numerosos los estudios efectuados para establecer los efectos metabólicos del consumo crónico severo de etanol, sin embargo son escasos los trabajos que caracterizan los efectos del consumo crónico moderado. Dado que en México entre 1/3 y 2/3 de la población bebe ligera o moderadamente, consideramos importante comenzar a caracterizar esta última forma de consumo. Los resultados obtenidos muestran que el consumo crónico moderado (dieta *ad libitum* con etanol al 10% (V/V) en el agua de beber) causa serios daños en la respiración mitocondrial, ya sea con sustratos de sitio I o II a partir de la sexta semana de ingesta, así como una fuerte inhibición de la citrulinogénesis, aún cuando la actividad de ATPasa no resultó tan fuertemente afectada y la actividad de succinato deshidrogenasa se observó aumentada durante las primeras semanas de ingesta. En conclusión, este trabajo señala que aún el consumo crónico moderado con el tiempo, provoca una severa disfunción en mitocondrias de hígado de rata, lo cual sugiere una revisión más cuidadosa de los trabajos que señalan efectos benéficos con el consumo moderado de etanol.

## INTRODUCCION

De todas las drogas conocidas, el etanol constituye sin lugar a dudas desde tiempos inmemoriales, la droga más comunmente ingerida por el hombre y su consumo esta legalmente aceptado por la mayoría de los gobiernos y religiones del mundo, a pesar de que es precisamente el etanol, la substancia enviciante más usada por el hombre (Zentella y Piña, 1987). Su empleo se encuentra tan generalizado que por ejemplo en Inglaterra, solo el 6% de la población adulta no consume alcohol (Denney y Johnson, 1984). En México 2/3 de la población consume alcohol de manera regular (Consejo Nacional Antialcohólico, 1985), por lo cual no debe extrañar que en México, la cirrosis alcohólica se encuentra entre las diez primeras causas de muerte en la población general, y en la población masculina de 25 a 44 años de edad, ocupa el primer lugar (op. cit.). En 1980 la mortalidad debida a cirrosis hepática fue de 22.9 por 100 mil habitantes para la población total, y constituye una de las tasas más altas en América (Consejo Nacional Antialcohólico, 1985; Velazco-Fernandez, 1986).

En principio, el etanol constituye un componente habitual de la dieta humana ya que es producido endógenamente por la flora intestinal, aunque en cantidades mínimas (aproximadamente 3 g/día) (Piña Garza et. al. 1983; Zentella y Piña, 1987), de tal manera que es el aporte exógeno el que es realmente importante. El etanol tiene un valor calórico alto, de aproximadamente 7,5 Kcal/g, superior al de los carbohidratos y discretamente inferior al de los lípidos. No obstante, es importante hacer notar que el aporte energético proporcionado por el etanol es del llamado "calorías vacías", ya que no aporta ningún elemento plástico esencial para la dieta (Piña Garza et. al., 1983), es decir, el esqueleto hidrocarbonado del etanol prácticamente no es aprovechado para la biosíntesis de otras moléculas que forman parte de la célula.

El etanol, una vez ingerido es absorbido sin alteraciones en

el estómago y el intestino delgado mediante difusión simple, y su presencia puede ser detectada en la sangre dentro de los cinco minutos posteriores a su ingestión difundiendo rápidamente a todo el resto del organismo (Escotto Velázquez, 1977; Victor y Adams, 1980). El etanol es metabolizado fundamentalmente por el hígado, quizá en una proporción superior al 90%; fracciones mínimas son metabolizadas por los riñones y músculo esquelético y el resto se elimina como tal por vía renal o pulmonar (2-10%) (Israel et. al., 1975; Lieber, 1977; Escotto Velázquez, 1977; Victor y Adams, 1980; Piña Garza et. al., 1983).

El etanol una vez dentro del cuerpo, produce una gran variedad de alteraciones, afectando a diversos aparatos y sistemas. Entre estas alteraciones podemos mencionar: una reducción en la absorción intestinal de nutrientes como glucosa, aminoácidos, calcio, cobre, hierro, manganeso, fósforo, folato, vitamina B<sub>12</sub> y B<sub>6</sub> (Victor y Adams, 1980; Rao y Larkin, 1985) así como un incremento en la excreción urinaria de amonio, fosfato y magnesio (Victor y Adams, 1987); la producción de gastritis, la cual puede desembocar en úlcera (op. cit.); pancreatitis (op. cit.); acumulación de triglicéridos y proteínas de exportación en hígado (Videla et. al., 1973; Baraona et. al., 1975), lo cual desemboca en hepatomegalia y formación de hígado graso (Iseri et. al., 1966; Lieber, 1977); y una forma de necrosis hepatocelular conocida como hepatitis alcohólica y finalmente cirrosis (op. cit.)<sup>\*1</sup>.

Sin embargo, solo hasta fechas relativamente recientes, se ha comenzado a tener una idea clara de los mecanismos a través de los cuales el etanol ejerce sus efectos tóxicos. Históricamente, el primer mecanismo de acción propuesto en el presente siglo para explicar los efectos tóxicos producidos por el etanol, fue el de

\*1 El consumo de alcohol también produce severos efectos sobre el sistema nervioso como por ejemplo, alteraciones conductuales, depresión del sistema nervioso central, síndrome de abstinencia etc. (Victor y Adams, 1980), pero estas modificaciones no se estudiarán dentro de el presente trabajo.

la desnutrición primaria inducida por éste, a través de la sustitución de otros nutrientes por el etanol (Lieber, 1984). De esta manera, todos los demás efectos tóxicos del etanol sobre el metabolismo, fueron explicados como efectos secundarios de la desnutrición observada casi invariablemente en los individuos alcohólicos. De hecho, todavía en 1949, Charles Best, uno de los más ilustres defensores de esta teoría escribió "There is no more evidence of a specific toxic effect of pure ethyl alcohol upon liver cells than there is for one due to sugar"\*<sup>2</sup> (Best, 1949).

Este punto de vista comenzó a cambiar a finales de la década de los cincuenta, quedando demostrado años más tarde que el etanol *per se*, es capaz de producir severas alteraciones en el hígado del hombre, aún cuando éste reciba una dieta balanceada (Lieber et. al., 1963, 1965), o incluso enriquecida con proteínas, vitaminas y minerales (Lieber y Rubin, 1968). A partir de este momento, las investigaciones tendientes a evaluar las alteraciones observadas en individuos alcohólicos, se enfocaron principalmente en los efectos tóxicos provocados directamente por el etanol y sus productos de degradación (acetaldehído y acetato), por lo cual comenzaron a publicarse trabajos en los cuales se describen los efectos del etanol sobre las diferentes vías metabólicas, así como también las diferentes vías por las cuales el etanol puede ser metabolizado.

#### METABOLISMO DEL ETANOL

La oxidación del etanol inicialmente a acetaldehído y posteriormente a acetato, se realiza principalmente en 3 diferentes compartimientos celulares por medio de 3 sistemas oxidantes distintos:

- i) el sistema del alcohol deshidrogenasa, en citosol.

\*<sup>2</sup> "No existe más evidencia de un efecto tóxico específico del alcohol etílico puro sobre las células del hígado que los que se tienen para alguno debido al azúcar".

ii) El sistema microsomal oxidante de etanol (MEOS)<sup>\*3</sup> en retículo endoplásmico.

iii) El sistema de la catalasa, en los peroxisomas.

La principal vía de oxidación del etanol la constituye la alcohol deshidrogenasa, la cual se encarga de metabolizar prácticamente la totalidad del etanol cuando las concentraciones en sangre son moderadas y más del 70% cuando son altas (Piña Garza et.al., 1983; Mezey, 1985). Esto se debe principalmente a que la alcohol deshidrogenasa posee la Km para el etanol más baja de los tres sistemas oxidantes, la cual es de aproximadamente 1 mM (Matsuzaki et. al., 1981; Cornell et. al., 1983; Plapp et.al., 1984). 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  $\omega$ -oxidación de los ácidos grasos<sup>\*4</sup>. La enzima utiliza como coenzima al nicotinamín adenin dinucleótido oxidado ( $\text{NAD}^+$ ), generándose acetaldehído y nicotinamín adenin dinucleótido reducido (NADH):



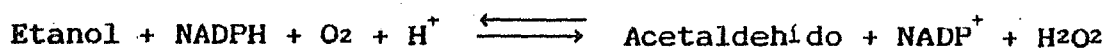
Esta generación de equivalentes reductores en forma de NADH es responsable de muchas de las alteraciones metabólicas que el etanol ocasiona.

Por lo que se refiere al sistema microsomal oxidante de etanol, este fué descubierto a finales de la década de los sesenta (Lieber y DeCarli, 1968, 1970) como resultado de los estudios sobre la proliferación en hepatocitos del retículo endoplasmático inducido por la ingesta del etanol (Iseri et. al., 1964, 1966). Estudios bioquímicos posteriores han permitido la

\*3 Del inglés microsomal ethanol oxidizing system.

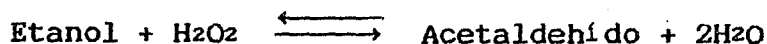
\*4 Esta enzima también cataliza activamente la conversión de la forma inactiva de la vitamina A. (retinol) a su forma activa (retinal) mediante una oxidación (Mezey., 1985), por lo cual se ha especulado que la función original de la alcohol deshidrogenasa es la activación de la vitamina A y no la oxidación del etanol.

caracterización y purificación de los componentes de este sistema, el cual presenta una Km para el etanol relativamente alta (aproximadamente 10 mM) (Mezey, 1945); y este es uno de los motivos por los que su contribución a la oxidación del etanol es relativamente pobre cuando los niveles séricos de etanol son bajos. Este sistema no genera equivalentes reductores, sino que al contrario los utiliza en forma de NADPH para generar la coenzima oxidada, acetaldehído y peróxido de hidrógeno (Tremolieres et. al, 1973):



Si bien se estima que su contribución en la oxidación del etanol es pequeña, se debe tener presente por un lado que este sistema aumenta su contribución si el etanol es ingerido crónicamente, y por otro que este sistema no tiene una alta especificidad por el etanol, ya que participa también en la oxidación de muchos productos xenobióticos, por lo cual ciertos medicamentos llegan a ser metabolizados más rápidamente de lo normal\*5.

La catalasa localizada en los peroxisomas, también es capaz de oxidar el etanol, sin embargo la participación de esta enzima en el metabolismo del etanol es considerada prácticamente nula, ya que en este caso el factor limitante es la producción de peróxido de hidrógeno, la cual en condiciones basales es extraordinariamente baja:



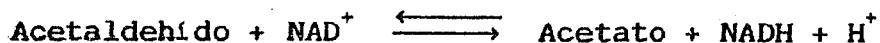
El acetaldehído generado por cualquiera de estas tres formas

\*5

En la intoxicación aguda por etanol, es decir cuando éste es ingerido en muy altas cantidades en un período corto de tiempo, ocurre todo lo contrario, ya que el etanol se convierte en un inhibidor competitivo (Piña Garza et. al., 1980), y es por esto que no se recomienda el consumo simultáneo de etanol y medicamentos.



de oxidación, es convertido en acetato produciendo NADH mediante la enzima acetaldehído deshidrogenasa, localizada ya sea en el citoplasma o en el interior de la mitocondria. Se han descrito varias isoenzimas capaces de actuar sobre el acetaldehído con diferentes constantes cinéticas, sin embargo éstas no han podido ser caracterizadas con todo rigor y además se desconoce la especificidad absoluta de estas isoenzimas, por lo cual algunos autores prefieren el nombre de aldehído deshidrogenasa (Piña Garza et. al., 1980):



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 en el hígado o en otros tejidos.

#### EFFECTOS METABOLICOS DEL ETANOL

Las alteraciones bioquímicas producidas por la ingestión del etanol son múltiples, y estas pueden ser sumamente serias si se ingiere mucho alcohol en poco tiempo, las cuales pueden conducir incluso, a la muerte. En la tabla I se muestra a manera de ejemplo, la correlación entre los niveles de etanol en sangre con los cambios conductuales típicos de un individuo.

El etanol ejerce diferentes efectos sobre el metabolismo hepático dependiendo principalmente de la dosis y duración de la ingesta (Lieber y DeCarli, 1977). Entre las alteraciones bioquímicas producidas por la ingestión de una fuerte dosis de etanol tenemos principalmente: un cambio en el estado redox de los hepatocitos, es decir una disminución en la razón  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , ya que la oxidación del etanol produce un aumento significativo en la cantidad de NADH citosólico a expensas de una disminución de  $\text{NAD}^+$  (ver apéndice A); esto último ocasiona toda una serie de cambios entre los que podemos mencionar:

TABLA I

CONCENTRACION DE ETANOL EN SANGRE Y ALGUNOS INDICADORES DEL  
COMPORTAMIENTO

CONCENTRACION DE ETANOL EN SANGRE		NUMERO DE BEBIDAS CON LAS QUE SE PUEDE ALCANZAR LA CONCENTRACION INDICADA*	INDICADORES APROXIMADOS DEL COMPORTAMIENTO
mg/100 ml	mm		
0-46	0-10	2	Normal, ligeramente eufórico.
46-96	10-20	4	Eufórico, verborrérico, ligeramente incoordinado, no debe manejar.
92-138	20-30	6	Excitado con frecuencia agresivo, irreflexivo, irresponsable.
138-230	30-50	8-10	Deprimido, obviamente incoordinado.
230-460	50-100	-	Muy deprimido, hay que ayudarlo a caminar.
>460	>100	-	Límite de tolerancia, peligro de muerte.

\* Dada la enorme variabilidad a la respuesta al etanol, esta columna de datos aproximados asume las siguientes condiciones: la unidad de bebida es la copa normal de una onza o una botella de cerveza o una copa de vino de mesa, y se refiere a la ingestión del número de bebidas anotado por un individuo de 65 Kg, en ayuno y en un período aproximado de 90 a 120 minutos. La situación cambia si el individuo tiene otro peso corporal, si ingiere alimentos o si consume el alcohol a una velocidad diferente. (Tomado de Zentella y Piña, 1987).

- 1) Una reducción en la oxidación de los lípidos y un incremento en la síntesis de éstos (Baraona y Lieber, 1979), debido al aumento de NADH necesario para la síntesis y la disminución concomitante de  $\text{NAD}^+$  necesario para la oxidación.
- 2) Un decremento en la actividad del ciclo de Krebs (Williamson et. al., 1969; Tremolieres et. al., 1973) ya que el NADH es un regulador negativo de la isocitrato deshidrogenasa.
- 3) Una disminución de la gluconeogénesis (Krebs, 1969), debido al aumento en la concentración de lactato a expensas del piruvato. Esto último puede desembocar en hiperlactacidemia o acidosis (Lieber, 1984), la cual a su vez produce un aumento en la cantidad de ácido úrico al promover la protonación del ión urato en sangre. El ácido úrico, al ser menos soluble que el ión urato se acumula en determinadas articulaciones y provoca ataques de gota.
- 4) Una inhibición de la glicólisis (Thurman y Scholz, 1977) al promover la formación de gliceraldehído-3-fosfato a expensas del 1,3-difosfoglicerato.

Además produce también una aceleración de las funciones microsomales involucradas en el metabolismo de drogas (Lieber y DeCarli, 1977) y un aumento en la activación de agentes hepatotóxicos y carcinogénicos (Lieber, 1984). Todos los efectos anteriores no se observan a concentraciones bajas de etanol.

Por lo que se refiere al consumo crónico de etanol, al menos en sus primeras etapas, produce cambios metabólicos adaptativos en retículo endoplásmico induciendo su proliferación (Iseri et. al., 1964, 1966); esto resulta primeramente en un incremento en el metabolismo de las drogas y en un incremento en la producción de lipoproteínas (Lieber y DeCarli, 1977). Períodos más extensos de ingesta producen un daño en los organelos celulares, principalmente en la mitocondria (e. g. Cederbaum y Rubin, 1975; Cederbaum et. al., 1976), así como también alteraciones en la fluidez y composición de los lípidos de membrana (Gordon et. al., 1982; Rouach et. al., 1984; Sun y Sun, 1985; Dawidowicz, 1985),

una disminución en las concentraciones endógenas de ATP sin un aumento paralelo de ADP o AMP (Spach et. al., 1979), la formación de uniones covalentes entre el acetaldehído, molécula altamente reactiva y macromoléculas celulares, principalmente proteínas, afectando su estructura y función (Sorrell y Tuma, 1985) ; la continuación de la ingesta puede eventualmente proseguir a lesiones hepáticas más severas como la hepatitis alcohólica, para culminar finalmente con cirrosis (Lieber y DeCarli, 1977). La figura 1 esquematiza los efectos del consumo crónico de etanol sobre las células del hígado. Si bien aparentemente está bien caracterizada la amplia gama de efectos producidos por la ingesta crónica de etanol, el panorama no es tan claro como uno quisiera: se tienen muchos reportes conflictivos entre sí, el mecanismo de acción del etanol para producir sus efectos metabólicos no está aún bien elucidado, y las formas de administrar el etanol en los estudios realizados para esclarecer sus efectos son de la más diversa índole, lo cual dificulta aún más la interpretación y comparación de la información disponible.

La técnica de administrar el etanol como parte de una dieta líquida en la cual el etanol proporciona el 36% del total de calorías diarias ingeridas<sup>\*6</sup>, fue diseñada hace dos décadas (para una revisión ver Lieber y DeCarli, 1982) y corresponde al modelo experimental más comúnmente utilizado para producir un consumo crónico de etanol. Esta dieta fue ideada en respuesta a la necesidad de desarrollar un modelo animal que pudiera establecer el hecho de que los daños en el hígado asociados con el abuso en el consumo de alcohol se deben no solamente a deficiencias en la dieta como habían afirmado previamente algunos investigadores (e. g. Best et. al., 1949). Con este modelo diversas alteraciones observadas en los alcohólicos fueron reproducidas en animales de experimentación, tales como hígado graso, hiperlipemia, varios

\*6 En esta dieta el 40% de las calorías ingeridas las proporcionan los carbohidratos, el 18% la proporcionan las proteínas y el resto los proporcionan los lípidos (Lieber y DeCarli, 1982).

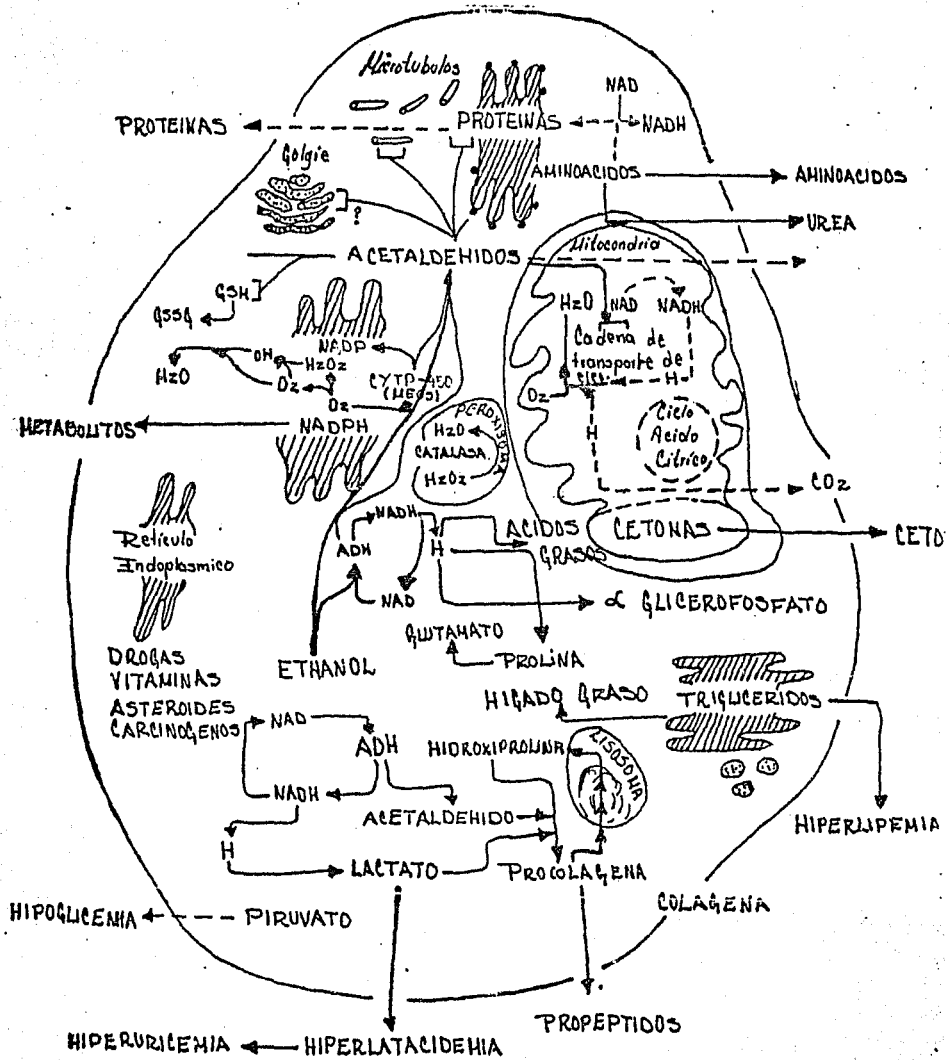


Figura 1.- Efectos de la ingesta crónica de etanol sobre las principales vías metabólicas en el hígado. (Tomado de Lieber, 1984).

desórdenes metabólicos y endócrinos, dependencia física y síntomas de abstinencia y en el mandril se produjo incluso, fibrosis y cirrosis (Lieber y DeCarli, 1982). Sin embargo, todos estos efectos son producidos únicamente con niveles muy alto de consumo de etanol.

En contraste, es importante mencionar que además de la amplia gama de efectos tóxicos del etanol, algunos investigadores han reportado efectos benéficos del consumo crónico en cantidades moderadas de etanol, tales como una reducción en la incidencia de infartos al miocardio y en la arteroesclerosis, esto como respuesta a la inducción por parte del etanol de un aumento de las lipoproteínas de alta densidad (para una revisión ver Baum-Baicker, 1985). De esta manera tenemos que resulta muy importante diferenciar entre los efectos producidos por el consumo crónico moderado de etanol y los producidos por el consumo crónico severo<sup>\*7</sup>. Pensando en esta base y partiendo del hecho de que en América del Norte, la población que consume alcohol de manera regular constituye más de la mitad de la población total (Schuckit, 1979; Baum-Baicker, 1985; Consejo Nacional Antialcohólico, 1985; Elliot et. al., 1985), y que de esta la mayoría bebe en cantidades moderadas, resulta notable que la mayor parte de las investigaciones tendientes a evaluar los efectos de la ingesta crónica de etanol corresponden más bien a una ingestión severa, dejando de lado los efectos metabólicos producidos por la administración crónica moderada (Elliot et. al., 1985) es por ello que en el presente trabajo se comienzan a evaluar algunos de los efectos producidos por la ingesta crónica moderada de etanol en algunas funciones mitocondriales en hepatocitos de rata, ya que la mitocondria juega un papel muy importante dentro de las funciones hepáticas, además de ser uno de los organelos más afectados por el etanol.

\*7 En este trabajo y de acuerdo con Kelbach (1974), se considera como consumo moderado de etanol aquél en el cual el etanol no aporta más del 20% del total de calorías diarias ingeridas, y<sup>o</sup> como severo aquél en el cual aporta más del 20%

La información que se obtenga proporcionará un mejor criterio para evaluar los efectos del consumo crónico moderado de etanol, así como una idea de las primeras alteraciones bioquímicas producidas por el etanol, las cuales a su vez pueden ayudar a esclarecer el mecanismo de acción de los efectos tóxicos del etanol.

## ANTECEDENTES

El alcoholismo constituye uno de los problemas de farmacodependencia más serios. Es por ello, que son bastantes numerosos los estudios efectuados para establecer los efectos metabólicos provocados por la ingesta crónica de etanol. Sin embargo, la información de que se dispone hasta el momento es aún conflictiva, y un ejemplo de ello, lo constituyen los reportes en ratas sobre los cambios en la composición de los lípidos membranales, ya que mientras algunos investigadores no señalan cambios (Gordon et. al., 1982; Rouach et. al., 1984), otros investigadores afirman que ocurren cambios en la composición de los ácidos grasos de los lípidos membranales (la Droitte et. al., 1984), e incluso un aumento en la rigidez de las membranas<sup>\*1</sup> (Waring et. al., 1982); o bien, alteraciones en la actividad de algunas enzimas como la succinato deshidrogenasa y la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa. Algunos investigadores reportan incrementos en la actividad de la succinato deshidrogenasa (Rawat y Kuriyama, 1972a, 1972b), otros no muestran cambios (Reed y Mezey, 1972; Cederbaum et. al., 1973; Bernstein y Penniall, 1978), e inclusive algunos señalan una inhibición (Cederbaum y Rubin, 1975). Con respecto a la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, Israel et. al., (1973) señala un incremento en la actividad de esta enzima, mientras que Cederbaum y Rubin (1975) no señalan cambios.

Se ha sugerido (Lieber y DeCarli, 1977) que estas discrepancias son debidas a diferencias en la administración del etanol, ya que las formas de suministrarlo son de la más diversa índole: en dietas líquidas, con el 36% de las calorías totales proporcionadas por el etanol (Lieber y DeCarli, 1982), con sonda gástrica (Videla e Israel, 1970), en el agua de beber (Elliot et. al., 1985), en dietas semilíquidas (Reed y Mezey, 1972), e incluso inhalado (la Droitte et. al., 1984). Además, la duración de los

\*1 Ver apéndice B.



tratamientos oscila entre dos semanas (Schneider y Manara, 1985) y cuatro meses (Koch et. al., 1977). Todo lo anterior, hace muy difícil la comparación entre los diferentes resultados obtenidos, ya que a cada tipo de tratamiento, debe corresponder una situación fisiológica distinta.

En vista de esto último, recientemente se ha propuesto diferenciar entre la administración crónica moderada de etanol, y la administración crónica severa (Prasad et. al., 1985; Elliot et. al., 1985); considerando como ingesta crónica moderada aquella en la cual el etanol proporciona menos del 20% del total de calorías ingeridas diariamente, y como severa aquella en la cual proporciona más del 20% (Kelbach, 1974)\*<sup>1</sup>.

En este sentido, se ha establecido que la administración del etanol al 10% (V/V) en el agua de beber, corresponde a un consumo crónico moderado de etanol (Prasad et. al., 1985), ya que el porcentaje diario de calorías ingeridas proporcionadas por el etanol, es constante, y de aproximadamente 17% (y si bien, los niveles de etanol ingeridos no producen alteraciones histológicas notables en el hígado, si provocan un incremento significativo en el contenido de citocromo P-450 y en la actividad de otros sistemas involucrados en el metabolismo de drogas (Prasad et. al., 1985). Bajo este criterio, la dieta líquida propuesta por Lieber y DeCarli, (1982), conteniendo 36% de las calorías totales como etanol, corresponde a una ingesta crónica severa. Esta última forma de administrar el etanol a sido una de la más utilizadas en la pasada década, sin embargo, presenta algunos inconvenientes importantes tales como: una inadecuada ingesta de nutrientes esenciales - vitamina B<sub>6</sub>, Calcio, Zinc, Cobre, Hierro, Manganeso y Fósforo - (Rao y Larkin, 1985) y una tasa de crecimiento menor en comparación con otros tipos de dietas (Spach et. al., 1979;

\*1 Es importante recalcar esto último, debido a que este trabajo junto con los de Prasad et. al., (1985) y Zentella de Piña et. al. (1988), constituyen los primeros reportes que caracterizan explícitamente los efectos bioquímicos de la ingesta crónica moderada en hígado.

Rovinski et. al., 1984; Rao y Larkin, 1985).

puesto que gran parte de los trabajos realizados sobre los efectos metabólicos del etanol, han sido tendientes a caracterizar lo que correspondería a un consumo crónico severo, dejando a un lado los provocados por el consumo crónico moderado, se decidió estudiar en nuestro laboratorio los efectos de este último modelo de administración, analizando para ello algunas funciones mitocondriales en el hígado de rata a lo largo de 1 a 8 semanas de tratamiento. Esto último, con el propósito de analizar la evolución de los cambios producidos por la ingesta crónica moderada de etanol. Esto resulta particularmente importante de estudiar, debido a que las mitocondrias de hígado son notablemente dañadas por la ingesta crónica severa de etanol (Kiessling y Tobé, 1964) y a que este organelo, juega un papel central dentro del metabolismo hepático. Dado que la función principal de la mitocondria es la generación de ATP, se estudiaron dentro de éstas las vías relacionadas con la síntesis de ATP como lo son: la actividad de ATPasa; la actividad de succinato deshidrogenasa; el consumo de oxígeno, tanto en condiciones de reposo como estimulado por ADP; y dos parámetros indicativos de la condición de la mitocondria: el cociente respiratorio y la relación ADP/O. Además se estudió la síntesis de citrulina, la cual corresponde a parte de una de las funciones más importante del metabolismo hepático, la síntesis de urea a partir de amonio.

En un reporte previo de nuestro laboratorio, Zentella de Piña et. al., (1988) establecieron algunas de las alteraciones metabólicas provocadas por la ingesta crónica moderada de etanol al cabo de cuatro semanas, tales como un incremento en la actividad de la succinato deshidrogenasa y un decremento en la síntesis de citrulina y la concentración de urea en sangre; si bien, esta última forma de ingestión del etanol no produce alteraciones nocivas importantes en mitocondrias de hígado de rata en comparación con las producidas a las cuatro semanas por la ingesta crónica severa (e. g. Cederbaum et. al., 1974), quedó por

demostrarse si tiempos de administración más prolongados pueden producir efectos similares a los ocasionados por la ingesta crónica severa.

Dado que más de la mitad de la población de América del Norte bebe de manera regular ligera o moderadamente (Baum-Baicker, 1985; Consejo Nacional Antialcohólico, 1985; Elliot et. al., 1985), (los bebedores severos solo constituyen el 15% o menos de la población total de bebedores (op. cit.)), los datos presentados en este trabajo resultan de interés, además de que proporcionan una idea de las primeras alteraciones bioquímicas producidas por el etanol, las cuales ayudarán eventualmente a esclarecer el mecanismo de acción de los efectos tóxicos del etanol.

La determinación de proteína se efectuó por el método del Biuret (Cleland y Slater, 1953), utilizando albúmina de suero de bovino (fracción V) como estandar y KCN para corregir la turbidez (Keiser y Vaughn, 1949)<sup>\*1</sup>.

El consumo de oxígeno mitocondrial se registró con un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.). El control respiratorio (CR) y la relación ADP/O se calculó de acuerdo a Estabrook (1967)<sup>\*2</sup>. La actividad de la succinato deshidrogenasa (succinato : DCIP<sup>\*3</sup> oxido reductasa) en un extracto mitocondrial fue determinada diluyendo la suspensión mitocondrial 10 veces con 0.1% lubrol WX en 20 mM de fosfato de potasio pH 7.0, de acuerdo con Siess (1983) y ensayado espectrofotométricamente por el método de Arrigoni y Singer (1962)<sup>\*4</sup>.

La actividad de ATPasa en mitocondrias fue ensayada tal y como lo describe Chávez y Cuéllar (1984)<sup>\*5</sup>. La síntesis mitocondrial de citrulina fue ensayada en el medio de incubación detallado por Corvera y García Sainz (1982); después de 10 minutos la incubación fue detenida por la adición de ácido perclórico (3% de concentración final). La citrulina sintetizada fue determinada por el método de Boyde y Rahmatullah (1981)<sup>\*6</sup>. El diseño o estrategia experimental se muestra en la figura 2.

\*1 (ver apéndice D).

\*2 (ver apéndice E).

\*3 DCIP: diclorofenol indofenol.

\*4 (ver apéndice F).

\*5 (ver apéndice G).

\*6 (ver apéndice H).

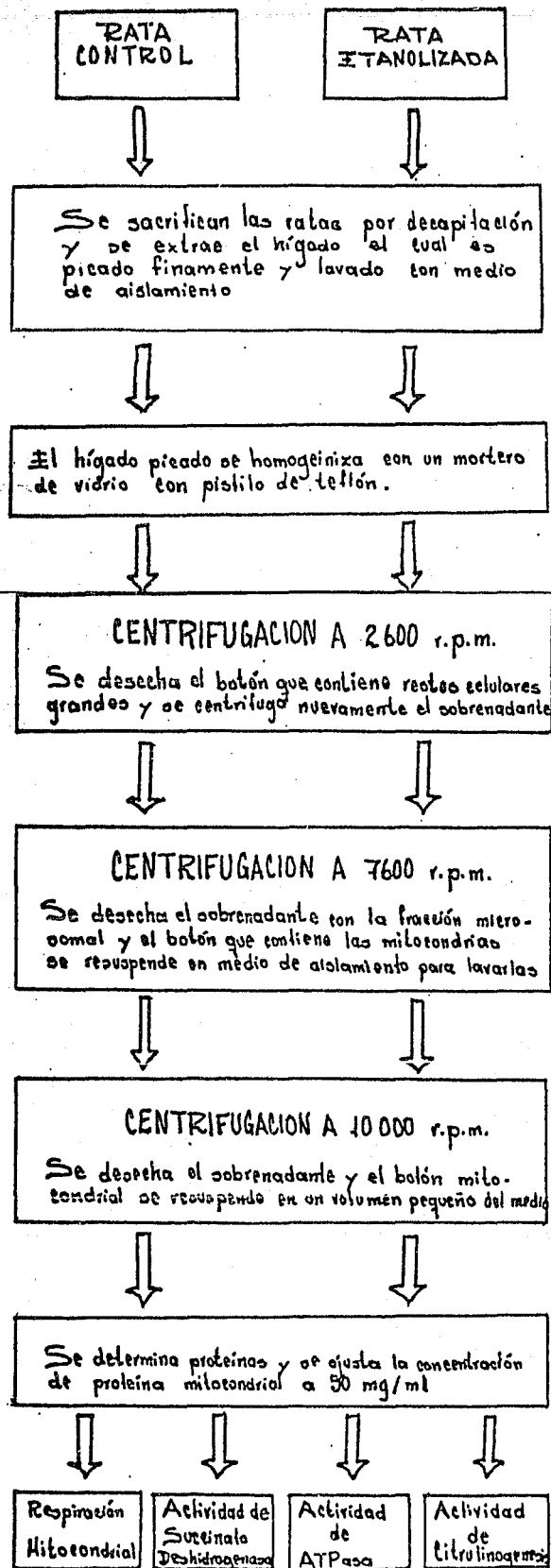


Figura 2. Estrategia experimental seguida durante el presente trabajo.

Los siguientes reactivos: malato, succinato, glutamato, ADP, ATP, D-manitol, fenazina metasulfato, 2,6-diclorofenol, indofenol (DCIP), oligomicina, ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfónico (TES), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lubrol WX y albúmina de suero de bovino (fracción V), fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.. Los otros reactivos fueron de la más alta calidad comercialmente disponible.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba de t para 2 medias (Yamane, 1970).

## RESULTADOS

La administración crónica moderada de etanol durante 6 semanas, no parece ejercer en terminos generales un efecto significativo sobre el control respiratorio y la relación ADP/O, ya sea con sustratos del sitio I (glutamato/malato) o con un sustrato del sitio II (succinato) (ver fig. 3a, 3b y tablas II y III), aunque es importante mencionar que a la tercera semana de ingesta se observó una inhibición significativa en el control respiratorio con glutamato-malato como sustratos, y un ligero incremento en la relación ADP/O a la cuarta semana de ingesta, también con glutamato-malato como sustratos. Estos resultados contrastan con los reportados para el consumo crónico severo de etanol, el cual produce en solo 3 ó 4 semanas, daños significativos en el control respiratorio y en la relación ADP/O, principalmente con sustratos de sitio I (Cederbaum et. al., 1974a; Cederbaum y Rubin, 1975; Bottenus et. al., 1982; Spach et. al., 1982). Sin embargo, la administración crónica moderada de etanol provoca, a la octava semana de ingesta una inhibición de más del 20% en el control respiratorio, ya sea con sustratos de sitio I o II ( $p < 0.05$ ) (fig. 3a y 3b), así como una ligera inhibición en la relación ADP/O.

Por lo que se refiere al consumo de oxígeno mitocondrial, tanto en condiciones de reposo (estado 4), como el estimulado por ADP (estado 3), con succinato como sustrato (fig. 4a y 4b), se observó despues de una pequeña estimulación a la primera semana, una reducción gradual hasta alcanzar poco más del 60% del control en el estado 4 y el 40% del control en el estado 3, al cabo de 8 semanas de tratamiento. Sin embargo, a la segunda semana de ingesta la inhibición producida resultó ser más notable que la observada durante la tercera semana, lo cual podría sugerir la posible existencia de algun proceso de adaptación al etanol. Utilizando glutamato-malato como sustratos se observó, tanto en la respiración de estado 3 como en la de estado 4 un patrón similar

al producido con succinato como sustrato (lo cual refuerza la posible existencia de algún proceso de adaptación al etanol), a partir de la cuarta semana se produjo una inhibición paulatina en la respiración, que alcanzó hasta un 30% al final de las 8 semanas de tratamiento (fig. 5a y 5b). Los trabajos con tratamiento crónico severo en ratas, señalan una inhibición de alrededor del 20-35% con sustratos de sitio II, y de casi 40% con sustratos de sitio I en la respiración de estado 3 al cabo de solo 3 ó 4 semanas (Cederbaum et. al., 1974a; Cederbaum y Rubin, 1975; Spach et. al., 1979; Gordon et. al., 1982).

La actividad de la succinato deshidrogenasa se incrementó paulatinamente hasta la tercera y cuarta semana cerca de 50% arriba del control, y posteriormente fue disminuyendo hasta alcanzar una inhibición de casi el 30% en la octava semana de tratamiento (ver fig. 6). A este respecto, el tratamiento crónico severo ha producido resultados contradictorios: algunos investigadores reportan incremento (French, 1968, 1969; Rawat y Kuriyama 1972a, 1972b), otros no muestran cambio (Reed y Mezey, 1972; Cederbaum et. al., 1973; Bernstein y Penniall, 1978) e inclusive, algunos señalan una inhibición (Cederbaum y Rubin, 1975).

La actividad de ATPasa resultó inhibida por la ingesta crónica moderada de etanol durante las 3 primeras semanas de ingesta, a la cuarta semana esta se incrementó ligeramente para inhibirse nuevamente a la quinta semana. En la séptima semana alcanza niveles normales y aumenta nuevamente en la octava semana. En la novena semana se obtiene una actividad de ATPasa similar a la del control (ver tabla IV). Los reportes con tratamientos crónicos severos no señalan cambios importantes hasta la cuarta semana de ingesta en la actividad de ATPasa latente y la estimulada por desacoplantes (Videla et. al., 1973; Cederbaum et. al., 1974a; Spach et. al., 1979); a la sexta semana reportan una inhibición de casi 20% en la actividad de ATPasa latente (Thayer y Rubin, 1979) y de 30% en la estimulada por desacoplantes (Thayer y



Rubin, 1979; Rottenberg et. al., 1980).

Por último, en lo que se refiere a la síntesis de citrulina, la ingestión de etanol al cabo de una semana provoca una fuerte inhibición de la síntesis de citrulina (casi 40%), la cual se recupera completamente a la cuarta semana para después abatirse fuertemente hasta alcanzar casi un 80% de inhibición al final de las ocho semanas de ingesta (fig. 7).

( SUBSTRATO SÚCCINATO )

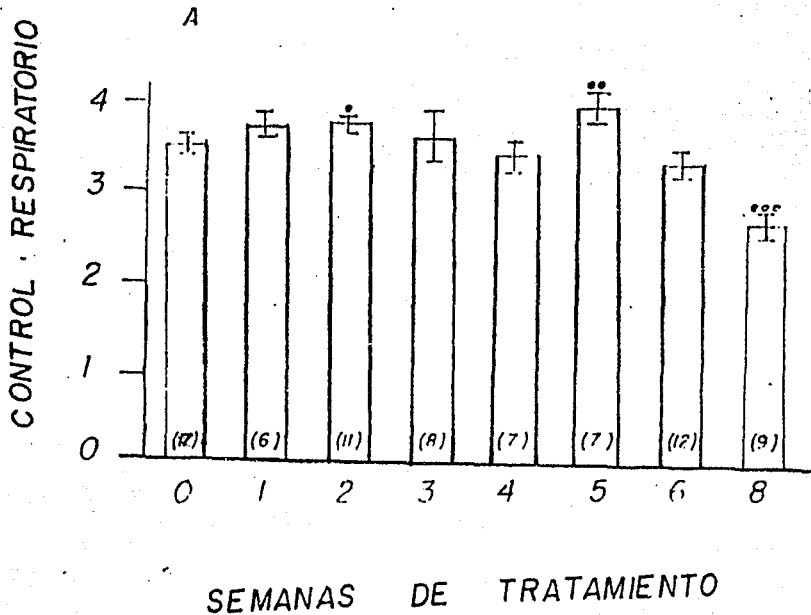


Figura 3a. Efecto de la administración crónica moderada de etanol sobre el control respiratorio mitocondrial con sustratos de sitio II. 2 mg de prot. mitocondrial se incubaron en una mezcla que contenía 260 mM manitol, 0.87 mM EDTA, 4.3 mM TES pH 7.4, suplementado con 3.3 mM fosfatos-tris pH 7.3, 2.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM KCl y 6.6 mM succinato-tris pH 7.3, o bien 3.3 mM malato-tris pH 7.3 más 3.3 mM glutamato-tris pH 7.3 como sustratos de sitio II y I, respectivamente, en un volumen final de 3 ml a 22 °C. La respiración fue estimulada por 410 nmolas de ADP. Los resultados representan la media ± S.E.M., con el número de animales indicado al pie de cada columna.

• p<0.05 . \*\* p<0.02 . \*\*\* p<0.001

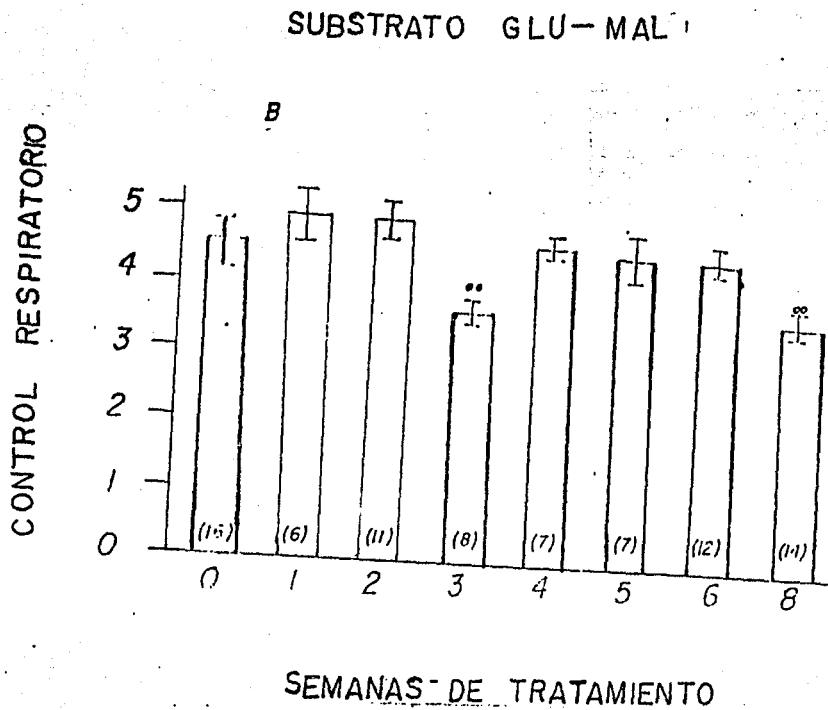


Figura 3b. Efecto de la administración crónica moderada de etanol sobre el control respiratorio mitocondrial con sustratos de sitio I (glutamato-malato). Las condiciones de incubación se detallan en la fig. 3a. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E.M., con el número de animales indicado entre paréntesis al pie de cada columna.

\*\*  $p < 0.02$

TABLA II

EFEECTO DEL CONSUMO CRONICO MODERADO DE ETANOL SOBRE LA RELACION ADP/O CON SUCCINATO COMO SUSTRATO

SEMANAS DE TRATAMIENTO	RELACION ADP/O	EFEECTO	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
0	1.64 ± 0.04 (13)		
1	1.68 ± 0.02 (5)	+ 2.4%	N.S. *
2	1.72 ± 0.04 (8)	+ 4.9%	N.S.
3	1.52 ± 0.08 (8)	- 7.3%	N.S.
4	1.65 ± 0.09 (7)	+ 0.6%	N.S.
5	1.79 ± 0.07 (7)	+ 9.1%	N.S.
6	1.70 ± 0.04 (12)	+ 3.6%	N.S.
8	1.37 ± 0.07 (8)	- 16.5%	P<0.005

Los resultados representan la media ± S.E.M., con el número de animales indicado entre paréntesis.

\* No significativa.

TABLA III

EFEECTO DEL CONSUMO CRONICO MODERADO DE ETANOL SOBRE LA RELACION ADP/O CON GLUTAMATO-MALATO COMO SUSTRATOS

SEMANAS DE TRATAMIENTO	RELACION ADP/O	EFEECTO	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
0	2.38 ± 0.08 (14)		
1	2.18 ± 0.03 (6)	- 8.4%	N.S. *
2	2.31 ± 0.09 (11)	- 2.9%	N.S.
3	2.11 ± 0.11 (8)	- 11.3%	N.S.
4	2.63 ± 0.05 (7)	+ 10.5%	P<0.001
5	2.44 ± 0.10 (7)	+ 2.5%	N.S.
6	2.63 ± 0.06 (12)	+ 10.5%	P<0.001
8	2.11 ± 0.06 (14)	- 11.3%	P<0.1

Los resultados representan la media ± S.E.M., con el número de animales indicado entre paréntesis.

\* No significativa.

ESTADO 4

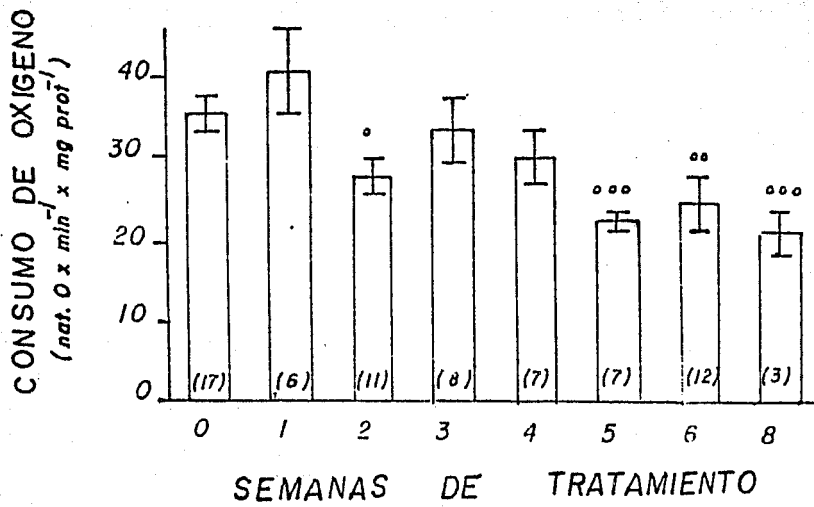


Figura 4a. Efecto de la administración crónica moderada de etanol sobre el consumo de oxígeno mitocondrial, en condiciones de reposo o estado 4, con succinato como sustrato. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E.M., con el número de animales indicado al pie de cada columna. Las condiciones de incubación se detallan en la figura 3a.  
 \*  $p < 0.05$  . \*\*  $p < 0.02$  . \*\*\*  $p < 0.001$

ESTADO 3

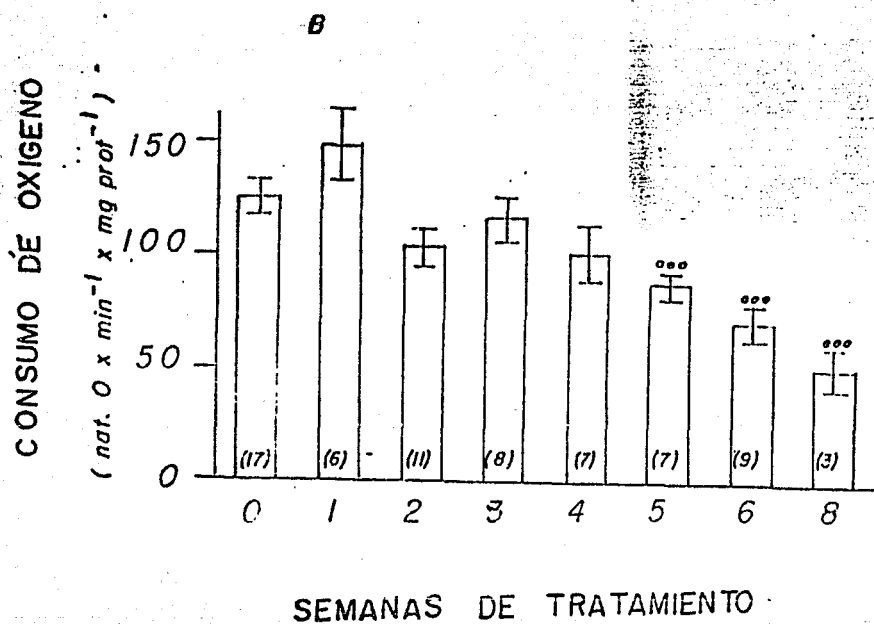


Figura 4b. Efecto de la administración crónica moderada de etanol sobre el consumo de oxígeno mitocondrial estimulado por ADP o de estado 3, con succinato como sustrato. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E.M., con el número de animales indicado al pie de cada columna. Las condiciones de incubación se detallan en la figura 3a.  
 \*\*\*  $p < 0.001$

ESTADO 4

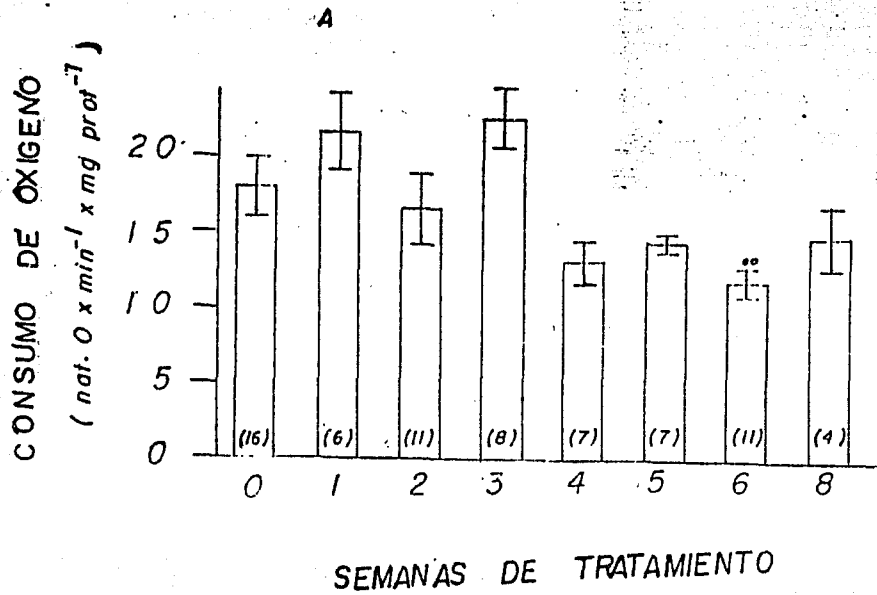


Figura 5a. Efecto de la administración crónica moderada de etanol sobre el consumo de oxígeno mitocondrial en condiciones de reposo o de estado 4, con glutamato-malato como sustratos. Las condiciones de incubación se detallan en la figura 3a. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E.M., con el número de animales indicado al pie de cada columna.

\*\*  $p < 0.01$

ESTADO 3

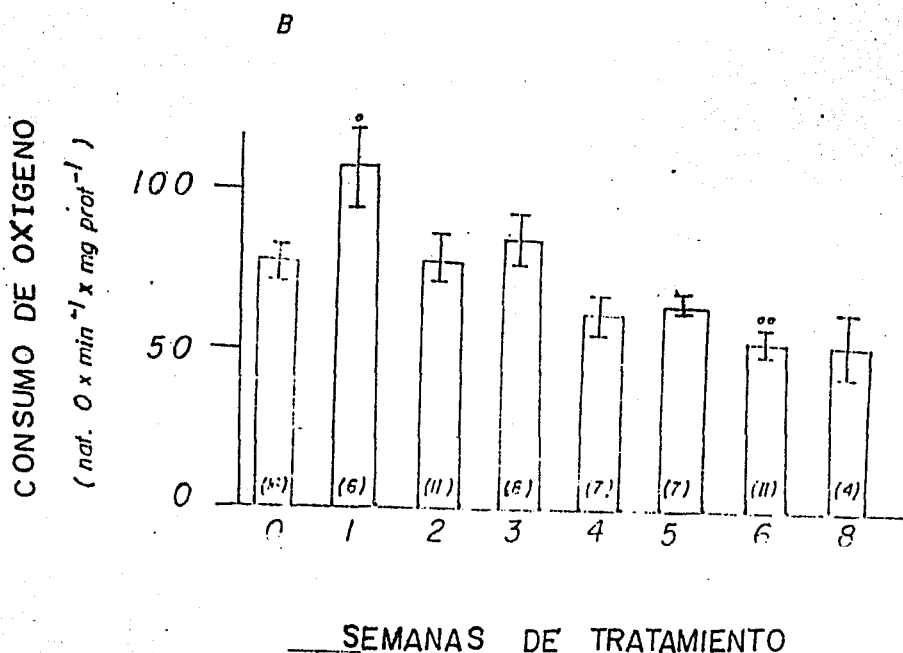


Figura 5b<sup>o</sup>. Efecto de la ingesta crónica moderada de etanol sobre el consumo de oxígeno mitocondrial en condiciones de estado 3, o estimulado por ADP, con glutamato-malato como sustratos. Las condiciones de incubación se detallan en la figura 3a. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E.M., con el número de animales indicada al pie de cada columna.

•  $p < 0.02$     ••  $p < 0.01$



## ACTIVIDAD DE SUCCINATO DESHIDROGENASA

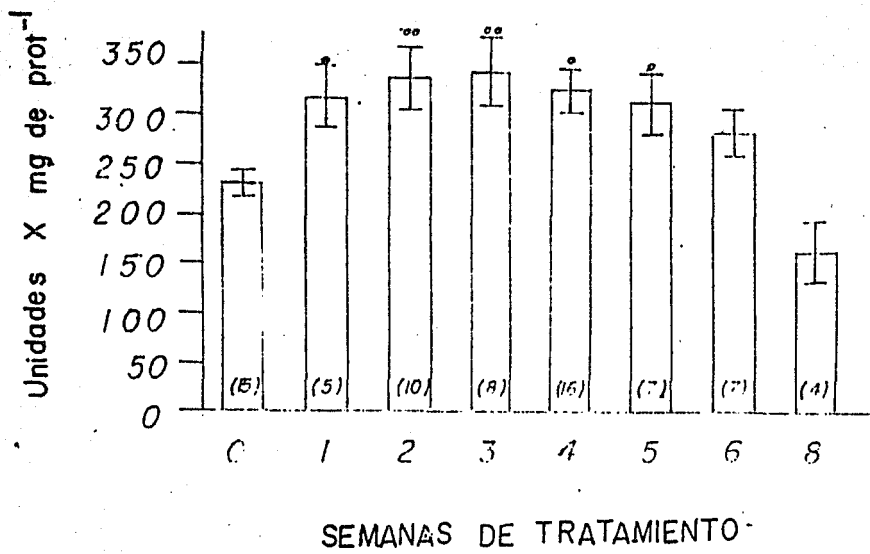


Figura 6. Efecto del consumo crónico moderado de etanol sobre la actividad de la succinato deshidrogenasa en mitocondrias de hígado de rata. La actividad se determinó tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E.M., con el número de animales indicado al pie de cada columna.

•  $p < 0.02$  . ••  $p < 0.005$

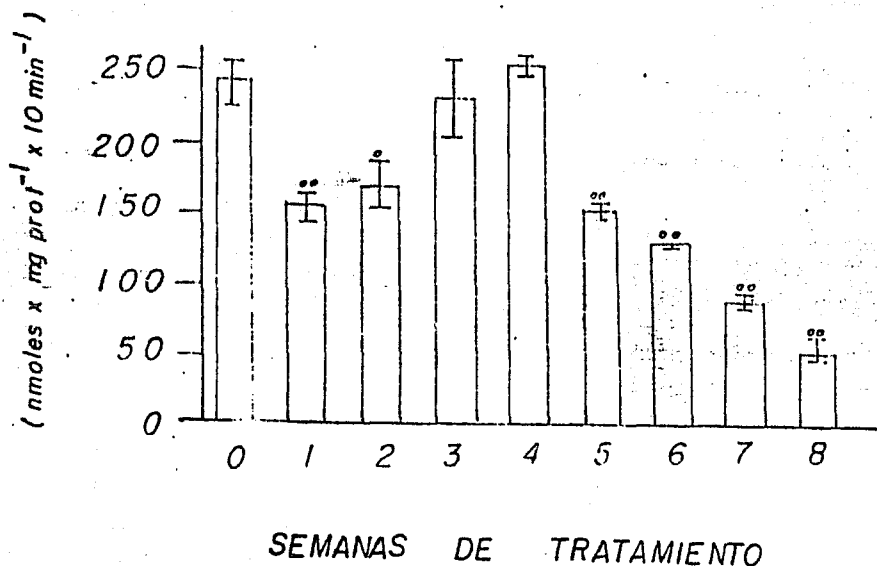
TABLA 8

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA MODERADA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE ATPasa LATENTE EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA

SEMANAS DE TRATAMIENTO	ACTIVIDAD DE ATPasa	EFFECTO	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
0	279 ± 17 (16)		
2	202 ± 6 (3)	- 27.6%	P<0.001
3	200 ± 10 (4)	- 28.3%	P<0.001
4	347 ± 21 (11)	+ 24.4%	P<0.02
5	208 ± 4 (3)	- 25.4%	P<0.001
7	290 ± 13 (4)	+ 3.9%	N.S.
8	341 ± 11 (5)	+ 22.2%	P<0.005
9	274 ± 28 (7)	- 1.8%	N.S.

La actividad de ATPasa latente esta expresada en nmolas P<sub>i</sub> liberado x min<sup>-1</sup> x mg prot<sup>-1</sup>. Los resultados representan la media ± S.E.M., con el número de animales indicado entre paréntesis.

## SINTESIS DE CITRULINA



**Figura 7.** Efecto de la administración crónica moderada de etanol sobre la síntesis de citrulina en mitocondrias de hígado de rata a lo largo de 8 semanas de tratamiento. La síntesis de citrulina fue medida en dos ml (volumen final) de un medio que contiene: 4.5 mg de proteína mitocondrial, 75 mM Tris-HCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM ornitina, 10 mM succinato, 4 µg retenona, 25 mM manitol y 10 mM NH<sub>4</sub>Cl pH 7.4. Los resultados mostrados representan la media ± S.E.M., con el número de animales indicado al pie de cada columna.

° p<0.002    °° p<0.001

## DISCUSION

A pesar de la gran cantidad de reportes disponibles acerca de los cambios bioquímicos producidos por la ingesta crónica de etanol, son escasos los trabajos en los cuales se analiza la evolución de tales cambios a lo largo del tiempo. En dicho sentido, este trabajo es uno de los pocos que proporcionan información al respecto. Lo anterior es particularmente importante, dado que la magnitud de los efectos producidos por el etanol, son altamente dependientes de la duración de la ingesta (Lieber y DeCarli, 1977; información proporcionada en este trabajo).

Los resultados obtenidos con la ingesta crónica moderada, al contrastarse con los obtenidos por otros investigadores con la ingesta crónica severa, muestran una clara y significativa diferencia, ya que esta última es notoriamente más nociva al comparar efectos-tiempo de tratamiento, por lo menos en lo que se refiere a la respiración mitocondrial. Sin embargo, es muy notable la inhibición en la respiración mitocondrial después de 8 semanas de consumo crónico moderado, principalmente con succinato como sustrato. Esto último indica, que aún el consumo moderado, con el tiempo provoca efectos altamente nocivos sobre mitocondrias.

Es difícil tratar de explicar el ligero incremento en la respiración mitocondrial producido por el tratamiento con etanol en la primera semana de ingesta, puesto que el etanol no tiene efectos directos sobre el consumo de oxígeno (Cederbaum et. al., 1974b). Además, las concentraciones de etanol en sangre, producidos por el tratamiento crónico moderado de etanol son despreciables (Lieber et. al., 1965; Elliot et. al., 1985; Zentella de Piña et. al., 1987); esto último contrasta con la concentración de etanol en sangre producida por el consumo crónico severo, la cual oscila alrededor de 15 mM (Lieber et. al., 1965; Väänänen y Lindros, 1985).

Con respecto a la inhibición por el tratamiento crónico de

etanol en la respiración mitocondrial en el estado 4 o de reposo, no es claro el significado fisiológico de la misma. Algunos investigadores (Groen et. al. 1982), señalan al reciclamiento de protones a través de la membrana interna mitocondrial como el principal factor que determina el consumo de oxígeno en condiciones de estado 4. En contraposición, otros autores han demostrado la síntesis mitocondrial de ATP en condiciones de estado 4 (Lemasters y Hackenbrock, 1980; Masini et. al., 1983), e inclusive (con piruvato como sustrato), han logrado inhibir con oligomicina en más de un 50% el consumo de oxígeno en condiciones de estado 4 (Masini et. al., 1983; Julián Sánchez et. al., 1987; Riveros Rosas et. al., 1987); lo cual implica que por lo menos un 50% de la respiración en el estado 4 está acoplada a la síntesis de ATP. Todo esto sugiere entonces, que la respiración de estado 4 refleja los requerimientos energéticos de la mitocondria, y no constituye un mero artefacto, como se había sugerido previamente (Groen et. al., 1982). En este sentido, pensamos en un futuro próximo titular la respiración mitocondrial en estado 4 con oligomicina, y comparar la proporción del consumo de oxígeno está acoplado a la síntesis de ATP, tanto en las ratas etanolizadas como en las controles.

En relación con la respiración mitocondrial en el estado 3, algunos investigadores reportan al translocador de adenín nucleótidos y al acarreador de dicarboxialtos como los principales factores limitantes en la velocidad de la fosforilación oxidativa (Groen et. al., 1982; Wanders et. al., 1984a). Si suponemos que la cadena respiratoria no ejerce un control significativo en el consumo de oxígeno mitocondrial en el estado 3, tendremos entonces que el cociente (vel. de consumo de oxígeno en edo. 3 con succinato)/(vel. de consumo de oxígeno en edo.3 con sustratos de

sitio I) debe ser cercano a los  $3/2^{*1}$ , ya que para tener una X velocidad de síntesis de ATP, los sustratos de sitio II consumen 1.5 veces más oxígeno que los sustratos de sitio I. El valor que se obtiene para las ratas controles no difiere significativamente de  $3/2$  ( $1.55 \pm 0.08$ ) (ver tabla V), lo cual nos indica que efectivamente en condiciones normales la cadena respiratoria no ejerce un control importante en la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3. Sin embargo, al calcular este mismo cociente para las ratas tratadas crónicamente con etanol durante 8 semanas obtenemos un valor de  $1.08 \pm 0.11$  (ver tabla V), el cual difiere significativamente de  $3/2$  ( $p < 0.01$ ). En base a estos resultados, se puede afirmar que al final de las 8 semanas de tratamiento, la cadena respiratoria y/o el acarreador de dicarboxilatos con succinato como sustrato, se han convertido en uno de los factores limitantes más importantes en la velocidad de consumo de oxígeno de estado 3. Esto último se ve apoyado por el hecho de que la administración crónica de etanol disminuya la actividad de la citocromo oxidasa (Cederbaum et. al., 1973; Cederbaum y Rubin, 1975; Koch et. al., 1977; Bernstein y Penniall, 1978; Spach et. al. 1982; Zentella de Piña et. al., 1988) y de los citocromos a+a<sub>3</sub> y b (Koch et. al., 1977; Bernstein y Pennial, 1978; Thayer y Rubin, 1979, 1981; Schilling y Reitz, 1980; Zentella de Piña et. al., 1988).

Por otra parte es todavía incierto el significado fisiológico de una alteración en la respiración de estado 3, ya que un aumento o disminución de esta última, no se correlaciona con un aumento o disminución en la respiración por parte de la célula completa; de hecho, Thurman et. al., (1976) reportan con la ingesta crónica de etanol, un incremento en el consumo de oxígeno en hígado

\*1 Esto es cierto, sí y solo sí las respectivas deshidrogenasas y acarreadores no son también un factor limitante. (Para el caso de la succinato deshidrogenasa esto es válido, ya que incrementos en la actividad de esta enzima, no correlacionan con incrementos en la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial en condiciones de estado 3 (Zentella de Piña et. al., 1988; resultados proporcionados en este trabajo)).

perfundidos, al tiempo que establecen para esos mismos hígados, un decremento en el consumo de oxígeno de estado 3.

Para poder determinar si la relación ADP/O se ve afectado preferentemente con sustratos de sitio I o II, se calculó el cociente  $(ADP/O \text{ con sustratos de sitios II}) / (ADP/O \text{ con sustratos de sitio I})$  para cada uno de los grupos experimentales (tabla V). si el ADP/O no ha sido afectado preferentemente para ninguno de los dos tipos de sustratos, el cociente debe tender hacia un valor de 2/3; si en cambio, el acoplamiento de la fosforilación oxidativa se ve afectado selectivamente para un tipo de sustrato, el cociente obtenido debe ser significativamente diferente de 2/3. Como se puede observar en la tabla V, durante las últimas semanas de tratamiento con etanol, el valor del cociente no difiere significativamente de 2/3, lo cual sugiere que el acoplamiento de la fosforilación oxidativa no es selectivamente afectado para sustratos de sitio I o II. Esto contrasta con algunos reportes con ingesta crónica severa de etanol, los cuales señalan un desacoplamiento preferentemente con sustratos de sitio I (Cederbaum y Rubin, 1975). Durante las primeras semanas de ingesta, el cociente sí parece diferir significativamente de 2/3, pero en este caso, es probable que más bien se deba a una mejora en el acoplamiento de la fosforilación oxidativa para sustratos de sitio II, indicando aparentemente una mejora en el acoplamiento de la succinato deshidrogenasa con la cadena respiratoria.

Por lo que se refiere a la succinato deshidrogenasa, no es claro si las alteraciones observadas en la actividad de esta enzima son fisiológicamente relevantes; si bien esta enzima no ha sido señalada como un factor limitante en la respiración mitocondrial (Groen et. al., 1982), es una enzima que cataliza una reacción alejada del equilibrio (Krebs, 1969), y que es modulada por diversos metabolitos e iones (Singer et. al., 1973; Chaffee et. al., 1977; Swierczynski y Davis, 1978; Chávez et. al., 1986), por lo cual no puede descartarse su posible papel como un importante enzima reguladora del ciclo de Krebs (ver apéndice I).

Con relación a la síntesis de citrulina, los resultados obtenidos durante la primera semana de tratamiento, concuerdan bien con los reportes que señalan una inhibición en la síntesis de urea en hepatocitos aislados incubados con etanol. (Stubbs, 1976; Morland et. al., 1981); lo cual sugiere un efecto directo del etanol sobre las enzimas del ciclo de la urea. La fuerte declinación en la síntesis de citrulina en las últimas semanas es probable que este relacionado con el abatimiento de la respiración mitocondrial con succinato como sustrato (ver figura 7), ya que es precisamente el succinato el sustrato oxidable utilizado en el ensayo de citrulinogénesis.

Por otra parte, los resultados mostrados en el presente trabajo señalan la necesidad de efectuar una evaluación más cuidadosa de los reportes que señalan "efectos benéficos" con el consumo moderado de etanol, ya que conforme transcurre el tiempo, los efectos producidos por la ingesta moderada de etanol llega a ser tan nocivos como los producidos por la ingesta crónica severa, es decir, es necesario evaluar cuidadosamente también los efectos tóxicos del consumo moderado de etanol sobre todo en humanos, antes de pensar en los beneficios terapéuticos producidos por este.

Por último, es importante hacer notar con relación a todos los efectos observados en el presente trabajo, que el etanol parece tener distintos mecanismos para provocar sus efectos, ya que por un lado es capaz de producir un ligero aumento en todas las funciones respiratorias de la mitocondria, y al mismo tiempo producir una disminución importante en la síntesis de citrulina; sin embargo, ya para la octava semana de tratamiento prácticamente todas las funciones mitocondriales se encuentran abatidas. Además, es importante enfatizar el posible proceso de adaptación metabólica que se da alrededor de la tercera semana de ingesta, como un intento de la mitocondria de recuperar su funcionamiento normal. Queda todavía mucho por investigar en cuanto a la serie de eventos a nivel molecular que ocurren durante la ingesta continua



de etanol, pero a este respecto, éste es uno de los pocos trabajos que da una idea de la evolución en el tiempo, de los cambios producidos por la ingesta de etanol, lo cual es una de las primeras etapas necesarias para la elucidación de cualquier mecanismo de acción.

TABLA V

EFFECTO DEL CONSUMO CRONICO MODERADO DE ETANOL A LO LARGO DE 8 SEMANAS DE TRATAMIENTO SOBRE EL COCIENTE [VEL. DE CONSUMO DE OXIGENO EN ESTADO 3 CON SUCCINATO COMO SUSTRATO]/[VEL. DE CONSUMO DE OXIGENO EN ESTADO 3 CON GLUTAMATO-MALATO COMO SUSTRATOS] Y SOBRE EL COCIENTE [ADP/O CON SUCCINATO COMO SUSTRATO]/[ADP/O CON GLUTAMATO-MALATO, COMO SUSTRATOS]

SEMANAS DE TRATAMIENTO	[EDO. 3 (succ.)]	[ADP/O (succ.)]
	[EDO. 3 (glu-mal)]	[ADP/O (glu-mal)]
0	1.55 ± 0.08 (11)	0.68 ± 0.02 (12)
1	1.50 ± 0.04 (5)	0.76 ± 0.03 (5)*
2	1.45 ± 0.07 (9)	0.76 ± 0.02 (9)‡
3	1.39 ± 0.04 (8)*	0.74 ± 0.01 (7)‡
4	1.64 ± 0.08 (7)	0.66 ± 0.01 (5)
5	1.31 ± 0.03 (5)‡	0.74 ± 0.01 (5)‡
6	1.31 ± 0.05 (8)‡	0.66 ± 0.01 (10)
8	1.08 ± 0.11 (9)‡	0.64 ± 0.03 (8)

Los resultados representan la media ± S.E.M., con el número de animales indicado entre paréntesis.

\* p<0.05      ‡ p<0.01

## APENDICE A

### ESTADO REDOX DE LA CELULA

El estado redox de la célula es caracterizado por el valor de la razón (Krebs, 1967):

$$\frac{\text{Concentración de NAD}^+ \text{ libre}}{\text{Concentración de NADH libre}}$$

y es comúnmente referida como la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}^{*1}$ . Esta razón es particularmente importante de conocer debido a que proporciona información acerca del comportamiento metabólico que tienen los sustratos oxidados y reducidos, ya que por un lado determina la dirección de las reacciones reversibles que ocurren dentro de la célula, y por otro, determina la magnitud de los cambios de energía libre que se producen en las reacciones de óxido-reducción. Esto último resulta importante sobre todo si se recuerda que muchas de las reacciones dentro de la célula no se lleva a cabo a menos que el cambio en energía libre este por arriba de cierto valor mínimo.

\*1 Se especifica  $\text{NAD}^+$  libre y  $\text{NADH}$  libre para excluir los nucleótidos unidos a proteína, los cuales no son liberados al citoplasma y no participan en la mayoría de las reacciones de óxido-reducción que se dan dentro de la célula, y no determinan por tanto, el comportamiento de los sustratos reducidos y oxidados.

## APENDICE B

### IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LAS ALTERACIONES EN LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA

Los cambios en la fluidez o rigidez de la membrana, como es bien conocido, se deben a alteraciones en la proporción de lípidos saturados e insaturados: un aumento en la proporción de lípidos saturados confiere una mayor rigidez en la estructura de la membrana, al favorecer la formación de un retículo cristalino rígido (e. g. Morrison y Boyd, 1983). A su vez, un aumento en la proporción de lípidos insaturados tiene como consecuencia un aumento en la fluidez de la membrana ya que debido a su doble enlace y al dobléz en su estructura que le acompaña, rompen suficientemente el alineamiento de los lípidos saturados como para que la membrana tenga un carácter semilíquido<sup>\*2</sup>.

Las alteraciones en la composición de las membranas celulares son de suma importancia, debido a que estas pueden provocar un cambio generalizado en el funcionamiento de todas la proteínas asociadas a membranas (Raison, 1972), ya que al producirse modificaciones en el medio lípidico e hidrofóbico en el cual están inmersas algunas proteínas, se pueden inducir cambios importantes en la estructura tridimensional de estas, lo cual a su vez puede alterar su función dentro de la célula. En este sentido resulta muy interesante la correlación que se ha podido establecer entre el grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos membranales y la temperatura a la cual el organismo normalmente funciona (Raison, 1972), ya que mientras más baja sea la

\*2

Este último efecto se puede observar de manera más espectacular en los procedimientos para el endurecimiento de aceites, ya que la hidrogenación de algunos de los dobles enlaces de aceites como el de semilla de algodón, maíz o soya, convierte estos líquidos en sólidos de consistencia comparable a la de la manteca y mantequilla. Este endurecimiento de aceites es la base de una industria importante que produce grasas para cocinar y oleomargarinas.

temperatura a la cual trabaja el organismo, mayor es el grado de insaturación que presentan sus lípidos de membrana.

Sin embargo, esto no debe llevarse al extremo de pensar que cualesquier modificación en la composición de la membrana conlleva necesariamente alteraciones en el funcionamiento de sus proteínas asociadas. De hecho se ha podido demostrar cambios significativos en la composición de las membranas, sin alteraciones importantes en los sistemas enzimáticos asociados a ellas, y viceversa, alteraciones importantes en la actividad de enzimas asociadas a membranas, sin cambios importantes en la composición de los lípidos de éstas (Gordon et. al., 1982).

## APENDICE C

### AISLAMIENTO DE MITOCONDEIAS

La técnica generalmente utilizada para el aislamiento de mitocondrias intactas, es la desarrollada por Schneider y Hogeboom (1950). En ella el primer paso después de cortar el tejido hepático en pequeñas piezas, es romper las células. Esto se efectua entre 0° y 4° C. en un medio de suspensión isotónico, generalmente a base de sacarosa o manitol<sup>\*3</sup>. En nuestro caso el medio de aislamiento utilizado es el descrito previamente por Siess (1983a) y consiste en: 0.3 M manitol<sup>\*4</sup> (como agente para mantener isótonico el medio<sup>\*5</sup>), 1 mM EDTA (como quelante de calcio<sup>\*6</sup> y 5 mM TES pH 7.4 (como buffer para mantener constante el pH). las células se rompen mediante una homogeneización suave, utilizando un mortero de vidrio con pistilo de teflón de 0.1 mm de sección<sup>\*7</sup>. Posteriormente, el homogeneizado recibe una centrifugación relativamente ligera (600 x g durante 10 min.) para sedimentar células completas, restos celulares grandes y núcleos. El sobrenadante, que contiene a las mitocondrias se centrifuga generalmente de 5500 x g a 10000 x g durante 10 min. para obtener

<sup>\*3</sup> Se efectua en frío para bajar al mínimo la actividad de las enzimas líticas que podrían de alguna manera dañar las mitocondrias.

<sup>\*4</sup> Utilizamos manitol porque se ha demostrado que los monosacáridos son mejores que los disacáridos en la preservación de las funciones mitocondriales (Siess, 1983b).

<sup>\*5</sup> La osmolaridad de la célula hepática es de alrededor de 300 mOsmoles.

<sup>\*6</sup> Se añade debido a que el Ca<sup>+</sup> es un fuerte agente desacopla de las mitocondrias al permeabilizar la membrana interna mitocondrial (e. g. Drahota et. al. 1965).

<sup>\*7</sup> En el caso de tejidos animales más densos como el músculo cardíaco, es necesario ablandar previamente el tejido por tratamiento con una enzima proteolítica bacteriana (nagrasa), para lograr un rompimiento celular satisfactorio (Whittaker y Darks, 1982).

un sedimento que contiene a las mitocondrias. El sedimento se resuspende en medio de aislamiento y se centrifuga nuevamente para lavar las mitocondrias y dejarlas libres de material no mitocondrial contaminante. Las mitocondrias finalmente se resuspenden en un pequeño volumen de medio de aislamiento para finalmente ajustarlas a una concentración de 50 mg de prot. mitocondrial/ml.

## APENDICE D

### DETERMINACION DE PROTEINA

La reacción de biuret para la determinación de proteínas fue uno de los primeros ensayos colorimétricos de proteína desarrollados (Gornall et. al., 1949). y desde entonces sigue siendo uno de los métodos más ampliamente utilizados. Se usa principalmente en aquellos casos en que se requiere una determinación rápida de la concentración de proteína y no se requiere una gran sensibilidad. La naturaleza del complejo coloreado, aunque desconocida en detalle, se piensa que involucra la formación de un complejo en solución alcalina entre el cobre y el enlace peptídico de las proteínas y los residuos de tirosina (Cooper, 1979).

Las sustancias que interfieren con este ensayo incluyen buffers de naturaleza aminoácida o peptídica como el Tris, ya quedan una formación de color positiva.

#### Preparación del reactivo de biuret.

i) Disolver 1.50 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre II pentahidratado) y 6.00 g de  $\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tartrato de sodio y potasio) en 500 ml de agua destilada.

ii) Añadir 300 ml de NaOH (hidróxido de sodio) al 10% (P/V) y aforar la solución a un litro con agua destilada.

El reactivo de biuret así preparado debe presentar un color azul no muy oscuro, pudiendo ser almacenado indefinidamente. Si se llega a observar la formación de un precipitado negro dentro del frasco que lo contiene, la solución debe descartarse y prepararse una nueva.

#### Determinación de proteína.

En tubos de microcentrifuga (de 1 ml. de capacidad) se añaden las siguientes soluciones: 75  $\mu\text{l}$  de agua destilada, 10  $\mu\text{l}$  de suspensión de mitocondrias y 15  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético 3 M



para precipitar las proteínas (cada determinación debe efectuarse por triplicado). Posteriormente se centrifugan los tubos en una microcentrifuga clínica por 2 min. descartándose el sobrenadante. El precipitado de proteína mitocondrial se resuspende cuidadosamente con ayuda de una espatulilla en 100  $\mu$ l de agua. El blanco lo constituyen 3 tubos con 100  $\mu$ l de agua solamente y el estandar lo constituyen 3 tubos con 100  $\mu$ l de una solución de albúmina de suero de bovino (10 mg/ml). La densidad óptica que se obtiene del standar con una cubeta de 1 cm de espesor, ya restando la turbidez, es de alrededor de 0.260-0.280.

Posteriormente se añaden 400  $\mu$ l de agua a todos los tubos seguidos de 500  $\mu$ l del reactivo de biuret. Los tubos se tapan cuidadosamente y se agitan vigorosamente en el vortex. Los tubos se leen en el espectrofotómetro a 546 nm de longitud de onda.

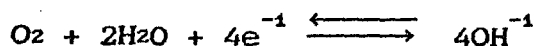
Finalmente, para restar la turbidez que se presenta en los tubos, se añade a cada uno una pequeña pizca de KCN, el cual reacciona con el complejo coloreado del reactivo de biuret, volviéndolo incoloro, por lo que al leer nuevamente la absorbancia de los tubos, uno ya es capaz de restar a la lectura original, la absorbancia provocada por la turbidez. Una vez restada la absorbancia del blanco a cada uno de los tubos, la absorbancia restante es directamente proporcional a la concentración de proteína.

## APENDICE E

### DETERMINACION POLAROGRAFICA DE OXIGENO EN SOLUCION

El elctródo de oxígeno tipo Clark es ampliamente utilizado en investigaciones relacionadas con la fosforilación oxidativa. Este consiste esencialmente de un cátodo de platino y un ánodo de plata envueltos dentro de un bloque de epoxi formando la celda sensora..

El sensor se encuentra cubierto por una fina película de una solución de 3 M de KCl, la cual está separada del medio de reacción por una fina membrana de teflón, permeable solo a gases (Yellow Springs Instrument Co., 1980; Dawes, 1980). Cuando un voltaje polarizante es aplicado a través de la celda, el oxígeno reacciona en el cátodo provocando que fluya una corriente a través de la célula<sup>\*1</sup>:



La corriente que fluya a través de este electródo será directamente proporcional a la concentración de oxígeno<sup>\*2</sup>.

\*1 El consumo de oxígeno por el sensor es de aproximadamente 0.2 nanoátomos oxígeno x min<sup>-1</sup>. por lo que puede ser despreciado en la mayoría de los casos.

\*2 Estrictamente es proporcional a la actividad del oxígeno en solución.

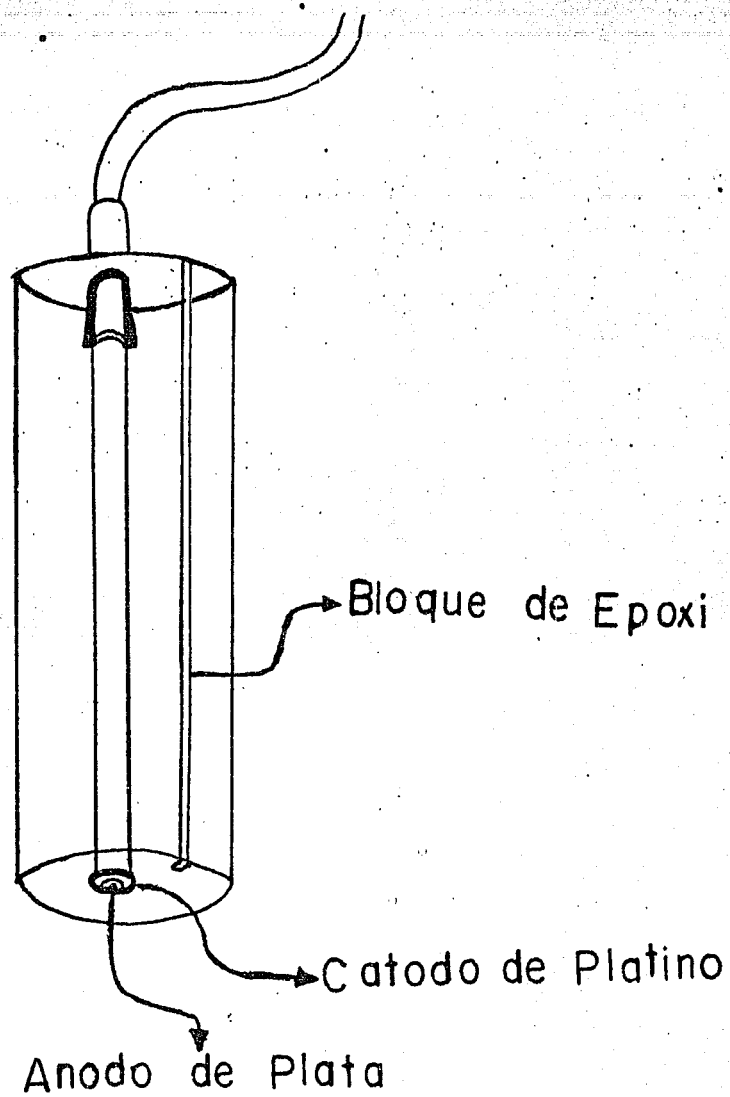


Figura 1. Representación esquemática del electródo de oxígeno tipo Clark.

## DETERMINACION DEL COCIENTE RESPIRATORIO Y LA RELACION ADP/O EN MITOCONDRIAS

Es bien conocido que la cadena de transporte de electrones procede a máxima velocidad sólo cuando el ADP, fosfatos y un sustrato oxidable están presentes en el medio (e. g. Lehniger, 1981; Stryer, 1979). Cuando el ADP no está presente, el consumo de oxígeno es muy bajo; a esta condición se le conoce como respiración de estado 4 o de reposo. Sin embargo, si se añade una cantidad conocida de ADP, el consumo de oxígeno se incrementa rápidamente al máximo debido a que el ADP está siendo fosforilado activamente a ATP; este estado es conocido como respiración activa o de estado 3. Cuando todo el ADP ha sido fosforilado, la velocidad de consumo de oxígeno retorna abruptamente a las condiciones de reposo. Este fenómeno, en el cual la velocidad en que trabaja la cadena de transporte de electrones es controlada por la concentración de ADP es llamado control respiratorio. El control respiratorio se define como la razón entre la respiración mitocondrial en condiciones de estado 3 y la respiración mitocondrial en condiciones de estado 4. Esta razón o cociente es en general superior a 4 en mitocondrias intactas y tiende a decrecer conforme las mitocondrias estén más desacopladas.

El cociente entre el número de moles añadidos de ADP y el oxígeno consumido durante la transformación del ADP en ATP se conoce como la relación ADP/O (ver figura 2). Esta debe tender a un valor de 2 para sustratos de sitio 2 y a 3 para sustratos de sitio 1.

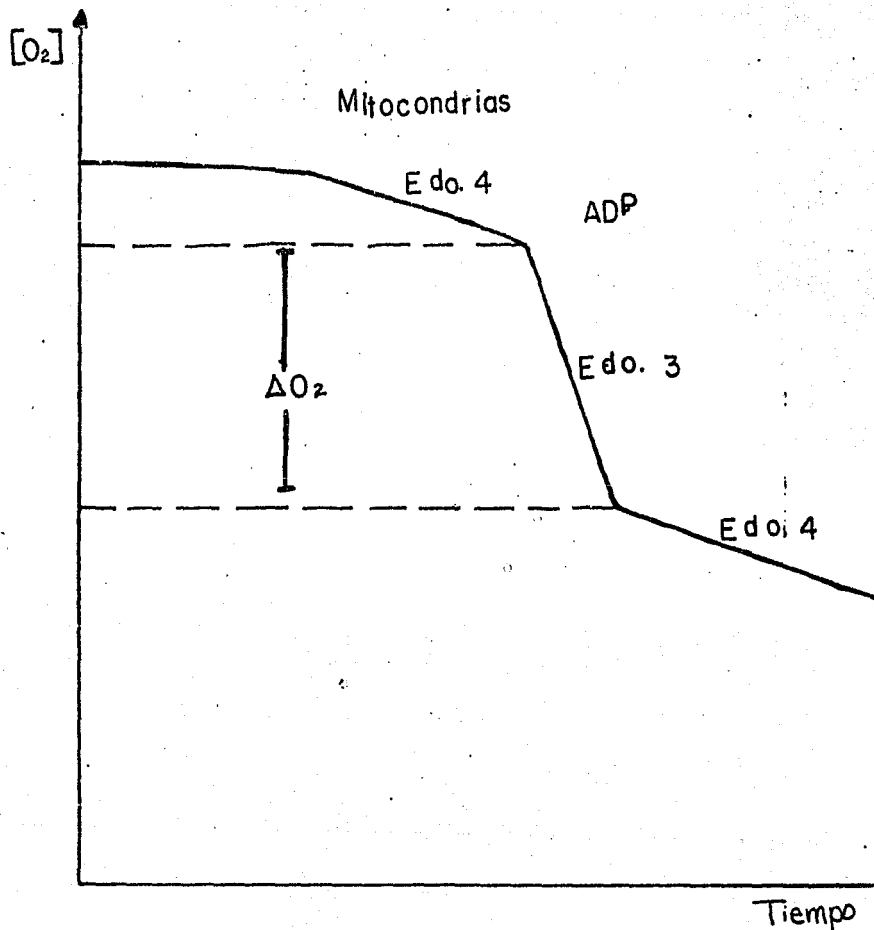


Figura 2. Trazo típico de consumo de oxígeno mitocondrial obtenido en el oxímetro, en el cual se muestra el procedimiento para determinar el control respiratorio y la relación ADP/O.

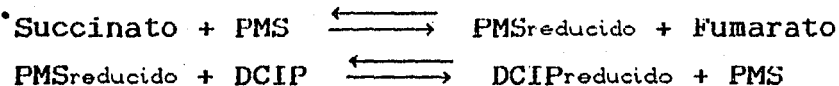
## APENDICE F

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA

La actividad de la succinato deshidrogenasa (succinato: DCIP oxido reductasa) se ensayo en este trabajo de acuerdo al método utilizado por Siess (1983a), determinándose espectrofotométricamente tal y como lo describen Arrigoni y Singer (1962).

Para ello, 0.5 mg de proteína mitocondrial (10 $\mu$ l) se diluyen en 90  $\mu$ l de 0.1% lubrol WX<sup>\*1</sup> en 20 mM de fosfato dibásico de potasio pH 7.0, con el objeto de permitir que el succinato tenga libre acceso a la enzima; el fosfato se añade porque es indispensable para activar la enzima. Una vez que la dilución de mitocondrias se ha llevado a homogeneidad, se toma una alicuota de 10  $\mu$ l y se transfieren a una celda de cuarzo de 250  $\mu$ l de capacidad, la cual contiene 10  $\mu$ l de DCIP (0.064%) más 120  $\mu$ l de 0.1% de lubrol en 20 mM de fosfato dibásico de potasio pH 7.0 y 10  $\mu$ l de KCN 15 mM; este último con la finalidad de evitar que la succinato deshidrogenasa ceda los electrones del succinato a la cadena respiratoria. Inmediatamente se añaden 10  $\mu$ l de succinato de sodio 400 mM pH 7.0 y 50  $\mu$ l de PMS<sup>\*2</sup> (1.32 mg/ml), homogeneizando rápidamente con la ayuda de una espatulilla. Se lee inmediatamente a 578 nm registrándose el curso de la reacción (ésta mantiene una velocidad constante durante aproximadamente un minuto).

La reacción que se lleva a cabo dentro de la celda es:



\*1 El lubrol WX es un detergente utilizado para romper membranas

\*2 PMS: fenazina metasulfato.

en la cual el DCIP fuertemente coloreado va perdiendo su coloración conforme este es reducido. El coeficiente de extinción molar del DCIP es  $100 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

El único factor limitante dentro del sistema es la cantidad de proteína mitocondrial, es decir, la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de proteína mitocondrial, y por supuesto, a su actividad específica.

## APENDICE G

### ACTIVIDAD DE ATPasa

La actividad de ATPasa se ensayó de acuerdo con el método utilizado por Chávez y Cuéllar (1984). Para ello 2 mg de proteína mitocondrial se incubaron durante 5 min. a 30°C en 2 ml de una solución hipotónica que contiene 7.5 mM Tris-HCl pH 7.4, 75 mM MgCl<sub>2</sub> y 109 μmolas de ATP pH 7.3; esto con el fin de romper la mitocondria y asegurar que la velocidad de hidrolisis del ATP este limitada unicamente por la actividad de la ATPasa, y no también por la actividad del translocador de adenín nucleótidos. En este caso el ATP acomplejado con Mg<sup>++</sup> es el sustrato de la reacción, la cual produce ADP-Mg<sup>++</sup> más fosfato, el cual se determina posteriormente una vez que la reacción ha sido detenida con 0.2 ml de ácido tricloroacético (30%).

El fosfato liberado se determinó esencialmente de acuerdo al método de Sumner (1944).



## APENDICE H

### ACTIVIDAD DE CITRULINOGENESIS

El ciclo de la urea dentro de la célula hepática puede representarse esquemáticamente como se muestra en la figura 1. En ella se puede observar que el ciclo se lleva a cabo dentro de 2 compartimentos celulares. Una primera fase comprende desde la entrada de ornitina a la mitocondria hasta la liberación de citrulina al citosol por parte de la misma, esta fase es altamente dependiente de energía y corresponde a la actividad de citrulinogénesis por parte de la mitocondria; y una segunda fase que se lleva a cabo dentro del citosol y que comprende la serie de reacciones que transforman la citrulina en argininosuccinato, arginina y finalmente ornitina y urea, y la cual no depende de energía.

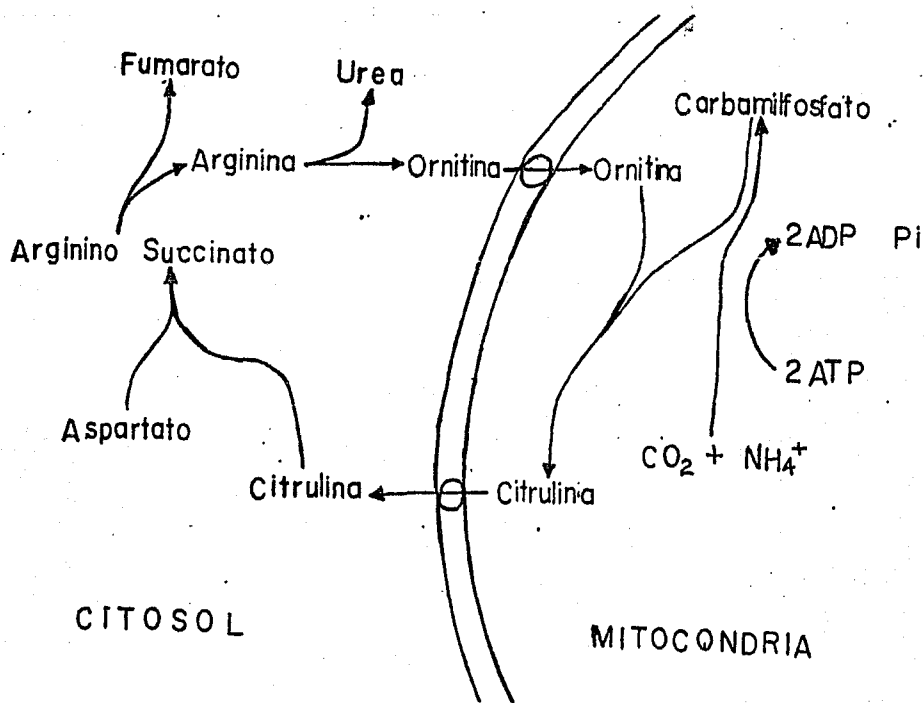


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de la Urea dentro de la célula hepática.

De esta manera tenemos entonces que la actividad de citrulinogénesis representa la fase mitocondrial del ciclo de la urea. Esta actividad se considera que está controlado casi exclusivamente por la carbamil fosfato sintetasa (Wander et. al., 1984b), ya que a concentraciones saturantes de amonio y ornitina, presenta un coeficiente de control de flujo coercano a 1 (ver apéndice I).

En este trabajo, la síntesis de citrulina se ensayo en un medio que contiene: 45 mg de proteína mitocondrial, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 16 mM  $\text{KHCO}_3$ , 1 mM EDTA, 10 mM ornitina, 10 mM succinato, 4  $\mu\text{g}$  rotenona, 25 mM manitol, 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 75 mM tris-HCl pH 7.4 a 25°C durante 10 min. La reacción se paró con 2 ml de ácido perclórico (6%), y la citrulina formada se determinó espectrofotométricamente a 530 nm. Para ello se incubó una alícuota de 0.1 ml con 3 ml de una solución que contiene 0.16% (P/V) de diacetil monóxido, 16.67% (V/V) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 13.33% (V/V) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y 0.16% (P/V) de  $\text{FeCl}_3$  durante 5 min a ebullición; posteriormente las muestras se enfrían y se determina su absorbancia a 530 nm.

## APENDICE I

### REGULACION METABOLICA

El control del metabolismo se realiza a nivel de la actividad enzimática. El funcionamiento de una enzima puede alterarse modificando el pH, la temperatura, las concentraciones de sustratos y productos o la concentración de la enzima misma (Moreno Sánchez, 1986). Además, ciertas enzimas pueden cambiar su actividad por la presencia de moduladores específicos (enzimas alostéricas). Por otra parte, el metabolismo celular también puede controlarse mediante señales externas como lo son los estímulos hormonales, ya que las hormonas a través de mecanismos covalentes y no covalentes pueden modificar la actividad enzimática y de esta manera influir en el metabolismo (para una revisión ver Villalobos Molina y Saavedra Molina, 1986). En la tabla I, se enumeran los mecanismos que modulan la actividad enzimática. De todos estos mecanismos, los cambios en las concentraciones de sustratos, productos o cofactores son más frecuentes, y como todos ellos son compartidos por diferentes vías, pueden considerarse como mecanismos de control. Además, el transporte de metabolitos de un compartimiento celular a otro puede modificar de manera importante las concentraciones relativas y, en consecuencia el flujo metabólico (Moreno Sánchez, 1986). Sin embargo, el cambio en la concentración de algún metabolito sólo puede alterar la actividad enzimática cuando está alrededor de la  $K_m$ , donde la velocidad varía proporcionalmente con la concentración de sustrato.

La célula modula principalmente la actividad metabólica mediante mecanismos más finos y efectivos, de tal forma que los cambios producidos en solo una o dos enzimas repercuten en el flujo total de la vía metabólica. Este tipo de enzimas llamadas reguladoras se han definido como aquellas cuyas propiedades son controladas por otros factores diferentes a las concentraciones de sustratos y productos, y las cuales son capaces de ejercer un

TABLA I  
MODULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA \*

---

MECANISMOS DE REGULACION NO COVALENTE

- i) Concentraciones de sustratos y productos.  
Compartimentalización.
- ii) Alosterismo (cooperatividad y modulación por moléculas pequeñas que se unen a sitios reguladores: ATP, ADP, NAD<sup>+</sup>, NADH, CoA, Acetil CoA, etc.).
- iii) Interacciones proteína-proteína (polimerización de subunidades ty agregación específica en complejos multienzimáticos).
- iv) Temperatura, pH y fuerza iónica.

MECANISMOS DE REGULACION COVALENTE

- i) Fosforilación-desfosforilación.
  - ii) Transformaciones irreversibles (conversión de zimógenos en las formas activas mediante proteólisis limitada).
  - iii) Síntesis y degradación de enzimas.
- 

\* Modificado de Moreno Sanchez, 1986.

control significativo sobre las vías metabólicas (Rolleston, 1972). En la literatura se han utilizado otras acepciones como enzima marcapaso, etapa limitante, enzima clave o "cuello de botella", pero todas ellas implican una restricción exclusiva al control del flujo, lo cual no siempre sucede.

En términos generales, existe una serie de criterios utilizados para definir qué enzimas determinan el flujo de una vía metabólica (tabla II). Desde un punto de vista teleológico, el control debe ocurrir al inicio de la vía o después de una ramificación, para así evitar la existencia de segmentos largos no controlados del metabolismo y para obtener máxima economía. El uso de este enfoque no requiere experimentación sino simple inspección de la vía; sin embargo, en todas las rutas metabólicas estudiadas esta suposición teleológica ha encontrado validez experimental.

El enfoque experimental mostrado en la tabla II analiza las propiedades de las enzimas y de las reacciones de la vía. Los primeros 2 criterios consideran aspectos termodinámicos, donde aquellas enzimas que catalizan reacciones alejadas del equilibrio se clasifican como reguladoras.

#### REACCIONES ALEJADAS DEL EQUILIBRIO

Si suponemos que una vía metabólica alcanza el equilibrio termodinámico, la constante de acción de masas:

$$K_{AM} = \frac{[\text{productos}]}{[\text{sustratos}]}$$

de cada reacción será igual a la constante termodinámica de equilibrio  $K_{eq}$ , y por lo tanto no existiría flujo neto. Para obtener flujo a través de la vía, por lo menos una de las reacciones debe estar desplazada del equilibrio de modo que la constante de acción de masas sea menor que la constante de equilibrio. La amplitud del desplazamiento del equilibrio determinará la magnitud de la energía libre que impulsará la reacción hacia la formación del producto.

TABLA II  
CRITERIOS ESPERIMENTALES PARA LA IDENTIFICACION DE ENZIMAS QUE  
DETERMINAN EL FLUJO DE LAS VIAS METABOLICAS

---

I. Identificación de reacciones alejadas del equilibrio:

$$\frac{K_{AM}}{K_{eq}} > 0.2$$

$K_{AM} \equiv$  constante de acción de masas  
 $K_{eq} \equiv$  constante de equilibrio

- II. Identificación de los puntos de entrecruzamiento.
- III. Determinación de las capacidades enzimáticas relativas (enzimas lentas y rápidas).
- IV. Identificación y análisis de enzimas alostéricas:
- Tipo de cooperatividad.
  - Moduladores alostéricos fisiológicos.
- V. Forma de la curva de inhibición: enzimas limitantes y en exceso.
- VI. Determinación de los coeficientes de control de flujo.
- 

\* Modificado de Moreno Sanchez, 1986.

El desplazamiento del equilibrio se distribuye entre las diferentes etapas de la vía metabólica de tal forma que siempre hay algunas de estas etapas funcionando más alejadas del equilibrio. Entonces las enzimas que catalizan las reacciones más cercanas al equilibrio deben poseer suficiente capacidad catalítica para poder igualar las velocidades de ida y vuelta, por lo cual no pueden ser consideradas como limitante del flujo a través de la vía. Así el control del metabolismo mediante la alteración de una enzima debe ejercerse principalmente en aquellas reacciones más alejadas del equilibrio. Sin embargo, una enzima que cataliza una reacción que tiende al equilibrio puede llegar a convertirse en una enzima limitante si ocurre una fuerte inhibición específica de su actividad (Rolleston, 1972; Moreno Sanchez, 1986).

Mediante la utilización de este criterio para la identificación de etapas de control se ha señalado que el ciclo de Krebs es controlado por la piruvato deshidrogenasa, citrato sintetasa, isocitrato deshidrogenasa,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil CoA sintetasa y succinato deshidrogenasa (Krebs, 1969) y la fosforilación oxidativa por el translocador de adenín nucleótidos (Wanders et. al., 1981) o por la citocromo oxidasa (Erecinska y Wilson, 1982).

Por otro lado, la evaluación de una reacción en desequilibrio consiste en comparar el valor de la  $K_{eq}$  con la relación de masas  $K_{AM}$  determinada experimentalmente durante el funcionamiento de la vía en estado estacionario. Rolleston (1972) sugirió un valor menor de 0.2 del cociente  $[K_{AM}]/[K_{eq}]$  para clasificar a una reacción como alejada del equilibrio, pues este valor corresponde a una velocidad de la reacción inversa ( $V_{-1}$ ) menor al 20% de la velocidad de la reacción directa.

#### CAPACIDADES ENZIMATICAS RELATIVAS

Se espera que las enzimas que pueden regular el flujo metabólica posean las capacidades catalíticas más bajas con respecto al resto de las enzimas de la vía, pues de acuerdo con

los dos criterios anteriores, en las reacciones alejadas del equilibrio y en los puntos de entrecruzamiento se encuentran las enzimas reguladoras. Así, este enfoque se ocupa de determinar *in vitro* las propiedades cinéticas de cada enzima de una vía metabólica, después de su extracción y purificación. De esta manera, se han observado en la fosforilación oxidativa cuatro enzimas lentas con actividades menores a  $1 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ : el translocador de adenín nucleótidos, la ATP sintetasa, el acarreador de fosfatos y el acarreador de dicarboxilatos.

Sin embargo, existen algunos problemas con este enfoque: el ensayo de la actividad enzimática requiere la ruptura del tejido, la extracción y dilución de la enzima y finalmente, para la determinación de la actividad, la incubación en condiciones completamente artificiales. Muchas enzimas pueden aumentar o disminuir su actividad durante el proceso de extracción. Además, las velocidades máximas calculadas no necesariamente reflejan la situación fisiológica del funcionamiento enzimático, pues en la célula intacta, las enzimas difícilmente trabajan a concentraciones saturantes de sustrato y en ausencia total de producto (Moreno Sanchez, 1986).

#### FORMA DE LA CURVA DE INHIBICION.

Otro de los criterios utilizados en el estudio de la regulación metabólica es el de las curvas de inhibición de la vía usando inhibidores específicos de cada enzima. El razonamiento es que si el inhibidor actúa sobre una enzima con elevada capacidad y/o cataliza una reacción cercana al equilibrio, entonces sólo habrá poco o nulo efecto sobre el flujo total aún cuando disminuya la actividad de la enzima. Conforme la concentración del inhibidor aumenta, esta enzima eventualmente se convertirá en la etapa más lenta de la vía y entonces habrá proporcionalidad entre el flujo e incrementos en la cantidad de inhibidor. Por otro lado, si el inhibidor actúa sobre una enzima lenta, aún la más baja concentración de inhibidor disminuirá el flujo de la vía



metabólica (Rongstad, 1979F). En otras palabras, una enzima se clasifica como reguladora si se observa una relación lineal en la curva de titulación con inhibidor y no reguladora si la curva es sigmoidea. El "exceso" de enzima se determina por la cantidad de inhibidor necesario para provocar una disminución significativa del flujo metabólico.

#### DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE CONTROL DE FLUJO

La discusión de los apartados anteriores sugiere que las enzimas reguladoras pueden ser identificadas como aquéllas que satisfacen diversos criterios, los cuales están directamente relacionados a la forma de medición; sin embargo, no es clara cuál es la conexión teórica de esos criterios entre sí. Clasificar una enzima como reguladora, solo ofrece un término estrictamente cualitativo y empírico; esta terminología y el desarrollo conceptual de las secciones anteriores, no establece cómo las enzimas podrían controlar el flujo metabólico ni tampoco aclara cuál es la importancia relativa de cada etapa. Implícitamente se supone que al señalar una enzima como reguladora, ésta controla totalmente el flujo metabólico. En la literatura también se discute en este sentido cuál es el factor determinante en la velocidad de flujo, si la actividad de alguna de las enzimas de la vía o la disponibilidad de 3 sustratos y cofactores, aunque más bien parecería absurdo sugerir que alguna de estos factores no intervienen o influyen sobre el flujo metabólico. Más aún, las cuestiones de si todos los factores son igualmente importante en el control de una vía metabólica, la definición de importancia y los criterios necesarios para evaluarla no son contestados con precisión usando los criterios discutidos hasta ahora.

En un intento por responder a estas incógnitas y formalizar el análisis de la regulación metabólica, Kacser y Burns (1973, 1979, 1983) en Escocia y Heinrich y Rapoport (1974a, 1974b 1975, 1977) en Alemania Democrática, desarrollaron en forma independiente una teoría cuantitativa de control que sintetiza

mucha de la información disponible. El análisis de estos autores propone que las variables de una vía metabólica son los niveles de metabolitos; en el estado estacionario, las concentraciones de los intermediarios no varían con el tiempo, puesto que cada uno de ellos ha alcanzado un balance de formación y remoción que depende de la actividad de todas las enzimas; por esto las concentraciones de los intermediarios y los flujos están determinados por los parámetros del sistema. El flujo es una propiedad sistémica pues la actividad de una enzima a cero resulta en la anulación de la vía y las cuestiones acerca de su regulación no pueden ser contestadas estudiando una etapa aislada; los parámetros del sistema están representados por las constantes enzimáticas determinadas genéticamente como constante de Michaelis  $K_m$ , la constante catalítica  $K_{cat}$ , las constantes de inhibición  $K_i$ , etc. Existen además restricciones termodinámicas representadas por la constante de equilibrio de una reacción. La cantidad y la actividad de las enzimas y las condiciones del medio también son parámetros del sistema, al menos en la mayoría de los experimentos.

Aunque en ciertas condiciones todas las enzimas pueden ser iguales, no lo son necesariamente en el efecto que tendría una variación de sus actividades sobre el flujo. Es posible estimar este efecto induciendo un pequeño cambio en una de las enzimas y expresando esto como un cambio fraccional en su actividad  $\delta E_i/E_i$ , donde  $E_i$  es la actividad de la enzima. Este cambio en la actividad puede deberse a un cambio en la concentración de la enzima, número de recambio u otras constantes cinéticas, o sea, un cambio en la concentración de enzima activa. Debido al cambio inducido se establecerá un nuevo estado estacionario con un flujo diferente, el cual se puede expresar como  $\delta F/F$ . La comparación de estas 2 medidas, representa cómo el cambio inducido en la enzima afecta al flujo.

$$\frac{\delta F}{F} = C_i \frac{\delta E_i}{E_i}$$

La constante de proporcionalidad ( $C_i$ ) describe cuantitativamente cuán sensible es el flujo a cambios en una de las enzimas de la vía y fue denominado como coeficiente de control de flujo (Burns et. al., 1985).

El coeficiente  $C_i$  puede tomar cualquier valor entre 0 y 1. Es obvio que una enzima cuyo coeficiente de control de flujo sea cercano a 1 es considerablemente más importante en la regulación del flujo metabólico que otra enzima con un coeficiente cercano a cero en donde alteraciones importantes en la actividad de la enzima se reflejan de manera imperceptible sobre el flujo neto de la vía. Los valores particulares de cada coeficiente dependerán de la proporción de equilibrio de cada reacción ( $K_{AM}/K_{eq}$ ), de la concentración efectiva de cada enzima y de su constante catalítica en comparación con las demás, del grado de saturación y de la influencia de los diversos efectores. Por lo tanto, no hay únicamente dos clases de enzimas, reguladoras y no reguladoras, sino que el control es compartido entre todas las enzimas que constituyen la vía.

## REFERENCIAS

- Arrigoni O y Singer TP (1962). Limitations of the phenazine methosulphate assay for succinic and related dehydrogenases. *Nature* 193: 1256-1258.
- Baraona E, Leo MA, Borowsky SA y Lieber CS (1975). Alcoholic hepatomegaly: Accumulation of protein in the liver. *Science* 190: 794-795.
- Baraona E y Lieber CS (1979). Effects of ethanol on lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 20: 289-315.
- Baum-Baicker C (1985). The health benefits of moderate alcohol consumption: a review of the literature. *Drug and Alcohol Dependence* 15: 207-227.
- Bernstein JD y Penniall R (1978). Effects of chronic ethanol treatment upon rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2337-2342.
- Best CH, Hartroft WS, Lucas CC y Ridout JH (1949). Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline. *Brit. Med. J.* 2: 1001-1006.
- Bottenus RE, Spach PI, Filus S y Cunningham CC (1982). Effect of chronic ethanol consumption on energy-linked processes associated with oxidative phosphorylation: proton translocation and ATP-P<sub>i</sub> exchange. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105(4): 1368-1373.
- Boyde TRC y Rahmatullah M (1980). Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* 107: 424-431.
- Burns JA, Conish-Bowden A, Groen AK, Heinrich R, Kacser H, Porteous JW, Rapoport SM, Rapoport TA, Stucki JW, Tager JM, Wanders RJA y Westerhoff HV (1985). Control analysis of metabolic systems. *Trends Biochem. Sci.* 10 (1): 16.
- Cederbaum AI, Lieber CS, Toth A, Beattie DS y Rubin E (1973). Effects of ethanol and fat on the transport of reducing

- equivalents into rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 248(14): 4977-4986.
- Cederbaum AI, Lieber CS y Rubin E (1974a). Effects of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions damage to coupling site I. *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 560-569.
- Cederbaum AI, Lieber CS y Rubin E (1974b). The effect of acetadehyde on mitochondrial function. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 26-39.
- Cederbaum AI y Rubin E (1975). Molecular injury to mitochondria produced by ethanol and acetaldehyde. *Fed. Proc.* 34(11): 2045-2051.
- Cedebaum AI, Lieber CS y Rubin E (1976). Effects of chronic ethanol consumption and acetaldehyde on partial reactions of oxidative phosphorylation and CO<sub>2</sub> production from citric acid cycle intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 176: 525-538.
- Cleland KW y Slater EC (1953). Respiratory granules of heart muscle. *Biochem. J.* 53: 547-556.
- Consejo Nacional Antialcohólico (1985). Programa contra el alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas. Secretaría de Salud, Consejo Nacional Antialcohólico e Instituto Mexicano de Psiquiatría (eds). México. 111 pp.
- Cooper TG (1979). *The Tools of Biochemistry.* Cap. 2: Spectrophotometry. Wiley & Sons. New York. pp. 36-64.
- Cornell NW, Hansch C, Kim KH y Henegar K (1983). The inhibition of alcohol dehydrogenase in vitro and in isolated hepatocytes by 4-substituted pyrazoles. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 81-90.
- Corvera S y García-Saínz JA (1982). Vasopressin and angiotensin II stimulate ureogenesis through increased mitochondrial citrulline production. *Life Sci.* 31:2493-2498.
- Chaffee RRJ, Salganicoff L, Arine RM, Rochelle RH y Schultz EL (1977). Polyamine effects on succinate-linked and  $\alpha$ -ketoglutarate-linked rat liver mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77(3): 1009-1016.
- Chávez E y Cuéllar A (1984). Inactivation of mitochondrial ATPase

- by ultraviolet light. Arch. Biochem. Biophys. 230: 511-516.
- Chávez E, Bravo C y Jay D (1986). On the role of  $K^+$  on succinic dehydrogenase activity. J. Bioenergetics and Biomembranes 18(2): 93-99.
- Dawes EA (1980). Quantitative problems in Biochemistry. Cap. 8: Oxidation-reduction potentials. Sexta Edición. Longman. London. pp. 199-225.
- Dawidowicz EA (1985). The effects of ethanol on membranes. Hepatology 5(4): 697-699.
- Denney RC y Johnson R (1984). Nutrition, alcohol and drug abuse. Proc. Nutr. Soc. 43: 265-270.
- Drahota Z, Carafoli E, Rossi CS, Gamble RL y Lehninger AL (1965). The steady state maintenance of accumulated  $Ca^{++}$  in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 240(6): 2712-2720.
- Elliot CR, Prasad JS, Husby AD, Ellingson RJ, Holtzman JL y Crankshaw DL (1985). Effects of chronic ethanol consumption on male syrian hamster hepatic microsomal mixed-function oxidases. Alcohol. 2: 17-22.
- Escotto Velázquez J (1977). Aparato digestivo y alcoholismo. Rev. Fac. Med. Méx. 20(11): 18-28.
- Estabrook RW (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. En: Estabrook RW y Pullman Me (eds). Methods in Enzymology, Vol. X: Oxidation and phosphorylation. Academic Press. New York. pp. 41.
- French SW (1968). Fragility of liver mitochondria in ethanol-fed rats. Gastroenterol. 54(6): 1106-1114.
- French SW y Morrin RJ (1969). Mitochondrial injury in experimental chronic ethanol ingestion. En: Sardesi VM (ed). Biochemical and clinical aspects of alcohol metabolism. Thomas. Springfield, Il. U.S.A.. pp. 123-132.
- Gordon ER, Rochman J, Arai M y Lieber CS (1982). Lack of correlation between hepatic mitochondrial membrane structure and functions in ethanol-fed rats. Science 216: 1319-1321.
- Gornall AG, Bardawill CJ y David MM (1949). Determination of serum

proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.

Groen AK, Wanders RJA, Westerhoff HV, van der Meer R y Tager JM (1982). Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 257: 2754-2757.

Heinrich R, Rapoport SM y Rapoport TA (1977). Metabolic regulation and mathematical models. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 32: 1-82.

Heinrich R y Rapoport TA (1975). Mathematical analysis of multienzyme systems. II: Steady state and transient control. *Biosystems* 7: 130-136.

Heinrich R y Rapoport TA (1974a). A linear steady-state treatment of enzymatic chains. *Eur. J. Biochem.* 42: 89-95.

Heinrich R y Rapoport TA (1974b). Critique of the crossover theorem and a general procedure to identify interactions sites within effectors. *Eur. J. Biochem.* 42: 97-105.

Iseri OA, Gottlieb LS y Lieber CS (1964). Ultrastructure of ethanol-induced fatty liver. *Fed. Proc.* 23: 579.

Iseri OA, Lieber CS y Gottlieb LS (1966). The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Amer. J. Pathol.* 48(4): 535-555.

Israel Y, Videla L, MacDonald A y Bernstein J (1973). Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol administration: comparison between the effects produced by ethanol and by thyroid hormones. *Biochem. J.* 134: 523-529.

Israel Y, Videla L y Bernstein L (1975). Liver hypermetabolic state after chronic ethanol consumption: Hormonal interrelations and pathogenic implications. *Fed. Proc.* 34(11): 2052-2059.

Julián-Sánchez A, Guzmán-Toledo E, Riveros-Rosas H y Piña-Garza E (1987). Regulación de la respiración mitocondrial en el estado 4. En: VI Reunión de alumnos de maestría y doctorado en biomedicina. 29-30 Oct. Fac. de Medicina, UNAM. México. p. 29.

Kacser H y Burns JA (1973). The control of flux. *Symp. Soc. Exp.*

Biol. 27: 65-104.

Kacser H y Burns JA (1979). Molecular democracy: Who shares the control? Biochem. Soc. Trans. 7: 1149-1160.

Kacser H (1983). The control of enzyme systems *in vivo*. Biochem. Soc. Trans. 11: 35-40.

Kelbach WK (1974). Organic pathology related to volume and pattern of alcohol use. En: Gibbins RJ, Israel Y, Kalant H, Popham RE, Schmidt W y Smart RG (eds). Research advance in alcohol and drug problems. Wiley. New York. pp. 93-198.

Keyser JW y Vaughn J (1949). Turbidities in the estimation of serum proteins by the biuret method. Biochem. J. (Proceedings of the Biochemical Society) 44: XX11.

Kiessling KH y Tobé U (1964). Degeneration of liver mitochondria in rats after prolonged alcohol consumption. Exp. Cell Res. 33: 350-354.

Koch OR, Boveris A y stoppani AOM (1977). Mitochondrial injury in experimental chronic alcoholism. En: Thurman RG, Williamson JR, Drott HR y Chance B (eds). Alcohol and aldehyde metabolizing systems. Vol II: Enzymology and subcellular organelles. Academic Press. New York. pp. 441-450.

Krebs HA (1967). Role of the redox state of nicotinamide adenine dinucleotides in the regulation of metabolic processes. Nat. Cancer Inst. Monogr. 27: 331-343.

Krebs Ha (1969). The role of equilibria in the regulation of metabolism. Curr. Top. Cell Reg. 1: 44-55.

La Droitte P, Lamboeuf Y y de Saint Blanquat G (1984). Membrane fatty acid changes and ethanol tolerance in rat and mouse. Life Sciencies 35: 1221-1229.

Lehninger AL (1981). Biochemistry. Segunda edición. Worth Publishers, Inc. New York. 1104 pp.

Lemasters JJ y Hackenbrock CR (1980). The energized state of rat liver mitochondria: ATP equivalence, uncoupler sensitivity and decay kinetics. J. Bio. Chem. 255(12): 5674-5680.

Lieber CS, Jones DP, Mendelson J et. al. (1963). Fatty liver,



- hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption despite adequate dietary intake. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 76: 289-300.
- Lieber CS, Jones DP y DeCarli LM (1965). Effects of prolonged ethanol intake: Production of fatty liver despite adequate diets. *J. Clin. Invest.* 44(6): 1009-1021.
- Lieber CS y Rubin E. (1968). Alcoholic fatty liver in man on a high protein and low fat diet. *Am. J. Med.* 44: 200-206.
- Lieber CS y DeCarli LM (1968). Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. *Science* 162: 917-918.
- Lieber CS y DeCarli LM (1970). Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: in vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 245: 2505-2512.
- Lieber CS (1977). Metabolism of ethanol. En: Lieber CS (ed). *Metabolic aspects of alcoholism.* University Park Press. Baltimore. pp. 1-29.
- Lieber CS y DeCarli LM (1977). Metabolic effects of alcohol on the liver. En: Lieber CS (ed). *Metabolic aspects of alcoholism.* University Park Press. Baltimore. p. 32.
- Lieber CS y DeCarli LM (1982). The feeding of alcohol in liquid diets: Two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 6(4):523-531.
- Lieber CS (1984). Alcohol and the liver: 1984 update. *Hepatology* 4(6): 1243-1260.
- Masini A, Ceccarelli-Stanzani D y Muscatello U (1983). Phosphorylating efficiency of isolated rat liver mitochondria respiring under the conditions of steady-state 4. *Biochim. Biophys. Acta* 724: 251-257.
- Matsuzaki S, Gordon E y Lieber CS (1981). Increased alcohol dehydrogenase independent ethanol oxidation at high ethanol concentrations in isolated rat hepatocytes: The effect of chronic ethanol feeding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217(1): 133-137.

- Mezey E (1985). Metabolic effects of alcohol. Fed. Proc. 44(1: pt 1): 134-138.
- Moreno Sánchez R (1986). Teoría del control metabólico. Mensaje Bioquímico 8: 98-143.
- Mørland J, Rothschild MA, Oratz M, Mongelli J, Donor D y Schreiber SS (1981). Protein secretion in suspensions of isolated rat hepatocytes: No influence of acute ethanol administration. Gastroenterol. 80: 159-165.
- Morrison RT y Boyd RN (1983). Química orgánica. Cap.33: Grasas. Fondo Educativo Interamericano. México. pp. 1081-1096.
- Piña-Garza E, García-Sainz A y Chagoya de Sanchez V (1983). Etanol: catabolismo y efectos metabólicos. Gaceta Médica de México 119(1): 1-11.
- Plapp BV, Leidal KG, Smith RK y Murch BP (1984). Kinetics of inhibition of ethanol metabolism in rats and the rate-limiting role of alcohol dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 230(1): 30-38.
- Prasad JS, Crankshaw DL, Erickson RR, Elliott CE, Husby AD y Holtzman JL (1985). Studies on the effect of chronic consumption of moderate amounts of ethanol on male rat hepatic microsomal drug-metabolizing activity. Biochem. Pharmacol. 34(19): 3427-3431.
- Raison JK (1972). The influence of temperature induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems. Bioenergetics 4: 559-583.
- Rao GA y Larkin EC (1985). Inadequate intake by growing rats of essential nutrients from liquid diets used for chronic alcohol consumption. Nutrition Res. 5: 789-796.
- Rawat AK y Kuriyama K (1972a). Contribution of "substrate shuttles" in the transport of extramitochondrial reducing equivalents by hepatic mitochondria from chronic alcohol-fed mice. Arch. Biochem. Biophys. 152: 44-52.
- Rawat AK y Kuriyama K (1972b). Contribution of "substrate shuttles" in hepatic alcohol metabolism in chronic alcoholism. Biochem.

- Biophys. Res. Commun. 47(2): 517-523.
- Reed WD y Mezey E (1972). Effects of chronic ethanol feeding on enzymes of rat brain and live mitochondria. Life Sciences 11(pt II): 847-857.
- Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Guzmán-Toledo E y Piña-Garza E (1987). Regulación de la respiración mitocondrial en el estado 4. En: V Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica AC. Nov. 29 a Dic. 3, Metepec, Puebla. México. p. 33.
- Rolleston FS (1972). A theoretical background in study of the control of intermediary metabolism. Curr. Top. Cell Reg. 5: 47-75.
- Rongstad R (1979). Rate-limiting steps in metabolic pathways. J. Biol. Chem. 254: 1875-1878.
- Rottenberg H, Robertson DE y Rubin E (1980). The effect of ethanol on the temperature dependence of respiration and ATPase activities of rat liver mitochondria. Lab. Invest. 42(3): 318-325.
- Rouach H, Clement M, Orfanelli MT, Janvier B y Nordmann R (1984). Fatty acid composition of rat liver mitochondrial phospholipids during ethanol inhalation. Biochim. Biophys. Acta 795: 125-129.
- Rovinski B, Hosein EA y Lee H (1984). Effect of maternal ethanol ingestion during pregnancy and lactation on the structure and function of the postnatal rat liver plasma membrane: Assessment with [<sup>3</sup>H]prazosin binding to the hepatic  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. Biochem. Pharmacol. 33(2): 311-317.
- Schilling RJ y Reitz RC (1980). A mechanism for ethanol-induced damage to liver mitochondrial structure and function. Biochim. Biophys. Acta 603: 266-277.
- Schneider WC y Hogeboom GH (1950). Intracellular distribution of enzymes. V: Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J. Biol. Chem. 183: 123-128.
- Schneider DL y Manara S (1985). Alcohol ingestion alters the

- proton pump activity of rat liver: Decreased activity in  
 lisosomes parallels the presence of activity in plasma  
 membranes. *Research Communications in substances of abuse*  
 6(2): 117-126.
- Schuckit MA (1979). Overview of alcoholism. *J. Am. Dent. Ass.* 99:  
 489-493.
- Segel IH (1975). *Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid  
 equilibrium and steady-state enzyme systems. Cap. 7: Multisite  
 and allosteric enzymes.* Wiley-Interscience. New York. pp.  
 346-464.
- Siess EA (1983a). Influence of isolation media on the preservation  
 of mitochondrial functions. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*  
 364: 279-290.
- Siess EA (1983b). Different actions of mono- and disaccharides on  
 rat liver mitochondria. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364:  
 835-838.
- Singer TP, Kearney EB y Kenney WC (1973). Succinate dehydrogenase.  
*Adv. Enzymol.* 37: 184-272.
- Sorrel MF y Tuma DJ (1985). Hypothesis: Alcoholic liver injury and  
 the covalent binding of acetaldehyde. *Alcoholism: Clin. Exp.  
 Res.* 9(4): 306-309.
- Spach PI, Parce JW y Cunningham CC (1979). Effect of chronic  
 ethanol administration on energy metabolism and phospholipase  
 A<sub>2</sub> activity in rat liver. *Biochem. J.* 178: 23-33.
- Spach PI, Bottenus RE y Cunningham CC (1982). Control of adenine  
 nucleotide metabolism in hepatic mitochondria from rats with  
 ethanol-induced fatty liver. *Biochem. J.* 202: 445-452.
- Stubbs M (1976). The effect of ethanol on ammonia metabolism. En:  
 Grisolia S, Bagnena R y Major F (eds). *The urea cycle.* Wiley.  
 New York. pp. 469-478.
- Stryer L (1979). *Bioquímica.* Reverté. Barcelona. 876 pp.
- Sun GY y Sun AY (1985). Ethanol and membrane lipids. *Alcoholism:  
 Clin. Exp. Res.* 9(2): 164-180.
- Swierczynski J y Davis EJ (1978). Activation of succinate

- dehydrogenase by bicarbonate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85(3): 1173-1179.
- Thayer WS y Rubin E (1979). Effects of chronic ethanol intoxication on oxidative phosphorylation in rat liver submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 254(16): 7717-7723.
- Thayer WS y Rubin E (1981). Molecular alterations in the respiratory chain of rat liver after chronic ethanol consumption. *J. Biol. Chem.* 256(12): 6090-6097.
- Thurman RG, McKenna WR y McCaffrey TB (1976). Pathways responsible for the adaptive increase in ethanol utilization following chronic treatment with ethanol: Inhibitors studies with the hemoglobin-free perfused rat liver. *Mol. Pharmacol.* 12: 156-166.
- Thurman RG y Scholz R (1977). Interaction of glycolysis and respiration in perfused rat liver. Changes in oxygen uptake following the addition of ethanol. *Eur. J. Biochem.* 75: 13-21.
- Tremolieres J, Lowy R y Griffaton G (1973). The metabolic basis of ethanol toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 35: 125-143.
- Väänänen H y Lindros KO (1985). Comparison of ethanol metabolism in isolated periportal or perivenous hepatocytes: Effects of chronic ethanol treatment. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 9(4): 315-321.
- Velazco-Fernandez R (1986). Alcohol and alcohol problems, research 7: Latin America. *British Journal of Addictions* 81: 11-15.
- Victor M y Adams RD (1980). Alcohol. En: Isselbacher KJ, Adams RD, Braunwald E, Petersdorf RG y Wilson JD (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Novena edición. McGraw-Hill. U.S.A.. pp. 969-977.
- Videla L e Israel Y (1970). Factors that modify the metabolism of ethanol in rat liver and adaptive changes produced by its chronic administration. *Biochem J.* 118: 275-281.
- Videla L, Bernstein J e Israel Y (1973). Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol administration:

- Increased oxidative capacity. *Biochem J.* 134: 507-514.
- Villalobos Molina R y Saavedra Molina A (1986). Regulación enzimática del metabolismo. *Mensaje Bioquímico* 8: 145-167.
- Wanders RJA, Groen AK, Van Roermund CWT y Tager JM (1984a). Factors determining the relative contribution of the adenine-nucleotide translocator and the ADP-regenerating systems to the control of oxidative phosphorylation in isolated rat-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 142: 417-424.
- Wanders RJA, Van Roermund CWT y Meijer AJ (1984b). Analysis of the control of citrulline synthesis in isolated rat-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 142: 247-254.
- Whittaker PA y Danks EM (1982). *Mitocondria: Estructura, función y formación.* Cap. 1: Organización funcional de las mitocondrias. CECSA. México. pp. 24-32.
- Williamsom JR, Scholz R, Browning ET, Thurman RG y Fukami MH (1969). Metabolic effects of ethanol in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 244(18): 5044-5054.
- Yamane T (1973). *Statistics: an introductory analysis.* Tercera edición. Harper. New York. 1130 pp.
- Yellow Springs Instrument (1980). *Instruction book for YSI model 53 biological oxygen monitor.* Yellow Springs Instrument Co. Inc.: Scientific division. Ohio, U.S.A.. 16 pp.
- Zentella de Piña M y Piña Garza E (1987). Metabolitos del etanol. *Mensaje Bioquímico* 10: 143-175.
- Zentella de Piña M, Villalobos-Molina R, Saavedra-Molina A, Riveros-Rosas H y Piña E (1988). Effects of moderate chronic ethanol consumption on rat liver mitochondrial functions. *Alcohol* (sometido a publicación).