



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LAS PURINAS  
DURANTE LA INTOXICACION AGUDA Y CRONICA  
CON ETANOL EN LAS RATAS"**

**TESIS**

**NORMA SILVIA SANCHEZ SANCHEZ**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**1989**



TESIS CON  
FALSA LE ORGEN



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.

## I N D I C E

	página
1. Objetivo General	1
2. Introducción	2
2.1 Aspectos generales sobre la intoxicación con etanol	2
2.1.1. Efectos del etanol en el organismo	2
a) Sistema Nervioso Central	3
b) Hígado	4
c) Páncreas	5
d) Sistema cardiovascular	6
e) Riñón	6
f) Efectos endócrinos	6
g) Efectos hematopoyéticos	7
h) Sistema inmunológico	7
i) Alteraciones nutricionales	8
2.2. Metabolismo del etanol	9
2.2.1. Alcohol Deshidrogenasa	9
2.2.2. Catalasa	10
2.2.3. MEOS	11
2.3. Generalidades sobre el metabolismo de purinas	13
2.4. Adenosina	17
2.4.1. Efectos neuronales	17
2.4.2. Efectos cardiovasculares	17
2.4.3. Efectos sobre acciones hormonales	17
2.4.4. Efectos citotóxicos	18

2.4.5. Acciones bioquímicas	18
2.5. Metabolismo de la adenosina	21
2.5.1. 5'-Nucleotidasa	23
2.5.2. S-Adenosil-Homocisteína-hidrolasa	25
2.5.3. Adenosina Kinasa	27
2.5.4. Adenosina Deaminasa	28
2.5.5. Xantina Oxidasa	31
3. Materiales y Métodos	38
3.1. Modelo Experimental	38
A. Modelo Agudo	38
B. Modelo Crónico	39
3.2. Determinaciones enzimáticas	40
3.2.1. 5'-Nucleotidasa y adenosina deaminasa	40
3.2.2. Adenosina kinasa	41
3.2.3. S-Adenosil-Homocisteína-Hidrolasa	41
3.2.4. Xantina oxidasa	43
3.3. Otros ensayos experimentales	44
3.3.1. Determinación de proteínas	44
3.3.2. Efecto del etanol "in vivo" en sangre y rebanadas de hígado sobre la degradación de purinas	44
3.3.3. Efecto de la adenosina "in vitro"	47
3.3.4. Efecto del etanol adicionado "in vitro"	47
3.4. Cálculos	48
4. Resultados	52
4.1. Metabolismo de adenosina, modelo agudo, experimentos "in vivo"	52

4.2. Metabolismo de adenosina, modelo crónico, experimentos "in vivo"	54
4.3. Optimización experimental de la determinación enzimática de la xantina oxidasa	57
4.4. Resultados de la determinación de xantina oxidasa	69
4.4.1. Formación de ác. úrico, modelo agudo, experimentos "in vivo"	69
4.4.2. Determinación de NADH, modelo agudo, "in vivo"	72
4.4.3. Formación de ác. úrico, modelo crónico, experimentos "in vivo"	74
4.4.4. Determinación de NADH, modelo crónico, "in vivo"	77
4.5. Efecto del etanol "in vivo" en sangre y re- banadas de hígado sobre la degradación de purinas	78
4.6. Efecto de la adenosina adicionada "in vitro"	79
4.7. Efecto del etanol adicionado "in vitro"	80
4.7.1. Actividad de la adenosina kinasa	81
4.7.2. Actividad de la adenosina deaminasa	81
4.7.3. Actividad de la SAH-H	82
4.7.4. Determinación de ácido úrico	82
5. Discusión	83
5.1 Discusión de resultados modelo "in vivo"	84
5.2 Efecto "in vivo" de los diferentes tratamientos sobre la formación de ác. úrico en plasma y reba- nadas de hígado.	89

<b>5.3 Adición de etanol "in vitro"</b>	<b>90</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>96</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>98</b>
<b>8. Anexo</b>	<b>105</b>

## ABREVIATURAS

Abs	Absorción o absorbencia
ADO	Adenosina
ADA	Adenosina Deaminasa
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AK	Adenosina kinasa
5'-N	5'-Nucleotidasa
DTT	Ditiotreitol
EtOH	Etanol
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
GMP	Guanosina monofosfato
I	Rata intacta (sin tratamiento)
IMP	Inosina monofosfato
NAD <sup>+</sup>	Nicotín-adenín-dinucleótido
NADH	Nicotín-adenín-dinucleótido reducido
Pir-LDH	Sistema Piruvato-Lactato deshidrogenasa
SAH-H	S-Adenosil-homocisteína-hidrolasa
Sol.	Solución
SSI	Solución salina isotónica, pH 7.4
X.O.	Xantina oxidasa
XMP	Xantosina monofosfato.

I.

# Objetivo General



## 1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio es conocer el metabolismo de las purinas durante la intoxicación, tanto aguda como crónica con etanol en hígado de rata por medio del comportamiento de las enzimas que constituyen dicho metabolismo, trabajando para ello, con modelos de intoxicación tanto "in vivo" como "in vitro".

2.

# Introduccion

## 2. INTRODUCCION

### 2.1 ASPECTOS GENERALES SOBRE LA INTOXICACION CON ETANOL

El alcoholismo representa uno de los problemas sanitarios y socioeconómicos más importantes en el mundo entero. Un alcohólico es usualmente una persona que consume una cantidad de etanol (alcohol etílico) capaz de producir alteraciones patológicas. La cantidad de etanol capaz de provocar enfermedad es variable y depende de diversos factores que incluyen: predisposición genética, malnutrición e infección viral hepática concomitante (hepatitis viral). (1)

En los seres humanos, el alcohol es principalmente un compuesto exógeno consumido en forma de bebidas alcohólicas y absorbido rápidamente en todo el tracto gastrointestinal. El alcohol ingerido se absorbe en el estómago, intestino delgado y colon. Aproximadamente del 90 al 98% de la cantidad total es absorbido y oxidado completamente, mientras que el resto, del 2 al 10%, es eliminado primeramente a través del riñón y pulmones; una cantidad muy pequeña es excretada en la bilis, sudor, lágrimas, saliva y jugo gástrico.

#### 2.1.1. EFECTOS DEL ETANOL EN EL ORGANISMO.

El alcohol etílico es un tóxico que produce lesiones en todos los tejidos, según sea la dosis ingerida y la duración de la acción del alcohol. El grado de las

lesiones varía en los diferentes sistemas orgánicos.

a) SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.-

El efecto del etanol es siempre una depresión primaria de los centros más altos y después se extiende a los mecanismos más vegetativos según se incrementa el porcentaje de éste en el sistema nervioso central. La idea común de que el alcohol es un estimulante es debido a su poder de disminuir las inhibiciones, por lo que luego se presentan conductas impulsivas.(2)

Entre los efectos más importantes del etanol sobre el sistema nervioso central tenemos los siguientes:

1. Efecto en la visión.
2. Incoordinación muscular.
3. Tiempo de reacción alargado.
4. Euforia.
5. Eliminación de inhibiciones.

Estas alteraciones funcionales usualmente son reversibles.

Algunos síntomas frecuentemente irreversibles que están asociados con la ingestión alcohólica prolongada y constante y, en la mayoría de los casos, con deficiencias nutricionales, incluyen:

- 6.- El síndrome de Wernicke-Korsakoff, neuropatía periférica, ambliopía (pérdida de la visión), degeneración cerebelar, la mielínolisis pontina central, degeneración cerebral y demencia progresiva con desmielinización del cuerpo calloso.(6)

b). HIGADO.-

El Hígado es el órgano en donde el alcohol es metabolizado y ejerce una acción más prolongada; por lo tanto, la incidencia y la severidad de las lesiones son más importantes en el hígado.

Pueden desarrollarse tres tipos de patología hepática:

- La forma leve se caracteriza por una infiltración grasa ( Hígado graso alcohólico) y por un grado mínimo de inflamación y necrosis.

- En casos de hígado graso más severos, puede observarse la aparición de un proceso fibrótico, especialmente alrededor de los conductos venosos centrales. Clínicamente se manifiesta por hepatomegalia, anorexia y dolor durante la palpación de la zona hepática . Existen alteraciones bioquímicas como son elevaciones leves de la aspartato amino transferasa (AST), bilirrubina y fosfatasa alcalina, así como de la gama-glutamil-transferasa que es una enzima inducible por el etanol. El hígado graso alcohólico es considerado un cuadro benigno y reversible.(3)

- La forma de lesión tóxica más severa, la hepatitis alcohólica, se caracteriza por una degeneración grasa con hepatomegalia, inflamación y necrosis importantes, en esta fase se llega a observar fibrosis.

La fase final de la enfermedad hepática alcohólica crónica se manifiesta por el desarrollo de una cirrosis con una fibrosis hepática extensiva, regeneración nodular, alteración de la arquitectura hepática y finalmente

insuficiencia hepática y muerte del paciente.

En el hígado, debido a la ingesta de etanol, se pueden promover alteraciones bioquímicas de los lípidos, proteínas e hidratos de carbono.(3) Se ha observado una acumulación de proteínas (glucoproteínas y alfafetoproteínas), la cual se produce concomitantemente con la acumulación de grasa y contribuye al desarrollo de la hepatomegalia.

La gluconeogénesis se encuentra alterada de modo similar por el etanol a través de diversas vías.

Hay una disminución en el almacenamiento de glucógeno en el hígado, resultado de una baja ingestión de alimentos y de la enfermedad hepática asociada frecuentemente con el alcoholismo crónico (hígado graso, hepatitis alcohólica, cirrosis alcohólica).

En ausencia de enfermedad hepática, malnutrición u otras condiciones predisponentes, el etanol propiamente dicho provoca un incremento leve de la glucosa sanguínea (3).

#### c). PANCREAS.

La ingestión de alcohol lleva como consecuencia a un cuadro de mala absorción y dolores muy fuertes a nivel abdominal. Aparte de esto, hay destrucción de las células secretoras de enzimas y también de las secretoras de insulina y glucagon. Cuando ocurre esto, el paciente desarrollará

una diabetes mellitus insulino-dependiente. Debido a que también ha disminuido el nivel de glucagon y ya no es suficiente como para estimular la síntesis de glucosa, estos pacientes son lábiles y propensos a padecer crisis de hipoglucemia.

#### d). SISTEMA CARDIOVASCULAR.-

Cantidades moderadas de alcohol causan considerable dilatación de los vasos sanguíneos de la piel, produciendo una sensación de calor. El consumo crónico de alcohol es uno de los principales causantes de una gran variedad de anomalías cardiovasculares, entre ellas la hipertensión. La causa por la cual el alcohol produce hipertensión sanguínea, es la disminución en la excreción urinaria de iones sodio y un aumento en el volumen plasmático.(4)

#### e). RIÑÓN.-

El consumo de alcohol es generalmente seguido de un incremento en el volumen de orina de relativa alta acidez. Esta acción es un resultado de una depresión del sistema nervioso central y no es debida a un efecto directo sobre el riñón.

#### f) EFECTOS ENDOCRINOS.-

El consumo moderado de alcohol ejerce un efecto de escasa magnitud sobre la liberación adrenal de cortisol. Sin embargo, la presencia de un nivel sanguíneo de alcohol superior a 1 g/l puede generar la elevación de los niveles

plasmáticos de cortisol. Algunos alcohólicos muestran indicios de una insuficiencia hipofisaria. La disminución de glucosa en sangre produce una elevación de cortisol plasmático. Esta respuesta se encuentra disminuida o ausente en un 25% de alcohólicos crónicos debido a que la hipófisis no secreta una cantidad suficiente de hormona adenotrópica como para estimular la glándula adrenal. Otro indicio de la insuficiencia hipofisaria serían los niveles bajos de hormona de crecimiento y de prolactina después de una estimulación a través de un descenso de la glucosa en sangre.

g) EFECTOS HEMATOPOYETICOS.-

Los efectos del alcohol sobre la sangre y la médula ósea son el resultado de una acción tóxica directa y de las deficiencias nutricionales asociadas. Los alcohólicos muestran niveles sanguíneos de folato reducidos, debido a que el alcohol inhibe directamente el metabolismo de éste. La absorción de la vitamina B12 también es inhibida por el alcohol. El exceso de alcohol, puede provocar la aparición de una anemia hemolítica aguda y alterar la función de los leucocitos ; la cirrosis alcohólica se acompaña de una disfunción plaquetaria la que puede conducir a la aparición de infecciones y hemorragias.

h). SISTEMA INMUNOLOGICO.-

En los pacientes con enfermedad hepática alcohólica hay un incremento de anticuerpos y células B circulantes.



en pacientes con hepatitis alcohólica crónica, frecuentemente hay elevación de la IgA. Existe una disminución del número total de células T y su capacidad para sintetizar DNA, se encuentra disminuida, por lo que la respuesta ante antígenos mitógenos, está suprimida y sus propiedades citotóxicas están aumentadas (respuesta alterada a las vacunas, mayor susceptibilidad a las infecciones, disminución del recuento linfocitario).

i). ALTERACIONES NUTRICIONALES ASOCIADAS CON EL ALCOHOLISMO.

La malnutrición en la forma de la deficiencia caloricoproteica es el resultado de diversas causas:

- a) Ingestión dietaria reducida.
- b) Mala absorción de las sustancias ingeridas.
- c) Alteración de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos.

Las formas más graves de enfermedad hepática están asociadas con una malnutrición severa, es posible que se desarrolle una lesión hepática en ausencia de malnutrición. Aunque las necesidades calóricas del alcohólico se encuentren satisfechas por las calorías que aporta el alcohol en sí, este tipo de calorías no son nutritivas y pueden llevar a los alcohólicos a sufrir una malnutrición primaria, ya que se encuentran disminuidos otros nutrientes como son las proteínas. (1), (2).

## 2.2 METABOLISMO DEL ETANOL.

La mayor parte del alcohol absorbido es degradado por medio de procesos oxidativos, principalmente en el hígado, para formar en primer lugar acetaldehído y luego acetato. El acetato libre, producto final principal de la oxidación del etanol en el hígado, deja el hígado y es metabolizado en otros tejidos. La oxidación ocurre en dos etapas, etanol a acetaldehído, y acetaldehído a acetato.(5)

En el metabolismo del etanol están involucrados tres sistemas enzimáticos principalmente:

2.2.1 La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH); que está presente en todos los vertebrados que se han estudiado. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

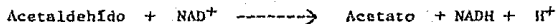
CITOSOL:



Consecuencias: En el citosol se incrementa la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  3-4 veces. La concentración de acetaldehído en la sangre se ve incrementada a una concentración de 10 a 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ .

En la mitocondria, la acetaldehído deshidrogenasa cataliza la reacción de oxidación del acetaldehído a acetato:

MITOCONDRIA:



Consecuencias: La relación mitocondrial  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  se

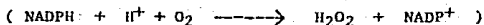
ve incrementada de 2 a 3 veces. El acetato en sangre se incrementa a una concentración de 1 mmol/L.

La alcohol deshidrogenasa actúa cuando se presenta el etanol a bajas concentraciones. De tal forma de mantener la oxidación del etanol a acetaldehído de manera eficiente, es necesario remover los dos productos: NADH y acetaldehído. Este último es oxidado preferencialmente en la mitocondria, en donde la enzima acetaldehído deshidrogenasa, tiene una baja Km (menor que 1µmol/L). Esto mantiene la concentración de acetaldehído baja, mientras que la concentración de acetato se incrementa a 1 mmol/L.

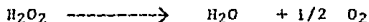
La deshidrogenasa alcohólica no es la única enzima que cataliza la oxidación de etanol a acetaldehído.

A altas concentraciones, arriba de 20 µmol/L, la oxidación puede ser por medio de la catalasa y el MEOS (Sistema de Oxidación Microsomal del Etanol).

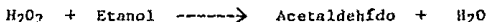
2.2.2 Catalasa.- Esta enzima favorece indirectamente la reacción de oxidación del etanol bajo condiciones en las cuales exista un sistema regenerador de peróxido de hidrógeno, por ello, el papel desempeñado por la catalasa en la oxidación biológica del etanol es discutido (5). Parecería ser que la lentitud con la que el peróxido puede ser generado a partir de NADPH oxidasa o de la Xantina Oxidasa, impide que la catalasa contribuya con más de un 2 % de la oxidación del etanol in vivo. La reacción es la siguiente:



en donde la catalasa:



por lo tanto:



En el presente estudio, la acción de la catalasa se considera un punto importante, ya que una de las enzimas que intervienen en el metabolismo de la adenosina es la Xantina Oxidasa (productora de peróxido de hidrógeno), la cual es ampliamente discutida a lo largo del trabajo.

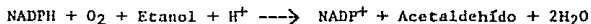
### 2.2.3. MEOS (Sistema de Oxidación Microsomal del Etanol).-

El MEOS representa un sistema enzimático secundario en la depuración del etanol (5). Este sistema enzimático se encuentra en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos. Se considera importante dentro del modelo crónico de ingesta de etanol, ya que es un sistema inducible bajo estas condiciones debido a la elevada concentración de etanol que se presenta en ese caso.

Cuando se administra etanol en forma crónica a ratas, se observan cambios adaptativos en el hígado debidos a la toxicidad del alcohol. Uno de los cambios adaptativos es la proliferación del retículo endoplásmico liso, lo cual ha sido confirmado por métodos bioquímicos. Se demostró que la proteína y la masa fosfolipídica de los microsomas lisos se incrementaba conforme se iba administrando crónicamente el etanol. El MEOS contiene 3 componentes microsomales: citocromo P-450, NADPH citocromo c reductasa y fosfolípidos

microsomales. Dichos componentes incrementan también su actividad durante la administración crónica de etanol (5).

Bajo este sistema, la reacción que cataliza la oxidación del etanol es la que a continuación se presenta:



La presencia del MEOS y de la catalasa, pueden disminuir la necesidad de transferir equivalentes reductores dentro de la mitocondria. Ya que la coenzima usada en estos procesos es la NADPH, se requiere un mecanismo de transhidrogenación del NADH al NADP<sup>+</sup>. Una posibilidad es la que se muestra en la figura siguiente, en donde está involucrada la enzima málica :

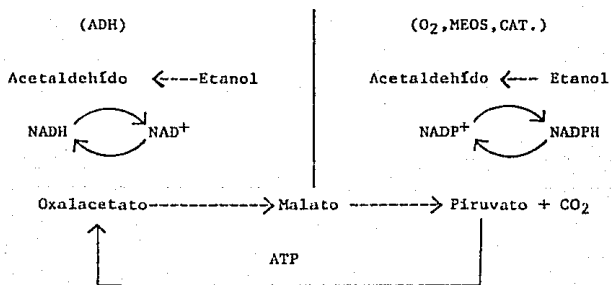


FIG. 1. Oxidación simultánea del etanol por ADH (NAD<sup>+</sup>) y vías que requieren NADPH. Si las dos reacciones suceden simultáneamente no habría un transporte neto de equivalentes reductores de la mitocondria o hacia ella.

Esta transhidrogenación requiere del gasto de una molécula de ATP para la carboxilación del piruvato. (5)

### 2.3 GENERALIDADES SOBRE EL METABOLISMO DE LAS PURINAS.

Las bases púricas principales son la adenina y guanina, presentes tanto en DNA como en RNA. Derivan de la purina, un compuesto formado por la unión de un anillo de pirimidina y otro de imidazol. (fig 2). Otras bases púricas que constituyen intermediarios del metabolismo de aquellas son hipoxantina, xantina y ácido úrico.

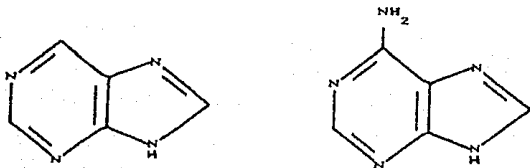


FIG. 2 PURINA

ADENINA (6-amino-purina)

En este trabajo, nos referiremos principalmente a la adenosina, que es un nucleósido donde la base púrica se condensa con la pentosa (en este caso ribosa), mediante el nitrógeno 9 de la base y el carbono 1 glicosídico del azúcar, siendo  $\beta$  la configuración del enlace N-glicosídico (fig.3).

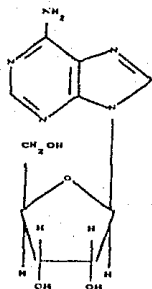


FIG.3 ADENOSINA (9-β-D-ribofuranosil-adenina)

Los nucleósidos generalmente pueden formar nucleótidos por esterificación con ácido fosfórico. El punto de unión más frecuente es el carbono 5 de la pentosa formándose 5'-ribonucleótidos tales como el AMP, ADP y ATP (en el caso de la adenosina).

La biosíntesis de novo de las purinas implica la participación de varias biomoléculas que reaccionan en serie con la ayuda de las respectivas enzimas que catalizan cada reacción, para ir formando la molécula entera del nucleótido. Entre estas biomoléculas se encuentran: Fosforribosilpirofosfato, 2 moléculas de glutamina, glicina, metenil-tetrahydrofolato,  $CO_2$ , aspartato, formil-tetrahydrofolato y se forma primeramente el IMP o ác. inosínico, a partir del cual se sintetizan el AMP y el GMP, a través de 2 vías diferentes.

Los ácidos nucleicos pueden ser hidrolizados a oligonucleótidos, mononucleótidos y, finalmente, nucleósidos

y sus correspondientes bases, algunas veces éstos son recuperados para reutilizarse sin que tengan que ser degradados (recuperación de purinas).

La degradación de los nucleótidos púricos procedentes de los ácidos nucleicos endógenos o de la dieta, exige su hidrólisis previa a nucleósidos y luego a bases púricas libres.

El AMP, la adenosina y la adenina, pueden transformarse por la acción de las desaminasas respectivas en IMP, inosina e hipoxantina (FIG 4); de modo similar, GMP, guanosina y guanina dan lugar a XMP, xantosina y xantina. Por su parte, la acción de las nucleotidasas sobre los nucleótidos da lugar a nucleósidos que, a su vez son hidrolizados por nucleósido fosforilasas liberando las bases y ribosa-1-fosfato.

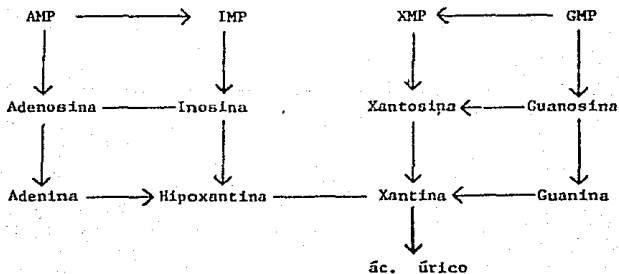


FIG.4. Degradación de nucleótidos púricos. Tomado de referencia 6.

Las bases púricas libres, para su degradación, deben convertirse primeramente en xantina. Para ello, la guanina es



desaminada por guanasa. La adenina se desamina por adenosina desaminasa a hipoxantina, y ésta se oxida a xantina por acción de la xantina oxidasa en una reacción que requiere oxígeno molecular. Esta enzima es una flavoproteína que contiene hierro (no hemático) y molibdeno, siendo responsable también de la oxidación subsiguiente de xantina a ácido úrico. El peróxido de hidrógeno obtenido en las dos reacciones se descompondrá después en  $H_2O$  y  $O_2$  por acción de la catalasa.

El ácido úrico es el producto final de la degradación de las purinas en el hombre y en la mayoría de los primates (organismos uricotélicos) y es excretado como urato por la orina junto con pequeñas cantidades de hipoxantina y xantina.

Excluidos el hombre y algunos primates, el resto de los mamíferos poseen uricasa, por lo que oxidan el ácido úrico a alantoína, que es su producto de excreción. En peces teleósteos, la degradación prosigue hasta ácido alantoico, producto de hidratación de la alantoína, por acción de la enzima alantoínasa.

Los demás peces y los anfibios son animales ureotélicos, puesto que hidrolizan el ácido alantoico en presencia de alantoicasa, originando así ácido glioxílico y 2 moléculas de urea, que es su producto de excreción. (6)

## 2.4 A D E N O S I N A

La adenosina es producida, liberada, captada y metabolizada por la mayoría de los tejidos animales.

Algunos tejidos como el miocardio y tejido adiposo son capaces de liberar adenosina.

La Adenosina ejerce múltiples acciones sobre diferentes órganos, principalmente:

2.4.1. Efectos neuronales .- La adenosina y ATP tienen efectos depresores sobre el sistema nervioso periférico (7).

2.4.2. Efectos cardiovasculares .- En condiciones de hipoxia el corazón muestra una reducción en la resistencia vascular coronaria asociada con un incremento en la liberación de adenosina. La adenosina está implicada en la regulación local del flujo sanguíneo coronario originando así vasodilatación.(8)

2.4.3. Efectos sobre acciones hormonales.- La adenosina estimula la esteroidogénesis en las glándulas adrenales y células de Leyding así como la secreción de glucagon (9) y hormona del crecimiento (8), mientras que inhibe la liberación de insulina por estímulo con glucosa "in vivo". Bajo condiciones de ayuno la adenosina produce una hiperglicemia que no es atribuible a cambios en la secreción ni de insulina ni de glucagon. La administración de adenosina altera la secreción de algunas hormonas por

los islotes de Langerhans (aumenta la liberación de glucagon y disminuye la secreción de insulina) pero esto sólo es observable claramente bajo condiciones de estímulo con una carga de glucosa (9).

2.4.4. Efectos citotóxicos.- La adenosina tiene efecto sobre las células encargadas de la respuesta inmune, impidiendo o dificultando su acción, lo cual se cree que es debido a que la adenosina inhibe la síntesis de pirimidinas, sin embargo, esta teoría sigue en estudio (10).

2.4.5. Acciones bioquímicas.- entre algunas de las acciones bioquímicas de la adenosina se pueden mencionar las siguientes:

a) Disminución de la lipogénesis hepática.-

-La adenosina produce una disminución de triacilglicérols hepáticos en la producción de lípidos (11).  
-El nucleósido revierte el hígado graso inducido por intoxicación con etanol, (12), tetracloruro de carbono (13) y cicloheximida (14), sin afectar la inhibición de síntesis de proteínas producidas por los dos últimos. La adenosina previene el hígado graso por limitar la disponibilidad de los precursores para la síntesis de triacilglicérols: alfa-glicerol fosfato y acil-CoA. (15)

b) En hígado deprime "in vivo" e "in vitro" la oxidación de cadenas de ácidos grasos por inhibir la acil-CoA sintetasa extramitocondrial (16), reflejando este efecto por

una disminución en la cantidad de cuerpos cetónicos en la sangre.

c) Aumento de lipogénesis en el tejido adiposo del epidídimo. El nucleósido produce un incremento de 5 veces en la incorporación de glucosa marcada en la grasa epididimal.(17)

d) El nucleósido es capaz de cambiar el patrón metabólico inducido por la intoxicación aguda con etanol ya que la adenosina previene parcialmente y revierte la formación de hígado graso inducido por etanol y aumenta el aclaramiento de etanol de la sangre; ambos efectos están relacionados por el hecho de que el nucleósido mejora la disminución en la relación  $NAD^+/NADH$  mitocondrial producido por el metabolismo del etanol (18).

e) El patrón metabólico que se observa en presencia de la adenosina se caracteriza por una tendencia a incrementar los procesos anabólicos como la síntesis de glucógeno y disminuir los catabólicos como la oxidación hepática de ácidos grasos, esto conduce a la conclusión que por un mecanismo aún no muy claro, la adenosina cambia el patrón metabólico de animal en ayuno a uno de animal alimentado. Probablemente el eje alrededor del cual gira este cambio, sea el aumento de la carga energética que se sabe favorece secuencias anabólicas e inhibe las catabólicas (19).

f) En la sangre y el hígado de rata, se ha observado una respuesta cíclica diaria en cuanto a compuestos púricos. En

sangre, existen niveles bajos de adenosina durante el día y elevados durante la noche, en tanto que, con inosina e hipoxantina sucede lo contrario. Los niveles de ácido úrico indican que la disminución en el catabolismo de las purinas coincide con una disminución en los niveles de inosina e hipoxantina y aumento en adenosina. En el hígado, la adenosina aumenta durante la noche mientras que inosina e hipoxantina permanecen disminuidas durante las 24 horas. Los resultados sugieren que el metabolismo purínico en el hígado puede participar en el mantenimiento y renovación de la poza de purinas en la sangre y en el estado energético de los eritrocitos "in vivo" (20).

## 2.5. METABOLISMO DE LA ADENOSINA.

La adenosina se forma en las células a partir de AMP, o de la degradación de la S-adenosil-homocisteína y se puede remover de las células por liberación al fluido extracelular, por desaminación a inosina o por reutilización para formar AMP.

Las fosfatasa ácida o alcalina (EC. 3.1.3.2 y 3.1.3.1), podrían estar involucradas en la formación de adenosina ya que catalizan la hidrólisis de 5'-AMP a adenosina. Sin embargo, no muestran especificidad para el 5'-AMP y sus actividades a pH neutro son muy bajas para ser de importancia fisiológica en la producción de adenosina.

Similarmente, la purino nucleósido fosforilasa (EC. 2.4.2.1.), que podría producir adenosina de adenina, tiene una actividad muy baja. Por otro lado, la 5'-nucleotidasa es específica para 5'-nucleótidos, su pH óptimo es muy cercano al fisiológico y su actividad máxima puede contar más adecuadamente para la formación de adenosina.

La adenosina es convertida, ya sea "in vivo" o "in vitro", a nucleótidos de inosina o adenina. Las enzimas adenosina deaminasa (EC.3.5.4.4) y adenosina kinasa (EC.2.7.1.20), se consideran como responsables de estas conversiones (FIG. 5).

Conociendo las actividades de las enzimas que metabolizan a la adenosina, asociadas con tipos celulares individuales de un tejido en diferentes estados fisiológicos, se puede

conocer el modo de acción de la adenosina, ya que de esta manera, se puede saber la tendencia de aumento o disminución en los niveles de ésta (21).

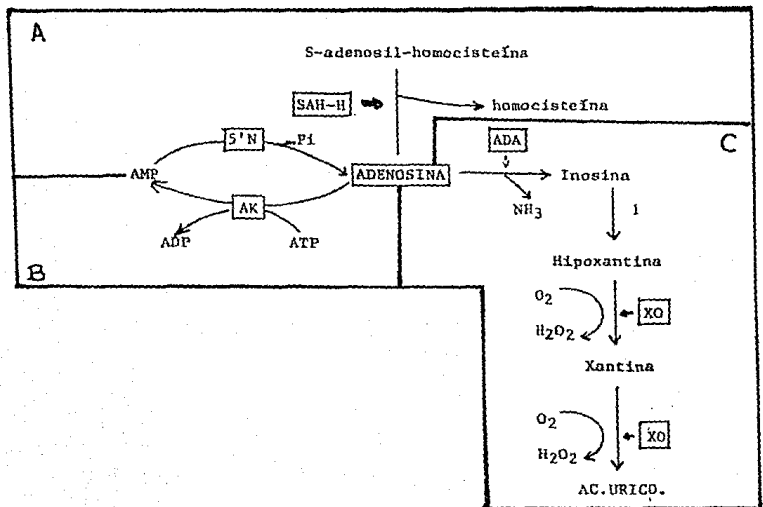


FIG. 5 METABOLISMO DE LA ADENOSINA.  
 5'-N = 5'-nucleotidasa, ADA = adenosina deaminasa, AK = adenosina kinasa, SAH-H = S- adenosil-homocisteína hidrolasa, XO = xantina oxidasa, enzima 1 = purino nucleósido fosforilasa, Pi = Fósforo inorgánico.

El metabolismo de la adenosina se puede dividir en 3 etapas:

- A. Síntesis,
- B. Utilización, y
- C. Degradación.

Para poder ilustrar esto, se debe tomar en cuenta la figura 5.

#### A. SINTESIS.

Dentro de la síntesis de adenosina, participan 2 enzimas: la 5'-nucleotidasa (5'-N) y la S-adenosil-homocisteína-hidrolasa (SAH-H).

#### B. UTILIZACION.

La enzima encargada de la utilización de adenosina es la Adenosina Kinasa, la cual va a fosforilar a la adenosina para convertirla en AMP, que puede a su vez ser transformado en ADP y ATP para la vía de utilización de las purinas que se mencionó anteriormente.

#### C. DEGRADACION.

La adenosina es degradada primeramente por la enzima adenosina deaminasa para dar lugar a la inosina, ésta a su vez es convertida en hipoxantina por la nucleósido fosforilasa y posteriormente actúa la Xantina-Oxidasa para degradarla a xantina y finalmente a ácido úrico en el caso del hombre, ya que en otros mamíferos, la degradación es hasta alantoina.

#### 2.5.1. 5'-NUCLEOTIDASA. (E.C. 3.1.3.5)

Se ha propuesto que la producción de adenosina y la utilización en tejidos de mamíferos, depende principalmente de la actividad de la enzima que la está produciendo; la 5'-nucleotidasa y las 2 enzimas que la utilizan como sustrato: adenosina deaminasa y adenosina kinasa (8).



Fraccionamiento celular y estudios citoquímicos, han mostrado que en varios tejidos (cerebro, hígado, pulmón, corazón y músculo esquelético), una gran proporción de la actividad de la 5'-nucleotidasa está asociada a la membrana plasmática; por ello, esta actividad es frecuentemente utilizada como un marcador de la membrana plasmática de las células. Asimismo, en el caso de los adipocitos se ha llegado a la conclusión de que es una ectoenzima y que tiene acceso al sustrato extracelular; es decir, el AMP añadido extracelularmente, es hidrolizado rápidamente por células intactas.

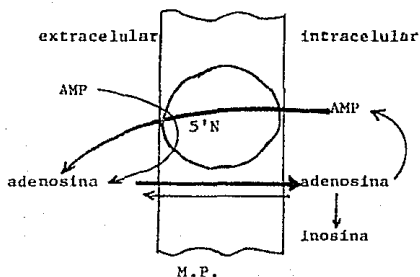


FIGURA 6. Hipótesis sobre la acción de la 5' Nucleotidasa. M.P.= Membrana plasmática. Tomado de referencia 21.

No se sabe exactamente si la 5'-nucleotidasa tiene acceso al sustrato tanto intra como extracelular. Existen hipótesis que apoyan ambas posibilidades. Más aún, se ha postulado que la enzima puede regular cambios intracelulares en la

concentración de AMP y que la adenosina es liberada directamente en el espacio extracelular, siendo la función de la enzima dual: como nucleotidasa y como sistema de transporte (FIG.6) (8, 21).

Estudios recientes indican que la mayoría de los tejidos contienen 2 isoenzimas de la 5'-nucleotidasa, la intrínseca de membrana y la forma soluble citosólica. Mientras que la función de la enzima unida a membrana permanece oscura, se ha visto que la 5'-N citosólica regula la formación intracelular de la adenosina resultante del catabolismo de nucleótidos. Algunos investigadores han demostrado que las propiedades cinéticas de las 2 isoenzimas de la 5'-nucleotidasa son muy diferentes (22).

Widnell en 1968 propuso que la estructura de la 5'-nucleotidasa corresponde a una lipoproteína con un solo fosfolípido: esfingomielina que está asociado a esta lipoproteína (23).

#### 2.5.2 S-ADENOSIL-HOMOCISTEINA-HIDROLASA. (E.C. 3.3.1.1)

Dentro del metabolismo de la metionina (aminoácido esencial), existe un mecanismo de metilación para la reconversión y síntesis limitada de metionina. El mecanismo de metilación más habitual de la metionina, implica su condensación con ATP para dar lugar a la S-adenosil-

metionina, cosustrato esencial de metilaciones, que cede el grupo metilo con facilidad, convirtiéndose en S-adenosil-homocisteína (SAH). La SAH, libera homocisteína por hidrólisis, dando adenosina (24).

La degradación de SAH a adenosina y homocisteína, representa otra fuente potencial de adenosina intracelular. La enzima capaz de catalizar esta hidrólisis, la SAH-Hidrolasa, se encuentra en levaduras, plantas, pájaros y mamíferos, y su concentración es más elevada en el hígado, el páncreas y el riñón de éstos últimos. En el hígado de rata y humano, se ha localizado exclusivamente en la fracción citosólica.

La SAH-H cataliza la reacción reversible de la SAH a ADO y L-Homocisteína. Cuando la concentración de los sustratos es mayor del rango micromolar, la reacción favorece la síntesis de SAH.

Tanto la ADO como la L-Homocisteína son inhibidores potentes de la reacción hidrolítica, "in vivo" (25); la catálisis enzimática puede ser dirigida hacia la hidrólisis removiendo la ADO o la L-homocisteína.

Aunque la reacción favorece la síntesis de SAH, el flujo metabólico es probablemente en dirección hidrolítica, ya que la ADO y la L-homocisteína son rápidamente metabolizados en la célula. (25)

Schrader y col. han evaluado el papel de la SAH-H como fuente celular de ADO en varios tejidos. Se ha sugerido que

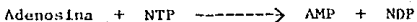
La SAH puede ser un punto de producción de ADO en el corazón de mamíferos. (26)

El otro producto formado a partir de la SAH-H es la L-homocisteína, la cual es convertida a L-metionina o puede reaccionar con serina para formar cistationina y finalmente cisteína.

La actividad enzimática de la SAH-H se puede ensayar ya sea en la dirección de síntesis o en la de hidrólisis. (27). En el caso del presente trabajo, se realizó en la dirección de hidrólisis como se explicará más adelante en el capítulo de materiales y métodos.

### 2.5.3. ADENOSINA KINASA. (E.C. 2.7.1.20)

La adenosina kinasa cataliza la fosforilación de adenosina a AMP de acuerdo a la siguiente reacción:



donde, NTP= Nucleótido trifosfato.

Es una enzima ampliamente distribuida. Se descubrió primeramente en levaduras y en tejidos de mamíferos y ha sido parcialmente purificada de esas fuentes.

Algunas preparaciones parcialmente purificadas de la enzima de fuente animal tienen un pH óptimo de 5, pero la mayoría de las preparaciones más puras muestran un pH óptimo mayor en el rango de 6-7, (28).

La enzima requiere un catión divalente, usualmente  $\text{Mg}^{2+}$  ó

Mn<sup>2+</sup> y hay evidencias de que el magnesio se puede unir a la enzima (28).

La adenosina kinasa parece tener un peso molecular bajo, en el rango de 25,000 a 40,000 Daltones y es una cadena polipeptídica simple. Tiene una especificidad medianamente alta para los nucleósidos trifosfato. Además del ATP y del dATP, pueden servir como donadores de fosfato el GTP, ITP, dGTP y UTP. La enzima es más restrictiva en cuanto al sustrato de nucleósido; puede fosforilar a guanosina e inosina pero muy pobremente y no fosforila a pirimidino-desoxirribonucleósidos. (28)

Bajo condiciones basales, la mayor parte de la adenosina es refosforilada. Esto preserva la base púrica y permite una relación controlada del flujo de adenosina a inosina. Sin embargo, en situación de estrés, es más ventajoso para la célula permitir la degradación de adenosina a inosina de tal manera que el ATP no se use para la refosforilación de la adenosina y que la concentración de ATP y AMP de la célula se mantengan.

A bajas concentraciones, la mayor parte de la adenosina es refosforilada, pero a mayores concentraciones, una gran proporción es desaminada. (21)

#### 2.5.4 ADENOSINA DEAMINASA. ( E.C. 3.5.4.4)

La adenosina deaminasa es una enzima de la vía de degradación

de la adenosina que cataliza la hidrólisis de ésta a inosina y amoníaco (29).

Está presente en una gran número de tejidos de mamíferos, con mayor actividad en la mucosa intestinal. La enzima está predominantemente localizada en la fracción citosólica de estas células. Niveles elevados de esta enzima se pueden detectar en pacientes que sufren cirrosis (29).

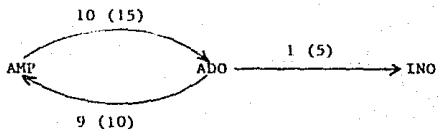
La deficiencia de adenosina deaminasa se asocia con severas anomalías de la inmunidad (29).

La mayor parte de la información acerca de la estructura química de la enzima está referida a la enzima proveniente de duodeno de ternera indicando que se trata de una cadena polipeptídica simple de peso molecular aproximado de 31,000-35,000 D. No se requiere de cofactores disociables para la catálisis, ya que se ha dializado extensivamente esta enzima o se ha adicionado EDTA, sin pérdida significativa de la actividad enzimática.

En el hígado, donde se conoce que la mayoría de las enzimas catabólicas se incrementan con la edad, el nivel de adenosina deaminasa no muestra ninguna variación a diferencia de éstas (30). Hay considerables evidencias de que tanto la hidrólisis de AMP como la fosforilación de adenosina ocurren simultáneamente (21), lo cual es un requerimiento necesario para su interconversión.

Arch y Newsholme indican que para comprender el significado de este ciclo es importante apreciar que la kinasa tiene una

baja  $K_m$  para adenosina, mientras que la de la deaminasa es aproximadamente 50 veces más alta. En realidad, la  $K_m$  para la kinasa es más baja que la concentración total de adenosina en el tejido, bajo condiciones basales, pero, ya que la concentración intracelular es de alguna manera más baja que la concentración extracelular, la  $K_m$  de la kinasa y la concentración intracelular son probablemente similares. Por consiguiente, la kinasa puede alcanzar la saturación con sustrato, aún bajo condiciones basales, mientras que la concentración de adenosina es inferior que la  $K_m$  de la deaminasa. Cuando la concentración de la adenosina se incrementa, (por ejemplo, por un aumento en la actividad de la 5'-nucleotidasa), la actividad de la kinasa se incrementará muy poco (ver figura 5). Consecuentemente, casi toda la adenosina producida adicionalmente, será metabolizada por la adenosina deaminasa. Sin embargo, la única razón por la que podría incrementarse la actividad de la adenosina deaminasa bajo estas condiciones es el aumento en la concentración de adenosina. El incremento en la concentración de ADO debe ser mucho más grande que el incremento en la proporción de la producción de ADO, como lo muestra el sencillo cálculo siguiente:



Las cifras indicadas fuera de los paréntesis, representan el flujo de residuos a través de reacciones en situación basal. Los valores dentro de los paréntesis representan el flujo después de que la actividad de la nucleotidasa se ha incrementado en un 50%. Ya que la adenosina casi satura la kinasa, 80% del flujo incrementado es metabolizado vía la deaminasa. La única manera por la cual la deaminasa puede incrementar su actividad de 1 a 5 veces, es por un incremento de por lo menos 5 veces en la concentración de ADO. De este modo, el cambio en la actividad de la nucleotidasa es amplificado y hay un gran cambio en la concentración de ADO. De hecho, la amplificación puede ser considerablemente más grande que la mostrada en el esquema, ya que la adenosina kinasa de algunas especies es inhibida por concentraciones de ADO que son sólo ligeramente mayores que la  $K_m$ . Entonces, cuando el flujo a través de la 5'-nucleotidasa se incrementa, el flujo a través de la adenosina kinasa puede disminuirse (21).

#### 2.5.5 XANTINA OXIDASA. ( E.C. 1.2.3.2)

Hace más de 70 años se reconoció la existencia de una enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico en tejidos de mamíferos. Una segunda oxidasa que cataliza la oxidación de diferentes aldehídos, fue aislada posteriormente por Schardinger. En estudios subsecuentes se demostró que las dos enzimas eran idénticas. El nombre de



Xantina Oxidasa se escogió porque entre varios sustratos, la velocidad de oxidación de xantina y de hipoxantina a ácido úrico es la más rápida y el valor de Km es el más bajo.

La mayoría de los datos para la xantina oxidasa se derivaron del aislamiento de la enzima de la leche de vaca. La X.O. es una flavoproteína compleja que contiene un  $FAD^+$  y dos centros de Hierro-Azufre del tipo de la ferredoxina en cada una de 2 subunidades que son independientes. Se han reportado bajas especificidades para ambos: el sustrato y el aceptor de electrones. Se han descrito más de 100 diferentes compuestos como sustratos, por ejemplo, purinas, que son hidroxiladas y aldehídos que son oxidados a los correspondientes ácidos carbónicos (31).

Además del oxígeno molecular, se pueden emplear otros aceptores de electrones, por ejemplo, colorantes como el azul de metileno, 2,6-diclorofenol, indofenol, etc..

En los mamíferos, la X.O. está ampliamente distribuida: se puede detectar en el citosol de células de hígado, riñón, células mucosas de jejunio, etc. En glándula mamaria y leche, la X.O. está unida a los microsomas y partículas similares (31).

La xantina oxidasa es una proteína conjugada cuyo grupo prostético está formado por molibdeno y fierro en un porcentaje aproximado de 0.4%.

Es una oxidasa dependiente de flavina (FAD-flavín-adenín-

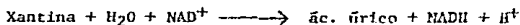
dinucleótido).

Se ha reportado que la mayor parte de la actividad de la X.O. de sobrenadante de hígado de rata aparece como una deshidrogenasa  $\text{NAD}^+$ -dependiente (llamada tipo D); ésto en condiciones de mínima manipulación técnica, lo cual sugiere que ésta es la forma existente fisiológicamente. La enzima es convertida a una oxidasa (tipo O) por una gran variedad de tratamientos del sobrenadante, como lo son el almacenamiento a  $-20^\circ\text{C}$ , tratamiento con enzimas proteolíticas, preincubación antes del ensayo con fracciones subcelulares particuladas o condiciones anaeróbicas, tratamiento con disolventes orgánicos o con carbón. Sólo los cambios observados bajo preincubación en condiciones anaerobias se pueden revertir incubando a  $37^\circ\text{C}$  en aire.

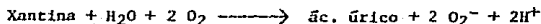
Con la X.O. de sobrenadante de hígado humano, se han observado cambios similares, mientras que en otros órganos de rata examinados, la actividad de la enzima apareció enteramente como una oxidasa.

Cataliza las siguientes reacciones:

FORMA D:



FORMA O:



El ión superóxido que se forma durante la reacción de la

forma O, es convertido a peróxido de hidrógeno por acción de la enzima superóxido dismutasa (32).

Estas dos actividades se han interpretado que son debidas a las dos formas interconvertibles de la X.O.. Los mecanismos a través de los cuales se considera la posible conversión de la xantina deshidrogenasa en la xantina oxidasa se puede restringir a dos tipos, proteólisis, que es irreversible y modificación(es) a los grupos tiol (reversible), por lo que se ha observado que el ditiotreitól (protector de grupos sulfhidrilo) previene y revierte esta conversión. (33)

La forma fisiológica (D) de la enzima es inhibida por NADH el cual es un producto de la reacción, en una proporción del 50% de inhibición algunos segundos después de iniciada la reacción, sugiriendo que este sistema puede ser parte del mantenimiento del equilibrio entre las vías de la biosíntesis de IMP (de novo y salvamento).(34)

La conversión de la X.O. de tipo D en tipo O puede ser posible también en tejidos isquémicos ("in vivo"). Por lo que se piensa que tiene importancia patofisiológica en el caso de necrosis tisulares por isquemia, debido a la producción de radicales libres.

La primera fuente de producción de superóxido en tejidos reoxigenados parece ser la X.O., liberada durante la isquemia cuya transformación parece ser debida a un ataque proteolítico mediado por calcio hacia la deshidrogenasa. Los

tejidos reperfundidos han sido protegidos por una gran variedad de modelos de laboratorio por medio de "secuestradores" de radicales superóxido o radicales -OH o por alopurinol u otros inhibidores de la X.O. (35).

El interés en esta enzima en el caso de este trabajo es debido principalmente a lo que se ha reportado acerca de una hiperuricemia inducida por etanol (36); como se ha comentado anteriormente, el consumo de etanol se ha asociado tradicionalmente a la hiperuricemia y en personas susceptibles, a artritis gotosa aguda. Experimentalmente, en personas alcohólicas, se ha visto que hay una producción elevada de ácido úrico. Asimismo, en pacientes sanos que han sido sometidos a dosis de alcohol, aumenta el nivel plasmático de ácido úrico.(36)

También se ha sugerido que una hipoxia relativa puede estar involucrada en la patogénesis del daño hepático inducido por etanol, ya que el tratamiento con etanol produce un incremento en la relación del consumo de oxígeno hepático en rebanadas e hígado perfundido.(37)

Sin embargo, estudios recientes en el Alcohol Research Center, indican que no existe una hipoxia directamente en el hígado como resultado de la intoxicación alcohólica, sino que lo que se modifica es la capacidad del hígado para consumir el oxígeno que le está siendo proporcionado adecuadamente por la sangre. (Rolando Hernández M. Trabajo no publicado).

En modelos experimentales, el daño hepático inducido por

hipoxia se aumenta por el etanol, debido a que la X.O. es convertida a su forma O por la hipoxia, dando lugar a iones de radicales libres. El acetaldehído producido por el metabolismo del etanol puede a su vez ser oxidado por dicha enzima aumentando la cantidad de especies reactivas y por lo tanto incrementar el daño hepático. Al tratar con alopurinol, inhibidor de la X.O., se revierten todos los efectos (37).

Se sabe que la sobreproducción de ácido úrico puede dar lugar a la enfermedad llamada gota, donde la elevada concentración de ácido úrico provoca que éste precipite y cristalice en la orina formando cálculos renales y lesionando al riñón. En los tejidos cartilagosos pueden formarse también depósitos de ácido úrico, provocando fuertes dolores.

Algunos antecedentes interesantes acerca de la acción de la adenosina sobre el aumento en los parámetros energéticos (niveles de AMP, ADP Y ATP), nos indican que bajo diversos tratamientos el tiempo de acción de la adenosina varía; con ratas intactas se observa el efecto de aumento de parámetros energéticos hasta los 30 minutos (38, 40); en ratas tratadas con etanol, éste dura hasta 2 horas (12,15) y con tratamiento basado en tetracloruro de carbono, el tiempo de acción es de 4 horas, (13).

Lo anterior sugiere que el metabolismo de la adenosina es más lento en los dos últimos casos, por lo que se trata de investigar en este trabajo si la actividad de las enzimas que metabolizan a la adenosina están modificadas bajo el tratamiento de intoxicación aguda y crónica con etanol, ya

que estas enzimas serían las responsables de que el tiempo de acción de la adenosina se encuentre retardado bajo los tratamientos mencionados anteriormente y pudieran aclarar la hiperuricemia postetanólica.

Además, se debe mencionar que en estudios de ritmos circádicos, la concentración de adenosina varía según la hora del día o de la noche como respuesta a la actividad de las enzimas que la metabolizan (20), lo que nos guía de tal manera de estudiar dichas enzimas para conocer el comportamiento de la adenosina.

En base a todo lo anteriormente expuesto, se llegó a plantear este estudio que está enfocado hacia el análisis del efecto del etanol en el metabolismo de la adenosina, comparado con animales íntegros (condiciones fisiológicas), midiendo directamente la actividad de algunas de las enzimas que participan en dicho metabolismo:

- 5'-nucleotidasa
- adenosina kinasa
- adenosina deaminasa
- S-adenosil-homocisteína hidrolasa y
- xantina oxidasa.

Se escogieron estas enzimas ya que se han considerado como las representativas de cada una de las 3 etapas del metabolismo de la adenosina y de este modo determinar el nivel en el cual se pudiera estar afectando este metabolismo con la intoxicación con etanol.

**3.**

**Materiales**

**y**

**Metodos**

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL

##### A) MODELO AGUDO.-

Se utilizaron ratas macho raza Wistar pesando 150-200g y puestas en ayuno de 18 a 20 horas antes del experimento.

Un grupo de ratas recibió una dosis de etanol de 5 g/kg de peso, en solución salina isotónica al 63% (v/v) por medio de una sonda gástrica y al grupo de animales control, se les administró una carga de glucosa isocalórica con el etanol por la misma vía.

El tratamiento inmediato era de dos tipos:

- a) Solución salina isotónica ( 0.85% ), por vía intraperitoneal (1ml/100g de peso)
- b) Solución de adenosina (200mg/kg de peso), también por vía intraperitoneal.

Los animales fueron sacrificados después de dos horas de tratamiento teniendo de esta manera 4 grupos de experimentación principales:

- I. Glucosa + Salina
- II. Glucosa + Adenosina
- III. Etanol + Salina
- IV. Etanol + Adenosina

Además se incluyó otro grupo:

- V. Ratas Intactas. Las cuales no recibieron ningún tipo de



tratamiento (ratas control).

B) MODELO CRONICO.-

Para este caso, se utilizaron ratas macho Wistar de 120 a 150 g de peso. Los animales fueron mantenidos en un régimen de 12/12 h. de luz-oscuridad. A éstos se les administraba el etanol en el agua del bebedero de la siguiente manera:

- Solución de etanol al 10% durante 10 días
- Sol. al 12% durante 10 días
- Sol. al 14% por 8 días
- Sol. al 16% por 8 días
- Sol. al 18% por 8 días
- Sol. al 20% por 8 días
- Sol. al 22% por 8 días

Este tratamiento se llevó a cabo manteniendo la alimentación normal de las ratas de acuerdo a lo establecido en el Bioterio, hasta completar un tratamiento de aproximadamente 8 semanas.

Al término de dicho tratamiento las ratas se mantuvieron en ayuno de 18 a 20 h antes de cada experimento y se les administró ya sea solución salina o solución de adenosina en las mismas condiciones ya mencionadas para el Modelo Agudo.

Los animales control recibieron la misma alimentación y agua a su gusto, en vez de etanol.

Las ratas así intoxicadas oscilaban en un peso entre 300 y 400 g cada una.

De esta manera, se tenían otros cuatro grupos:

VI. Agua + Salina

VII. Agua + Adenosina

VIII. Etanol + Salina

IX. Etanol + Adenosina.

El grupo de ratas intactas (controles) es el mismo que para el modelo agudo.

Después de las 2 h de tratamiento para cada modelo, los animales fueron sacrificados por decapitación y se les extrajo el hígado y la sangre rápidamente. El hígado, para las determinaciones enzimáticas objeto de este trabajo, y se colectó la sangre para otros experimentos que no serán incluidos aquí.

El tiempo de tratamiento y las dosis empleadas en la administración de etanol y adenosina son semejantes a lo manejado anteriormente en el laboratorio. (12,15).

### 3.2 DETERMINACIONES ENZIMATICAS

#### 3.2.1 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA 5'NUCLEOTIDASA Y ADENOSINA DEAMINASA.

Se utilizó la técnica de Kasaki y Sakurada (41) para la determinación de la actividad de estas dos enzimas.

a) 5'Nucleotidasa.- Para el caso de esta enzima, el fundamento de la determinación consiste en adicionar al medio de reacción una cantidad conocida de AMP marcado ( $^{14}\text{C}$ -8-AMP)

de tal manera de que la enzima del tejido lo convierta en adenosina + inosina, que son productos finales radiactivos fácilmente separables por medio de electroforesis en papel y conociendo la radiactividad obtenida en dichos productos, por medio del contador de centelleo, se puede calcular la actividad de la 5'-nucleotidasa.

b) Adenosina Desaminasa.- La determinación de ésta, es muy parecida a la anterior, con la diferencia de que el sustrato en este caso es adenosina marcada ( $^{14}\text{C}$ -8-Adenosina) y el producto es inosina radiactiva.

### 3.2.2. ACTIVIDAD DE ADENOSINA KINASA.

Para esta determinación se ha seguido el método de Long y Kalkman (42), utilizando el mismo homogenado de tejido que para las otras dos determinaciones.

Se fundamenta en llevar a cabo una reacción de conversión de adenosina marcada ( $^{14}\text{C}$ -8-adenosina) en AMP en un medio de incubación con la fuente de enzima y después de cierto tiempo, separar el producto de la reacción por medio de filtración en papel de celulosa DEAE y contando la radiactividad presente de tal manera de correlacionarla con la actividad de la enzima.

### 3.2.3 DETERMINACION ENZIMATICA DE LA S-ADENOSIL-HOMOCISTEINA HIDROLASA.

La determinación de esta enzima se hizo de acuerdo a Suárez M, 1987, (43).

Fundamento: El ensayo se basa en seguir el curso de la reacción de la enzima a 260 nm y calculando la actividad enzimática a partir de la desaparición de sustrato.

Medio de homogenización:

Sacarosa.....0.25mol/L

EDTA.....0.1mmol/L, Tomando en cuenta 9 volúmenes de medio de homogenización por 1 de tejido.

Medio de Incubación:

HEPES.....25mmol/L

MgCl<sub>2</sub>.....2mmol/L

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0.1mmol/L

Para este ensayo se utilizó un espectrofotómetro de doble haz SLM-AMINCO modelo DW-2C y se trabajó a la longitud de onda de 260 nm como se mencionó anteriormente.

Se utilizó un estándar de S-Adenosil Homocisteína de Sigma Chemical, Co. para relacionar la disminución en la pendiente de la cinética de la reacción, con el estándar.

En una celda de 3 ml se colocan:

2.5 ml de medio de incubación

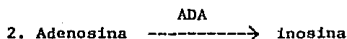
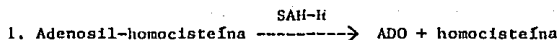
0.4  $\mu$ mol/L de S-Adenosil Homocisteína (sustrato en conc. final)

2  $\mu$ l de adenosina deaminasa (suspensión de 2 mg prot/ml).

En este caso, la enzima hidrolizará el sustrato en homocisteína + adenosina y se observará la

disminución en la absorción a 260 nm al ir reaccionando el sustrato. La adenosina, producto de la hidrólisis, al acumularse, inhibe a la enzima por producto, por lo cual al medio de reacción se le adiciona adenosina deaminasa con el fin de eliminarla de la reacción.

Las reacciones acopladas son las siguientes:



La reacción se inicia con 40  $\mu$ l de homogenado (aprox. 800  $\mu$ g de proteína) y se registra con el graficador el curso de desaparición de sustrato.

### 3.2.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA XANTINA OXIDASA.-

Se han descrito varios métodos para la cuantificación de la actividad de la xantina oxidasa.

En general, los sistemas de ensayo que usan xantina como sustrato son más comunes que el que utiliza hipoxantina, ya que este último implica una oxidación en 2 pasos; primero a xantina y luego a ácido úrico. Los métodos más comunes utilizan el cambio en absorbencia en la región de ultravioleta a 265 ó 270 nm, se puede calcular la actividad de la enzima por desaparición de xantina en ese caso o a 292 nm por aparición de ácido úrico. Otros métodos espectrofotométricos miden la transferencia de electrones

a colorantes que son capaces de desplazar al oxígeno como aceptor de electrones.

Se puede medir el consumo de oxígeno, usando técnicas manométricas o un electrodo sensible al oxígeno.

La mayoría de los métodos más sensibles usan  $Cl_4$ -Xantina marcada o hipoxantina como sustrato. La actividad de la Xantina Oxidasa se calcula entonces a partir de la radiactividad del ácido úrico formado.

Para el presente trabajo se hizo una modificación al método de Stirpe y Della Corte (33, 44), que se basa en la detección de la aparición de ácido úrico a 292 nm. Debido a que el método seguido para esta determinación se desarrolló como parte del trabajo experimental de la tesis, se considerará su descripción dentro del capítulo de resultados.

### 3.3 OTROS ENSAYOS EXPERIMENTALES

#### 3.3.1 DETERMINACION DE PROTEINAS.

La determinación de la concentración de proteínas en los homogenados de tejido, se realizó según el método de Biuret, utilizando un estándar de albúmina sérica bovina de 2.5 mg/ml (45).

#### 3.3.2. EFECTO DEL ETANOL "IN VIVO", EN SANGRE Y REBANADAS DE HIGADO, SOBRE LA DEGRADACION DE PURINAS.

Con el objeto de observar la influencia del etanol en el

metabolismo purínico "in vivo", se trataron 4 grupos de ratas como se indicó para el modelo agudo de etanol y se añadió un grupo control de ratas sin tratamiento. Después de 2 horas de tratamiento, se sacrificaron por decapitación y se recolectó la sangre en un frasco de plástico con heparina y con el hígado se hicieron rebanadas de 26 micras de espesor utilizando la rebanadora de tejidos: Mc Ilwain Tissue Chopper, se incubaron 500 mg de rebanadas en 5 ml de solución de Krebs-Ringer-fosfato con la siguiente composición:

-Cloruro de sodio.....	128.0mmol/L
-Cloruro de Calcio.....	1.4mmol/L
-Sulfato de Magnesio.....	1.4mmol/L
-Cloruro de Potasio.....	5.2mmol/L
-Fosfato dibásico de sodio.	10.0mmol/L

A través de esta solución se hace pasar una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95% - 5%) durante 15 minutos y después se ajusta el pH a 7.4; la incubación se realiza a 37°C durante 30 minutos y después se colocan las muestras en hielo.

En el sobrenadante se mide la concentración de ácido úrico que liberaron las rebanadas y también se mide en el plasma de cada muestra de sangre recolectada por medio del siguiente método colorimétrico, basado en la reducción del ác. fosfotúngstico por el ácido úrico, en medio alcalino a azul de tungsteno. (Modificación del método de Caraway, ref. 46).

Material biológico: 1ml de plasma o de sobrenadante.

Reactivos: Ac. sulfúrico 1.66 mol/L  
 Tungstato de sodio 10Z  
 Ac. Fosfotúngstico.  
 Carbonato de sodio al 14Z  
 Patrón de ácido úrico 1 mg/ml.

Reactivos de trabajo: Ac. Sulfúrico 0.166 mol/l  
 patrón de ác. úrico 1mg/100ml.

Procedimiento:

Desproteínización de la muestra: medir 8ml de ác. sulfúrico 0.083N, añadir 1 ml de muestra y 1 ml de tungstato de sodio al 10Z, filtrar. Medir en tubos de ensaye:

	Blanco	Testigo	Problema
Agua destilada.....	3ml	---	---
Patrón de ác. úrico 1mg/dl..	---	3ml	---
muestra desproteínizada.....	---	---	3ml
ác. fosfotúngstico.....	1ml	1ml	1ml
Carbonato de sodio al 14Z ..	1ml	1ml	1ml

Agitar vigorosamente cada uno de los tubos, dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente (21°C). Leer inmediatamente a 710 nm contra el blanco de reactivos.

Cálculos:

$$\frac{\text{Abs. Problema}}{\text{Abs. Testigo}} \times 10 = \text{mg de ác. úrico} / 100 \text{ ml}$$

Los reactivos para esta determinación fueron donados por el



Laboratorio Central de Reactivos de la Secretaría de Salud.

La concentración de ácido úrico para cada determinación, se relacionó al peso húmedo de las rebanadas y al tiempo, para expresar los resultados como :

mg ác. úrico/ g peso húmedo/ hora.

### 3.3.3. EFECTO DE LA ADENOSINA "IN VITRO".

Otra metodología empleada para medir el metabolismo de la Adenosina "in vitro" fue incubar con adenosina de concentraciones finales  $10^{-8}$  y  $10^{-5}$  mol/L, rebanadas de hígado de ratas intactas (sin tratamiento) y de ratas tratadas con etanol + solución salina (2 h) en solución de Krebs Ringer fosfato y medir la concentración de ácido úrico del mismo modo que el anterior para observar las variaciones.

### 3.3.4. EFECTO DEL ETANOL ADICIONADO "IN VITRO".

De manera similar, para analizar el efecto del etanol sobre el metabolismo purínico "in vitro", se mantuvieron en ayuno ratas sin tratamiento por 18-20 h. Se sacrificaron por decapitación y el hígado se cortó en rebanadas de 26 micras de espesor en el Mc Ilwain Tissue Chopper. Estas se colocaron en medios de incubación que contenían:

- a) 5 ml de Krebs-Ringer fosfato.
- b) 5 ml de Krebs-Ringer fosfato con 25 mmol/L de etanol.
- c) 5 ml de Krebs-Ringer fosfato con 25 mmol/L de etanol y 100  $\mu$ mol/L de adenosina. (18)

y se añadió otro ensayo:

d) 5 ml de Krebs-Ringer fosfato con 25 mmol/L de etanol y 25 mmol/L de adenosina.

Se seleccionó la concentración de adenosina de 100  $\mu$ mol/L debido a que se conocía como la efectiva para modificar el metabolismo del etanol "in vitro" (18). La otra concentración de 25 mmol/L fué escogida de manera arbitraria.

Se escogieron estas concentraciones de adenosina debido a experiencias anteriores en el laboratorio.

Se incubó con agitación moderada durante 2 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se colocó en hielo para detener la incubación y se transfirió a tubos de centrifuga para separar el sobrenadante, en el cual, se determinó la concentración de  $\dot{\text{a}}\text{c.}$  úrico espectrofotométricamente por el método anteriormente descrito; y con las rebanadas, se hicieron los homogenados correspondientes para la determinación de AK, ADA Y SAH-H.

El sistema de reacción a), corresponde a las condiciones del animal control, en el caso b), se conoce el efecto del etanol y con las muestras c) y d), el efecto de la adenosina sobre el etanol a 2 diferentes concentraciones.

### 3.4 CALCULOS.

#### 1.- 5'NUCLEOTIDASA.-

Para calcular la actividad de la 5'Nucleotidasa, se toma en cuenta la radiactividad obtenida al final de la

reacción, tanto en los productos como en los reactivos que quedaron sin reaccionar, por separado. Asimismo, hay que considerar la concentración de ATP (75 nmolas totales) que se colocó en el medio de incubación para cada prueba y el tiempo de incubación de 5 min.

La actividad específica de la 5'-Nucleotidasa, expresada en nmolas de ATP hidrolizado / min / mg de proteína se calcula así:

$$\text{nmol/min/mg prot} = \frac{75 \text{ nmol} \times (\text{cpm Ado} + \text{cpm Ino})}{5 \text{ min} \times \text{mg prot} \times (\text{cpm ATP} + \text{Ino} + \text{Ado} + \text{Ade})}$$

de donde Ado= Adenosina

Ino= Inosina

ATP= Trifosfato de Adenosina

y Ade= Adenina.

## 2.- ADENOSINA DEAMINASA.-

En el caso de la Adenosina Deaminasa, se hace la misma consideración, en cuanto a la radiactividad de sustratos y producto, sólo que la concentración de sustrato es diferente: 15 nMolas totales de Adenosina, con lo cual se calcula la actividad específica de la enzima utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{nmol/min/mg de prot} = \frac{15 \text{ nmol} \times \text{cpm Inosina}}{5 \text{ min} \times \text{mg prot} \times (\text{cpm Ino} + \text{Ado})}$$

### 3.- ADENOSINA KINASA.-

En cada muestra para la determinación de Adenosina Kinasa, se tiene un blanco y un total de radiactividad que hay que tomar en cuenta para calcular la actividad de la enzima, con estos datos se realiza la siguiente operación:

$$\text{Radiactividad relativa} = \frac{\text{cpm problema} - \text{cpm blanco}}{\text{cpm total}}$$

$$\text{nmol/min/mg de prot} = \frac{\text{Rad. rel.} \times 4 \text{ nmol}}{5 \text{ min} \times \text{mg prot en la muestra}}$$

### 4.- S-ADENOSIL HOMOCISTEINA HIDROLASA

Para los cálculos en el caso de la determinación enzimática de la SAH-H, se toma en cuenta la absorción de 100 pmol de SAH (estándar) a 260 nm en el espectrofotómetro de doble haz. En el momento del ensayo, se registra gráficamente la variación de absorbencia/min de la hidrólisis de SAH, debida a la enzima y se relaciona con la del estándar, esto se obtiene calculando la pendiente de la gráfica que resulta de la reacción (velocidad de reacción) para realizar el siguiente cálculo:

$$\begin{array}{l} \text{Abs estándar} \text{ -----} 100 \text{ pmol} \\ \text{Abs./min problema} \text{ ----} X \end{array}$$

$$X = \text{pmol de SAH hidrolizado/min}$$

Este valor relacionado con el contenido total de proteína en el tejido utilizado, permite calcular la actividad específica expresada como:

$$\text{pMol / min / mg de proteína.}$$

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 4 experimentos. Para conocer el número exacto de repeticiones para cada ensayo o los datos numéricos, se pueden consultar las tablas que se anexan al final de la tesis.

Las letras que se encuentran sobre algunas de las barras de cada gráfica corresponden a la significancia estadística, la cual se ha calculado de acuerdo al método de t de student, comparando cada dato de cada barra con su respectivo control. En los casos donde se han omitido las letras sobre las barras, es donde no se encontró significancia estadística para los valores de actividad enzimática.

# 4. Resultados

#### 4. RESULTADOS

Dentro de la parte experimental de este trabajo, se encuentra la determinación de las enzimas que metabolizan a la adenosina, de tal manera que la sección de resultados se dividirá en dos partes; primero la que corresponde a la actividad de las enzimas que metabolizan a la adenosina directamente: la 5'-N, ADA, AK, y SAH-H durante la intoxicación aguda y crónica con etanol en hígado de rata; posteriormente, dentro de este mismo capítulo, se presentará la técnica desarrollada para la determinación de la Xantina Oxidasa, otra enzima del metabolismo de la adenosina, que fué la más estudiada dentro de este trabajo, junto con los resultados obtenidos en la medición de la actividad de dicha enzima en cada uno de los diferentes modelos experimentales.

##### 4.1 ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS QUE METABOLIZAN A LA ADENOSINA

###### MODELO DE INTOXICACION AGUDA CON ETANOL

###### EXPERIMENTO "IN VIVO"

###### 1. Actividad de la 5'-nucleotidasa.-

En la FIGURA 1 se puede apreciar, que la actividad de la 5'-nucleotidasa, referida a mg de proteína no se modifica significativamente con los diferentes tratamientos, comparativamente con las ratas intactas (sin tratamiento).

###### 2.- Actividad de la Adenosina deaminasa.-

En el caso de la adenosina deaminasa, en la FIGURA 2 se observa solamente un aumento de 0.4 veces con glucosa+ADO,

pero no con el etanol, ni con el tratamiento simultáneo de etanol con adenosina.

### 3.- Actividad de la Adenosina kinasa.-

En la FIGURA 3, se puede ver también la actividad de la adenosina kinasa. Existen pequeñas diferencias, no significativas, en la respuesta al tratamiento con etanol, sin embargo, hay cambio en la respuesta a la adenosina al igual que con la adenosina deaminasa de manera que se aumenta la actividad de 0.045 nmol/min/mg a 0.074. Lo mismo sucede en el caso del tratamiento con etanol más adenosina.

### 4.- Actividad de la S-adenosil-homocisteína hidrolasa.-

Con respecto a la SAH-H, en la FIGURA 4 se observa que existe un aumento en la actividad del 14% en el caso del tratamiento con glucosa más adenosina, que no es estadísticamente significativo debido al error estándar. En el caso de la respuesta al etanol, tampoco se afecta la respuesta de la actividad de la enzima, es decir, no tiene efecto apreciable.

Si se considera que la 5'-nucleotidasa y la SAH-H, constituyen las enzimas encargadas de la formación de adenosina, se puede ver que el alcohol no contribuye a modificar la formación de ésta en el modelo agudo "in vivo", y con respecto a las enzimas de utilización (Adenosina kinasa) y degradación (Adenosina deaminasa), tampoco se afectan con los mismos tratamientos.



I. RATA SIN TRATAMIENTO  
G.S. GLUCOSA - SALINA  
G.A. GLUCOSA - ADENOSINA  
E.S. ETANOL - SALINA  
E.A. ETANOL - ADENOSINA

nM/min/mg

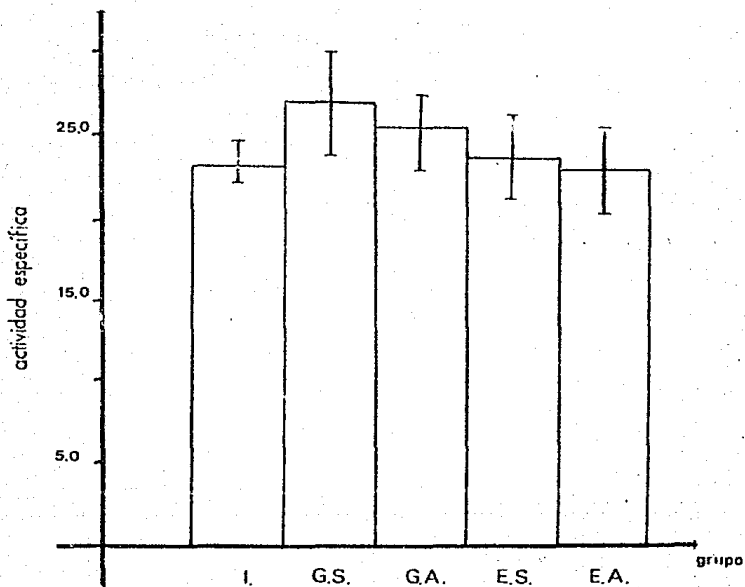


FIG. 1 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA 5' NUCLEOTIDASA  
MODELO AGUDO DE INTOXICACION CON ETANOL.

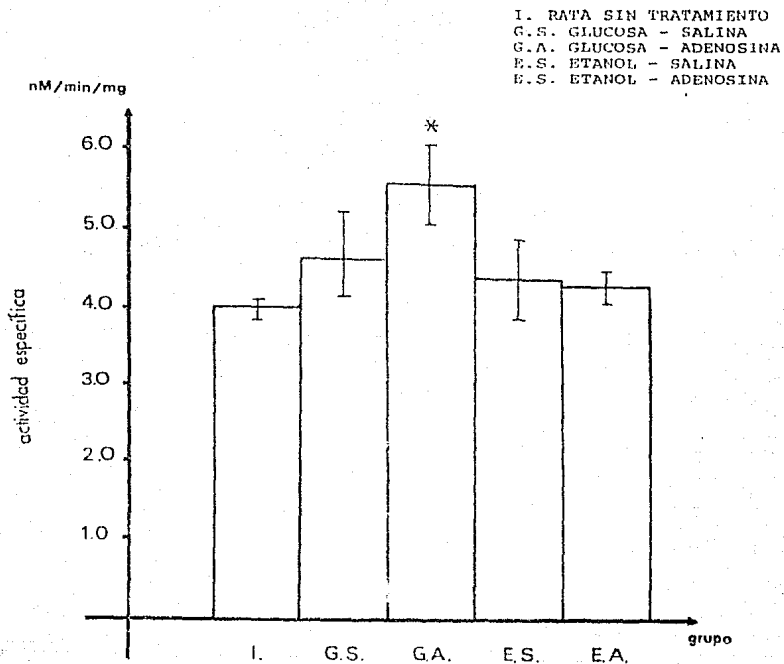


FIG. 2 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ADENOSINA  
 DEAMINASA. MODELO AGUDO  
 DE INTOXICACION CON ETANOL.

\*  $p < 0.01$

I. RATA SIN TRATAMIENTO  
G.S. GLUCOSA - SALINA  
G.A. GLUCOSA - ADENOSINA  
E.S. ETANOL - SALINA  
E.A. ETANOL - ADENOSINA

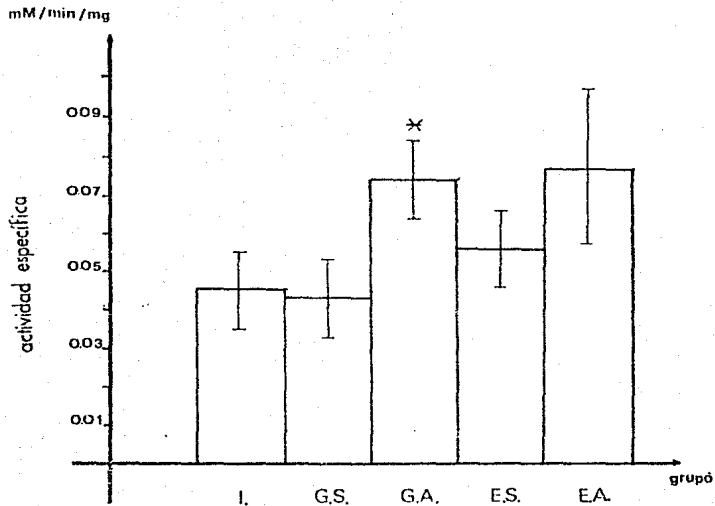


FIG. 3 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ADENOSINA  
KINASA. MODELO AGUDO  
DE INTOXICACION CON ETANOL.

\*  $p > 0.05$

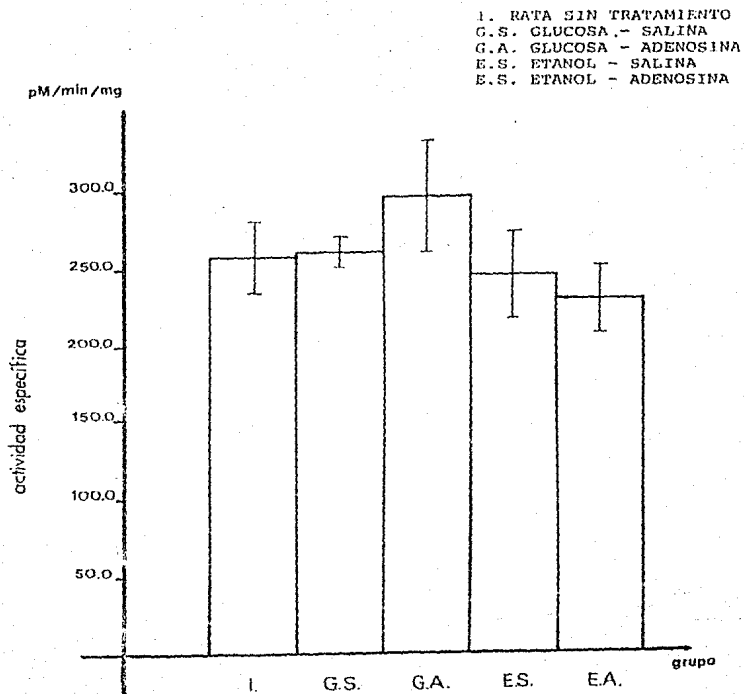


FIG.4 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA S- ADENOSIL-  
 HOMOCISTEINA - HIDROLASA.

MODELO AGUDO  
 DE INTOXICACION CON ETANOL.

## 4.2 ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS QUE METABOLIZAN A LA ADENOSINA

### MODELO CRONICO

#### EXPERIMENTO "IN VIVO"

Se realizaron las mismas determinaciones enzimáticas para el caso del modelo agudo de intoxicación con etanol. Este modelo experimental se encuentra explicado con detalle en el capítulo de materiales y métodos.

#### 5.- Actividad de la 5'-nucleotidasa.-

Observando la FIGURA 5, se puede detectar que tampoco existen cambios apreciables en la actividad de esta enzima que es una de las encargadas de la formación de la adenosina, ni en respuesta a la intoxicación con etanol, ni en el caso de tratar a los animales con etanol más adenosina.

No se pueden referir los resultados de los 2 modelos, tanto agudo como crónico, como comparables, se toman en cuenta por separado, ya que en el segundo modelo, las ratas utilizadas, después del tratamiento crónico, tenían mayor edad que las del caso agudo. Aquí es importante tomar en cuenta la edad de las ratas, ya que pueden existir variaciones en los valores normales de cada enzima debidas a la edad; además que los controles tanto de solución salina como de adenosina, en el caso de la intoxicación crónica, no involucran a la glucosa administrada por intubación gástrica, sino que

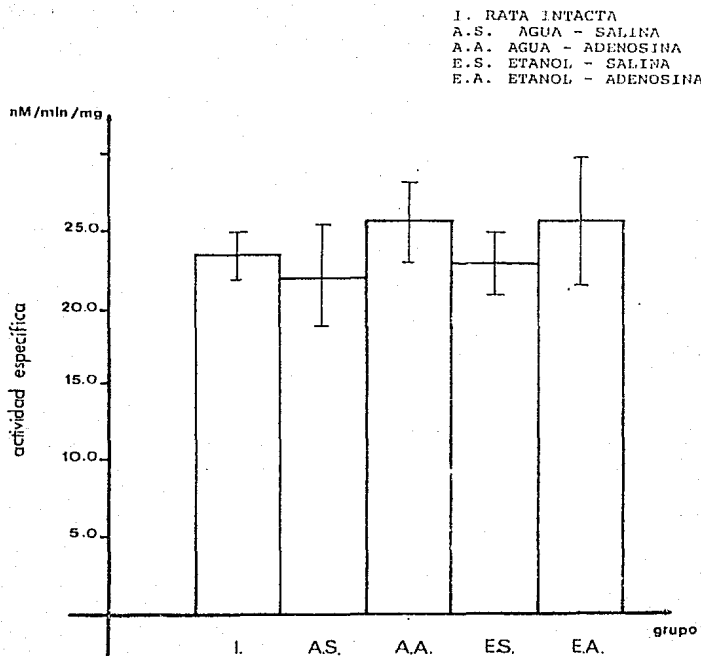


FIG. 5 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA 5'-NUCLEOTIDASA  
 MODELO CRONICO DE INTOXICACION CON ETANOL.

únicamente se les administra intraperitonealmente la solución salina o la adenosina.

#### 6.- Actividad de la Adenosina deaminasa.-

En la FIGURA 6 se presenta la actividad de esta enzima. En ella se observa una ligera disminución con el tratamiento de agua + adenosina, de 4.06 a 3.26 nmol/mín/mg de proteína, siendo que el tratamiento crónico con etanol + adenosina evita esa disminución y al contrario, se incrementa un poco por arriba del valor correspondiente para las ratas intactas (4.86 nmol/mín/mg). No hay respuesta significativa para el caso del etanol solamente.

#### 7.- Actividad de la Adenosina kinasa.-

Para la determinación de esta enzima, el análisis de la FIGURA 7 indica que el modelo crónico refleja un aumento que es significativo para el caso del etanol ( $p < 0.1$ ). Este aumento no es retornado a valores normales por la adenosina. Se observa también un aumento con agua + solución salina, que en el caso de agua + ADO, no se presenta. Se puede pensar en el estrés provocado por la inyección de solución salina pero la ADO también se inyecta, entonces se sugiere que ésta evita el estrés, lo cual ha sido observado en el laboratorio con anterioridad (datos no publicados).

#### 8.- Actividad de la S-adenosil-homocisteína hidrolasa.-

Con respecto a la SAH-H, existe un aumento del 20% provocado

I. RATA INTACTA  
A.S. AGUA - SALINA  
A.A. AGUA - ADENOSINA  
E.S. ETANOL - SALINA  
E.A. ETANOL - ADENOSINA

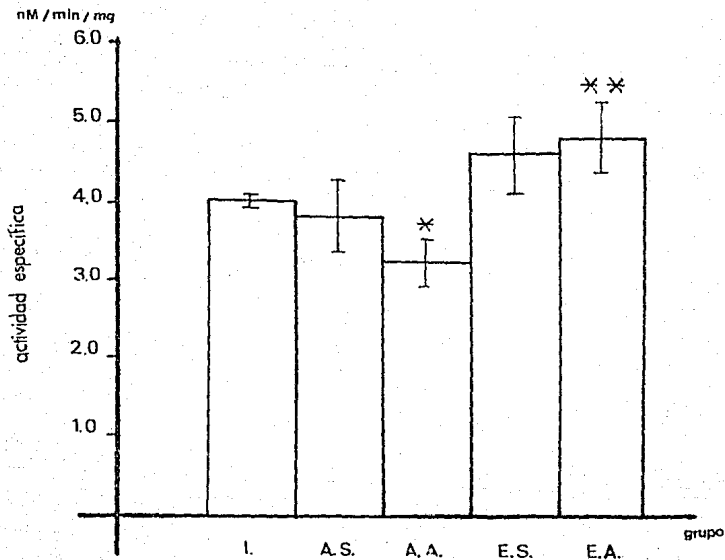


FIG. 6 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ADENOSINA  
DEAMINASA. MODELO CRONICO  
DE INTOXICACION CON ETANOL.

\*  $p < 0.01$

\*\*  $p < 0.1$



I. RATA INTACTA  
 A.S. AGUA - SALINA  
 A.A. AGUA - ADENOSINA  
 E.S. ETANOL - SALINA  
 E.A. ETANOL - ADENOSINA

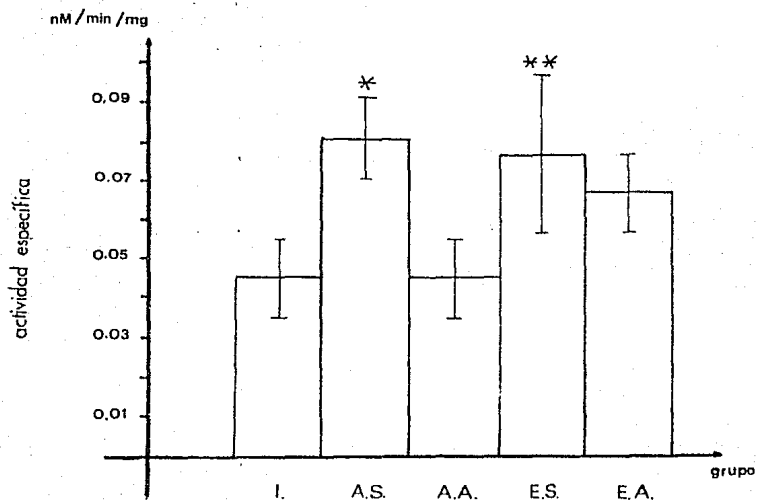


FIG. 7 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ADENOSINA KINASA. MODELO CRONICO DE INTOXICACION CON ETANOL.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.1$

por la acción de la adenosina. Este aumento es evitado por el etanol. El etanol por sí solo no tiene efecto apreciable. (FIGURA 8).

En la actividad de la adenosina deaminasa y adenosina kinasa que son enzimas de degradación y utilización respectivamente, se empiezan a observar cambios ligeros que en sí no son promovidos por el etanol, sino que se considera que podrían deberse a la edad de los animales.

I. RATA INTACTA  
A.S. AGUA - SALINA  
A.A. AGUA - ADENOSINA  
E.S. ETANOL - SALINA  
E.A. ETANOL - ADENOSINA

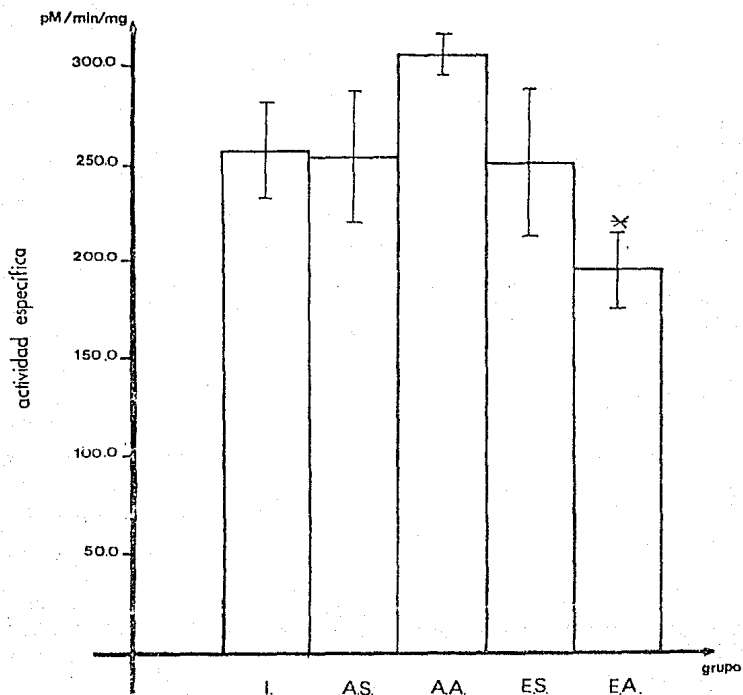


FIG. 8 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA S-ADENOSIL-HOMOCISTEINA-HIDROLASA MODELO CRONICO, DE INTOXICACION CON ETANOL

\*  $p < 0.05$

#### 4.3. OPTIMIZACION EXPERIMENTAL DE LA DETERMINACION DE LA XANTINA OXIDASA

En este capítulo, se presenta la técnica que se desarrolló como parte del trabajo experimental de esta tesis, para la determinación de la actividad de la Xantina Oxidasa .

La determinación de la Xantina Oxidasa implica una técnica en la cual se pueda detectar la actividad tanto de la forma D de la enzima (deshidrogenasa  $\text{NAD}^+$  dependiente), como de la forma O (oxidasa) que se han mencionado anteriormente. El ácido úrico, producto de la reacción, es común para las dos formas de la enzima; el  $\text{NADH}$  es un producto secundario de la primera y el peróxido de hidrógeno para la segunda. Con esto, el fundamento del método consiste en detectar la actividad de la forma O por medio de la formación de ácido úrico a 292 nm, la actividad de la forma D se conoce con la medición de ácido úrico a 292 nm después de haber adicionado  $\text{NAD}^+$  al medio y principalmente por la determinación del producto secundario:  $\text{NADH}$ .

a). Utilización de  $\text{NAD}^+$ . - Se realizaron ensayos con y sin  $\text{NAD}^+$  respectivamente, ya que la forma D de la enzima lo utiliza como coenzima . Se midió la formación del producto principal, ácido úrico, a 292 nm antes de agregar el  $\text{NAD}^+$  y después de adicionarlo al medio de reacción (Figs. 9,10,12 y 13) . La actividad de la forma D de la enzima, se calculó valorando la formación de  $\text{NADH}$  a 340 nm (Figs. 11 y 14).

Todas las determinaciones se realizaron en un

espectrofotómetro de doble haz SLM-AMINGO modelo DW-2C con portaceldas con baño de temperatura controlada a 23°C.

b). Eliminación del NADH.- En algunos casos, se añadió piruvato y lactato deshidrogenasa para regenerar el  $\text{NAD}^+$  inmediatamente de que se forma el NADH, para determinar la actividad total de la enzima, ya que se ha informado que el NADH que se forma durante la reacción inhibe parcialmente a la Xantina Oxidasa en pocos segundos (Della Corte y Stirpe, 1970 ) (47). En el caso de las gráficas 9,10, 12 y 13, los dos últimos grupos de barras representan los resultados de la actividad de la xantina oxidasa en donde se ha eliminado el NADH al haber adicionado piruvato y lactato deshidrogenasa. En las figuras 11 y 14, se observa la actividad enzimática de la forma D en presencia del mismo sistema regenerador de  $\text{NAD}^+$ .

c). Protección con Ditiotreitol (DTT).- La enzima se sintetiza bajo la forma de deshidrogenasa . Si la homogenización del tejido no se hace con cuidado , se transforma en la enzima tipo O, como resultado de una oxidación de grupos sulfhidrilo o de una proteólisis parcial. Se tiene que homogeneizar a 4°C con amortiguadores que contengan inhibidores de proteasas y de la oxidación de grupos sulfhidrilo. Mc Cord, 1985, (35).

Con el fin de observar el efecto como protector de grupos sulfhidrilo, se utilizó Ditiotreitol (DTT), empleando

como control ensayos sin DTT. En el caso de hacer la determinación con DTT, éste se adicionó al medio de homogenización en una concentración final de 3 mmol/L.

Dichos resultados se localizan en las gráficas 9 a la 14, para ambos modelos de intoxicación con etanol.

El hígado se homogenizó en Tris-HCl 0.1mol/L pH 8.1 en hielo (4°C), de tal manera que se tuviera una relación de 1 g de tejido en 5 ml de amortiguador. (Rowe y Wyngaarden, 1966), (48).

d) Pruebas de optimización del homogenado. - De acuerdo a lo publicado por Rowe, el homogenado se tiene que tratar por ultrasonido durante 2 min. centrifugar primero a baja velocidad (3500 rpm) y luego a alta velocidad (45000 rpm). Después de ello, el sobrenadante se dializa y con ello, se obtiene la enzima parcialmente purificada, pero como éste no era el fin de este trabajo, se realizaron varias pruebas con y sin desintegración por ultrasonido, centrifugando sólo a alta velocidad (45000 rpm), sin dializar el sobrenadante y con ello se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos con la enzima parcialmente purificada:

a 292 nm:

Sin DTT. Con el homogenado tratado con ultrasonido se obtuvo una actividad de 1.1 veces la actividad del homogenado sin tratar.

Con DTT. Homogenado tratado con ultrasonido: 1.06 veces su control.

a 340 nm:

Sin DTT. El homogenado tratado con ultrasonido presentó una actividad del 90% de la obtenida con el mismo homogenado sin tratar.

Con DTT. El ensayo con el homogenado tratado con ultrasonido, tuvo una actividad del 89% de la correspondiente a su control.

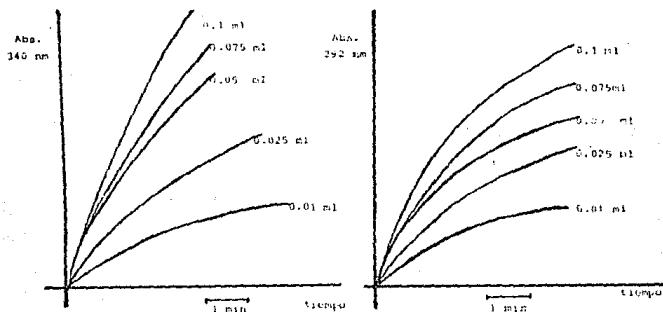
e) Congelación.- Posteriormente se comprobó el efecto de la congelación del homogenado sobre la actividad de la enzima, con el fin de conocer la estabilidad y la posibilidad de almacenar las muestras congeladas hasta disponer de material suficiente para realizar posteriormente la determinación simultánea de la enzima en cada una. Se encontró que la congelación disminuye la actividad de la enzima, por lo cual la determinación de ésta tiene que realizarse en el mismo día en que se obtiene la muestra:

Si se toma en cuenta la actividad enzimática de la xantina oxidasa del día 0 como el 100%, ésta va disminuyendo en los siguientes días según se indica:

	DIA 0	DIA 1	DIA 2
292 nm	100%	83%	73%
340 nm	100%	58%	25%

(número de experimentos = 4)

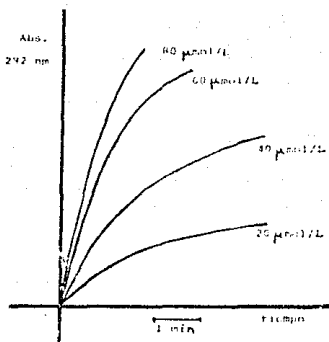
f) Cantidad de enzima. - Se probó asimismo la cantidad óptima de homogenado para el ensayo, registrando gráficamente los cambios de absorción por unidad de tiempo, con diferentes cantidades de homogenado, obteniéndose linealidad y sensibilidad en el método con 0.05 ml de homogenado. Las gráficas obtenidas son las siguientes:



g) Determinación de la concentración de sustrato. - Se probaron también diferentes concentraciones de xantina, con y sin adición de DTT y Pir-LDH para poder determinar la velocidad de la reacción y comprobar que la velocidad inicial de la formación de ác. úrico y NADH es proporcional a la concentración de xantina utilizada. Con ésto, obtener una velocidad de reacción lineal, suficientemente observable, medible y cuantificable. En el ensayo se utilizó una concentración final de  $60 \mu\text{mol/L}$ . La gráfica realizada a 292 nm con diferentes cantidades de homogenado, se muestra a



continuación:



Algunas consideraciones importantes sobre la técnica son las siguientes:

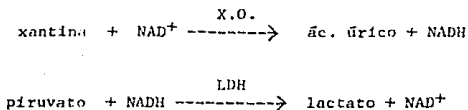
Con el objeto de valorar la actividad tanto de la forma O como de la forma D de la enzima, se midió la velocidad de la reacción y se determinó la velocidad inicial sin adicionar  $\text{NAD}^+$ , para la forma O; después de observar una disminución en la velocidad de la reacción como resultado de la saturación de la enzima con respecto a su sustrato, se le adicionó  $\text{NAD}^+$ , para iniciar la reacción de la forma D de la Xantina Oxidasa. La concentración de  $\text{NAD}^+$  fue optimizada también y se utilizó a 60  $\mu\text{mol/L}$  de concentración final.

Se observó asimismo que, utilizando xantina como sustrato, la pendiente se incrementaba con la concentración adicionada de  $\text{NAD}^+$ .

Otra variable del sistema fue eliminar el producto que se

acumula en la reacción (NADH), el cual inhibe a la xantina oxidasa. Para ello, se acopló un sistema de Piruvato-Lactato Deshidrogenasa.

La secuencia de reacciones acopladas es la siguiente:



Con esto se observó que, efectivamente, las pendientes (velocidad de reacción) se incrementaban al eliminar el NADH del medio, lo cual parece confirmar la acción inhibitoria del NADH sobre la enzima. Cuando se realiza el ensayo a 340 nm, al agregar solamente  $\text{NAD}^+$ , se observa una pendiente de producción de NADH aún sin agregar la xantina, lo que indica que hay una gran cantidad de deshidrogenasas inespecificas en el medio y sustratos oxidables y por lo tanto, hay formación endógena de NADH. Para evitar esto, se agregó el  $\text{NAD}^+$  no a manera de iniciar la reacción, sino desde el principio y luego la xantina para comenzar la reacción y ver el cambio en la pendiente. Con esto lo que se observa es que la pendiente es de desaparición de NADH que se está formando y al mismo tiempo está siendo consumido por el sistema piruvato-LDH.

Finalmente, se llegó a las condiciones de reacción consideradas como óptimas para la determinación de la xantina

oxidasa para el modelo experimental y se mencionan a continuación:

#### MEDICION DE PRODUCCION DE AC.URICO A 292 nm.

Después de sacrificar al animal, se extrae rápidamente el hígado y se homogeniza con amortiguador Tris-HCl 0.1mol/L pH 8.1 en proporción (1 g :5 ml) (tejido:liquido).

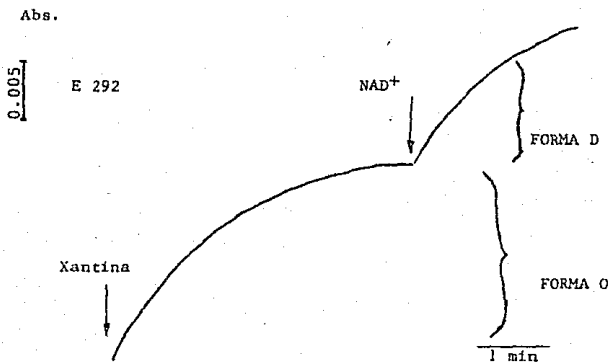
La muestra se centrifuga a 45,000 rpm durante 45 minutos y se obtiene el sobrenadante que es la fuente de enzima.

Para el ensayo se prepara lo siguiente para cada prueba:

	Blanco	Problema
Tris-HCl 1mol/L pH8.1 .....	0.3 ml	0.3 ml
Homogenado.....	0.05 ml	0.05 ml
Agua.....	2.65 ml	2.59 ml
se inicia la reacción con		
Xantina 6 mmol/L.....	—	0.03 ml
y se lee en el espectrofotómetro a 292 nm, después se adiciona:		
NAD <sup>+</sup> 6 mmol/L.....	—	0.03 ml
y se sigue la lectura sobre el mismo trazo anterior correspondiente a la xantina.		

Con este ensayo se determinó la actividad de la forma O de la enzima, tanto con un homogenado con DTT como sin DTT, en una concentración final de 3 mmol/L. Para medir la actividad de la forma D de la enzima después de haber

reaccionado toda la forma O, se adicionó el  $\text{NAD}^+$  y la gráfica que se obtuvo con este ensayo es la siguiente:



El medio de reacción del sistema acoplado Pir-LDH contiene lo siguiente:

	Blanco	Problema
Tris-HCl 1mol/L pH 8.1 .....	0.3 ml	0.3 ml
Homogenado.....	0.05 ml	0.05 ml
Piruvato de sodio 3 mmol/L...	0.5 ml	0.5 ml
LDH (10 mg prot/ml).....	0.001ml	0.001ml
Agua.....	2.15 ml	2.09 ml
xantina 6mmol/L →.....	—	0.03 ml
$\text{NAD}^+$ 6 mmol/L →.....	—	0.03 ml

Aquí también se inicia la reacción con xantina y después de un tiempo (aproximadamente 3-5 min), al observar una

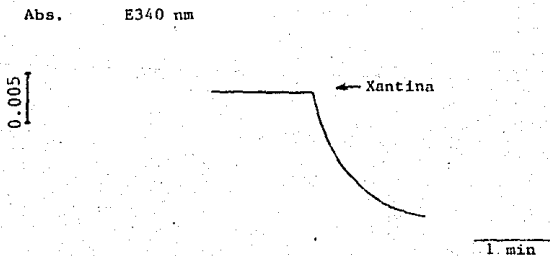
depleción en la gráfica, se adiciona el  $\text{NAD}^+$ . Este sistema se probó también con y sin DTT.

#### MEDICION DE NADH A 340 nm.

La determinación a 340 nm, exclusiva para la forma D de la xantina oxidasa, se realizó con el siguiente medio de reacción:

	Blanco	Problema
Tris-HCl 1mol/L pH 8.1 .....	0.3 ml	0.3 ml
Piruvato de Na 3 mmol/L.....	0.5 ml	0.5 ml
LDH (10 mg prot/ml).....	0.001 ml	0.001 ml
$\text{NAD}^+$ 6 mmol/L.....	0.03 ml	0.03 ml
Homogenado.....	0.05 ml	0.05 ml
Agua.....	2.12 ml	2.09 ml
se inicia la reacción con:		
Xantina 6 mmol/L .....	—	0.03 ml

Obteniéndose de este modo una gráfica como la que se muestra a continuación:



Lo anterior indica que se está produciendo NADH y éste

está siendo consumido por el sistema Pir-LDH, de ahí que la pendiente sea descendiente.

Al igual que en los casos anteriores, este experimento se realizó con y sin DTT.

Para el cálculo de la actividad de la enzima, se toma en cuenta el incremento o decremento de la absorción a 292 nm y 340 nm respectivamente. Se traza una tangente que representa la pendiente, en el inicio de la curva que indica el curso de la velocidad inicial de la reacción.

Se han tomado en cuenta los coeficientes de extinción molar del ácido úrico a 292 nm y del NADH a 340 nm en celdas de 1 cm de paso de luz y volumen de 1 ml, que corresponden a los siguientes valores:

Coef. de extinción molar para el ácido úrico (292 nm):

$$\epsilon_{292} = 12.15 \text{ cm}^2/\text{Mol}$$

Coef. de extinción molar para el NADH (340 nm):

$$\epsilon_{340} = 6.2 \text{ cm}^2/\text{Mol} \quad , \text{ Bergmeyer, 1965. (11)}$$

Con ello, de acuerdo a la Ley de Lambert y Beer tenemos que:

$$c = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d}$$

donde,  $\Delta A$  = cambio en la absorción

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar ( $\text{cm}^2/\text{Mol}$ )

$c$  = concentración de la sustancia

$d$  = paso de luz de la celda (cm)

para calcular la actividad catalítica,

$$z = \frac{\Delta A \times V}{E \times d \times \Delta t}$$

donde z= actividad catalítica,

$\Delta t$ = intervalo de tiempo utilizado para las determinaciones (1 min),

V= volumen total del ensayo (3 ml).

De esta manera se obtiene la actividad enzimática expresada como  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Se expresaron los resultados como  $\text{nmol}/\text{min}$  por ser tan pequeña la cantidad de producto formado.

Tomando en cuenta la concentración de proteínas en el homogenado de tejido que se utilizó para el ensayo, se obtiene la actividad específica:

$\text{nMol} / \text{min} / \text{mg}$  de proteína

De acuerdo a lo establecido anteriormente como la técnica definida de determinación enzimática de la xantina oxidasa, se presentan a continuación los resultados obtenidos de dichas determinaciones bajo los dos modelos de experimentación: agudo y crónico.

#### 4.4 RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LA XANTINA OXIDASA

##### 4.4.1. ACTIVIDAD DE LA XANTINA OXIDASA. DETERMINACION DE FORMACION DE ACIDO URICO A 292 nm.

##### MODELO DE INTOXICACION AGUDA CON ETANOL. "IN VIVO".

Se realizaron varios ensayos de tal manera de valorar tanto la actividad de la forma O como de la forma D de la enzima.

##### - ENSAYO SIN DTT.

En la FIGURA 9 se considera la determinación de la actividad de la enzima en ausencia de ditionitrosito, protector de grupos sulfhidrilo, tanto para la forma O de la enzima como para la forma D.

Con el tratamiento de glucosa + solución salina, hay un incremento del doble en la actividad con respecto al control. El etanol la aumenta de 4.94 a 11.0 nmol/min/mg de proteína y el tratamiento de etanol + ADO es incapaz de retornarlo a niveles normales, en general, se observa un aumento de actividad enzimática para todos los casos.

En el caso de adicionarle  $\text{NAD}^+$ , para detectar la forma D de la enzima, se encuentra que existe un aumento de actividad por la acción de la adenosina en relación al control, es decir, tanto en el caso de glucosa-adenosina como de etanol adenosina, la actividad de la xantina oxidasa en su forma D, aumenta significativamente. Por otro lado, no hay respuesta



- 1- RATA INTACTA
- 2- GLUCOSA - SALINA
- 3- GLUCOSA - ADENOSINA
- 4- ETANOL - SALINA
- 5- ETANOL - ADENOSINA

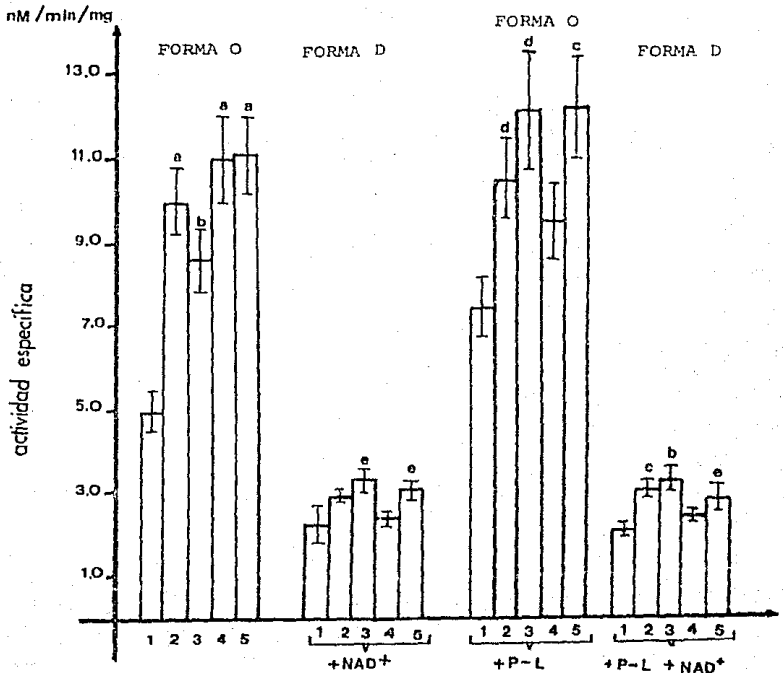


FIG. 9 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA XANTINA OXIDASA.  
 MODELO AGUDO. ENSAYO SIN DTT.  
 FORMACION DE AC. URICO a 292 nm.

a  $p < 0.001$   
 b  $p < 0.005$   
 c  $p < 0.01$

d  $p < 0.25$   
 e  $p < 0.05$

de la enzima con respecto al etanol.

- ENSAYO SIN DTT + PIRUVATO/LACTATO DESHIDROGENASA (P-L)

La misma FIGURA 9 muestra este ensayo, en los dos últimos grupos de barras, en donde se ha adicionado al medio el sistema de piruvato + lactato deshidrogenasa, con el objeto de eliminar el NADH del medio, que como se ha descrito anteriormente, se considera inhibidor de la enzima.

En el caso de la actividad enzimática para la rata intacta, se observa que hay un aumento del 50% en la actividad de la enzima en comparación con el caso en el cual no se ha eliminado el NADH del medio. Con glucosa + salina se incrementa en un 40% con respecto al control tal vez por la glucosa. Para el dato correspondiente a la barra 3 (glucosa + adenosina), existe un incremento del 50% con respecto al control, lo cual es significativo. Para el caso de el tratamiento con etanol + salina, no se detectó diferencia significativa con respecto a su control, sin embargo, en donde se administró adenosina a las ratas intoxicadas con etanol, se encontraron valores similares a los de glucosa + adenosina.

Cuando se adiciona  $\text{NAD}^+$ , los resultados son similares al caso anterior, no se promueve la activación de la forma D por quitar el NADH de medio.

Dá la impresión de que los diversos tratamientos promueven la eliminación de NADH por un sistema diferente al usado y no

se aprecia la diferencia con los casos en los que no se tenía el sistema Pir-LDH.

- ENSAYO CON DTT.

Este ensayo se realizó con el objeto de verificar el efecto protector del DTT sobre la enzima al evitar la oxidación de los grupos -SH. La FIGURA 10 indica que efectivamente, en el caso de la rata intacta, se observa un aumento de la actividad enzimática primero comparada con la fig.9 en donde no se adicionó DTT, luego, comparando los demás grupos experimentales, en donde se observa que aumenta la actividad en todos, pero más en el caso de etanol + salina (aumenta 50%), el cual es disminuido por la acción de la adenosina (etanol+ADO).

Cuando se adiciona  $NAD^+$ , todos los grupos se comportan de la misma manera, es decir, no hay diferencias ni con el de las ratas intactas.

- ENSAYO CON DTT + Pir-LDH.

En este caso igualmente, se adicionó el sistema eliminador de  $NADH$ , y al parecer, son "protecciones" aditivas del sistema junto con el DTT, ya que para el caso de las ratas intactas se obtiene el máximo valor de actividad enzimática en promedio (8.3 nmol/min/mg de proteína). Se aprecian incrementos de actividad significativos ( $p < 0.02$ ) para el caso de etanol + ADO, con respecto a la de ratas intactas, sin embargo, no se ven los incrementos en la actividad tan altos

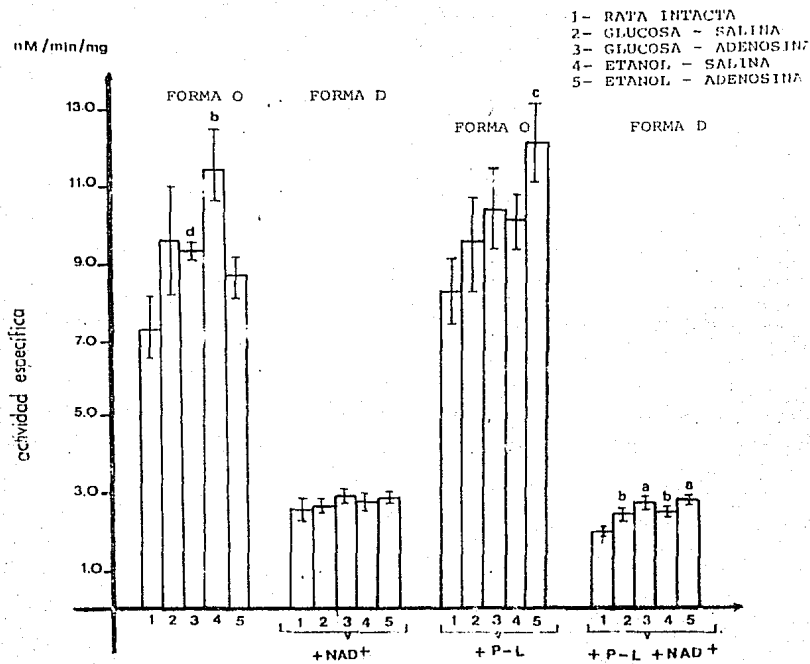


FIG. 10 FORMACION DE AC. URICO A 292 nm POR LA XANTINA OXIDASA. MODELO AGUDO DE INTOXICACION ENSAYO CON DTT.

a  $p < 0.001$       c  $p < 0.02$   
b  $p < 0.01$       d  $p < 0.025$

como para el caso de SIN DTT + Pir/LDH. (FIGURA 9 Y 10).

En este mismo ensayo, al adicionar  $\text{NAD}^+$ , se observan aumentados todos los casos en que se incluyó algún tratamiento.

Se observa que la actividad enzimática en las barras a las que se les ha adicionado  $\text{NAD}^+$  es menor con respecto a los primeros grupos de barras que representan a la forma O, ya que al no haber adicionado al medio algún inhibidor del ciclo  $\text{NAD}^+$ -NADH, una parte de la forma D de la enzima pudo haber reaccionado al mismo tiempo que la forma O, debido al  $\text{NAD}^+$  endógeno de la muestra, por lo que fué más representativo medir dicha forma D por medio de la determinación de su producto secundario: NADH.

#### 4.4.2 DETERMINACION DE NADH A 340nm. MODELO AGUDO

##### "IN VIVO".

Dentro de este mismo modelo agudo "in vivo", se realizó la determinación de NADH a 340 nm, el cual es uno de los productos de la reacción de la enzima en su modalidad de deshidrogenasa. Se hizo ésto con el fin de valorar mejor esta forma D de la enzima ya que el producto principal, ácido úrico, es común para los dos tipos de enzima, tanto la forma O como la forma D.

En esta determinación, se incluyen asimismo ensayos sin DTT y con DTT como se ha descrito en la sección del método para la determinación de la Xantina Oxidasa.

- ENSAYO SIN DTT.

En la FIGURA 11 se observa que existe un incremento en la formación de NADH en el caso del tratamiento con glucosa + salina ( $p < 0.05$ ); en el caso de glucosa + ADO decrece a valores normales (9.96 nmol/min/mg), lo que indica que el aumento es debido a una respuesta a la glucosa. En el caso del etanol, no hay variaciones significativas con respecto al grupo control; la adenosina + etanol disminuyen la actividad comparando con el grupo de etanol solo, de 12.56 a 10.18 nmol/min/mg de prot.

- ENSAYO CON DTT.

En este caso, no se observan valores de actividad más altos que los obtenidos sin adicionar DTT, es decir, para la forma D, no se observa el efecto protector del ditiotreitól, sin embargo, se observa que no existe la respuesta a la glucosa y con respecto al etanol, no existe incremento significativo de la actividad de deshidrogenasa. (FIGURA 11)

MODELO DE INTOXICACION CRONICA CON ETANOL

Como se ha descrito en el capítulo de materiales y métodos, se estudiaron los mismos grupos experimentales que para el modelo agudo en el caso de los grupos con etanol; la diferencia fué el tipo de tratamiento de intoxicación, en donde el etanol fué administrado durante 8 semanas en el bebedero. Los controles para este caso, fueron ratas sin

- 1- RATA INTACTA
- 2- GLUCOSA - SALINA
- 3- GLUCOSA - ADENOSINA
- 4- ETANOL - SALINA
- 5- ETANOL - ADENOSINA

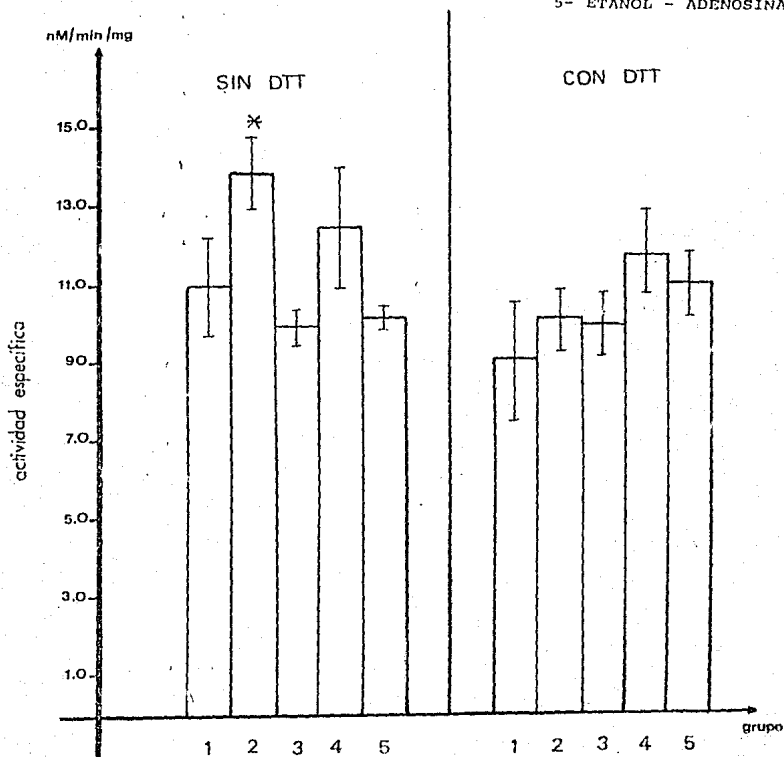


FIG. 11 FORMACION DE NADH a 340nm.

XANTINA OXIDASA.

MODELO AGUDO.

DE INTOXICACION

\*  $p < 0.05$

tratamiento y ratas sin tratamiento inyectadas con solución salina o adenosina por vía intraperitoneal.

#### 4.4.3. DETERMINACION DE AC. URICO A 292 nm.

##### MODELO CRONICO "IN VIVO"

###### - ENSAYO SIN DTT.

Es de importancia mencionar que el valor de ácido úrico para las ratas intactas (controles) de cada ensayo, es el mismo que para el modelo agudo.

La FIGURA 12 muestra la actividad de la xantina oxidasa bajo los diferentes tratamientos en el caso donde no está presente el DTT. No se aprecian diferencias entre los grupos experimentales entre sí (sin tomar en cuenta al control); ni en presencia de etanol, ni en presencia de adenosina. Se observa que al igual que en el modelo agudo, la actividad enzimática de la xantina oxidasa de todos estos grupos está por arriba de la de las ratas intactas.

En general, se ven actividades menores que en el modelo agudo, alrededor de 7 a 8 nmol/min/mg de proteína. Se observan las mismas tendencias de que la actividad de cualquiera de los tratamientos es mayor que el control, pero no se ven diferencias entre sí en los diferentes grupos. Los valores de significancia estadística que se observan en las gráficas, son calculados a partir del valor de actividad enzimática de cada grupo comparado con el del control.



- 1- RATA SIN TRATAMIENTO
- 2- AGUA - SALINA
- 3- AGUA - ADENOSINA
- 4- ETANOL - SALINA
- 5- ETANOL - ADENOSINA

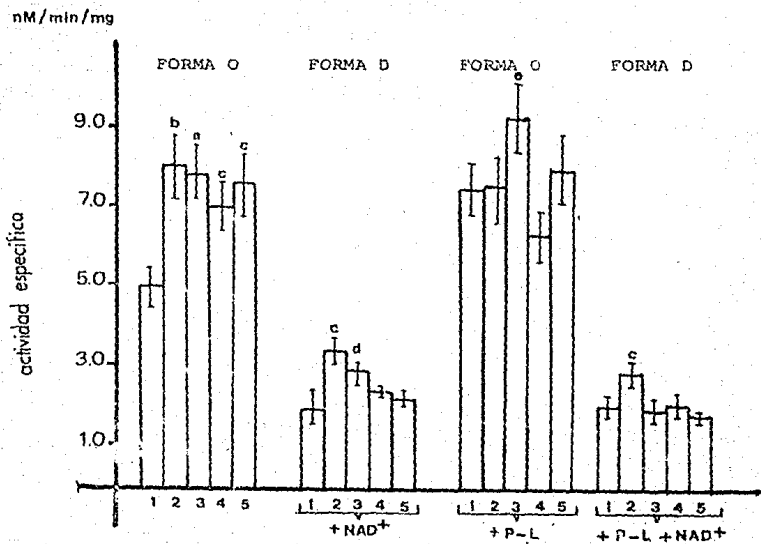


FIG. 12 FORMACION DE AC. URICO XANTINA OXIDASA.  
 MODELO CRONICO. ENSAYO SIN DIT.

- a  $p < 0.01$
- b  $p < 0.02$
- c  $p < 0.025$
- d  $p < 0.05$
- e  $p < 0.1$

SIN DTT + NAD<sup>+</sup>.- En este ensayo, se observan aumentos en la actividad de los casos: agua + solución salina ( de 2.0 a 3.38 nmol/min/mg) y agua + ADO (de 2.0 a 2.92) sin embargo, en el grupo de etanol + ADO, el incremento se abate.

-ENSAYO SIN DTT + Pir-LDH.

Cuando se adiciona Pir-LDH, se consume todo el NADH endógeno del medio y el producido por la enzima, impidiendo así la inhibición parcial de ésta. Esto se observa para el grupo control, en el cual se incrementa su actividad. En los demás grupos, lo único que se observa significativo es un aumento de la actividad de la enzima para el grupo tratado únicamente con adenosina ( $p < 0.1$ ). No se observan respuestas significativas al tratamiento con etanol. (FIGURA 12).

En la misma figura, la adición de NAD<sup>+</sup> al grupo tratado con Pir-LDH, parece indicar que el NADH formado es utilizado por el sistema Pir-LDH sin que se observe un claro incremento comparativamente con el grupo al cual sólo se adicionó NAD<sup>+</sup>. Sólo se aprecia un incremento en la actividad de la enzima por el tratamiento con agua + solución salina ( $p < 0.025$ ), pero no con agua + ADO.

-ENSAYO CON DTT.-

En este caso, se observa en la FIGURA 13, que la actividad de cualquiera de los tratamientos no es mayor que la que corresponde a la rata intacta por el efecto protector del

- 1- RATA SIN TRATAMIENTO
- 2- AGUA - SALINA
- 3- AGUA - ADENOSINA
- 4- ETANOL - SALINA
- 5- ETANOL - ADENOSINA

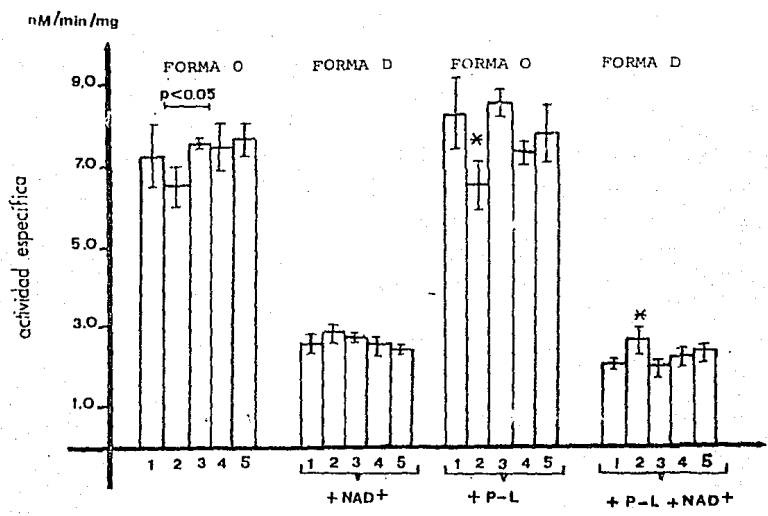


FIG. 13 FORMACION DE AC. URICO XANTINA OXIDASA. MODELO CRONICO ENSAYO CON DTT.

\* p < 0.1

DTT ; la actividad enzimática del control es similar a la de los otros grupos. Lo que se puede observar con estos datos, es que el etanol no influye sobre la actividad de la enzima, así como tampoco lo hace en el tratamiento conjunto con adenosina. Sin embargo, se observa una diferencia entre los grupos 2 y 3, ya que, la adenosina aumenta ligeramente la actividad de la enzima comparada con el grupo de agua-salina ( $p < 0.05$ ).

Cuando se adiciona  $NAD^+$ , no se aprecian diferencias significativas en cuanto a la actividad enzimática de la xantina oxidasa con respecto a los diferentes tratamientos con etanol o adenosina.

#### -ENSAYO CON DTT + Pir-LDH.

En la misma FIGURA 13, se observa una disminución en la actividad de la oxidasa como resultado del tratamiento con solución salina ( $p < 0.1$ ). El tratamiento con adenosina abate esta disminución y en el caso de los tratamientos con etanol, no se observan modificaciones de la actividad enzimática.

Al adicionar  $NAD^+$ , no hay variaciones en el tratamiento con alcohol o con adenosina, sin embargo, se observa un incremento ligero pero significativo en el grupo tratado sólo con solución salina ( $p < 0.1$ ), comparado con el control y con el grupo de agua + adenosina.

#### 4.4.4 DETERMINACION DE NADH. MODELO CRONICO

##### "IN VIVO"

Se observó la actividad de la forma D en un modo más directo con esta determinación a 340 nm. Se hicieron ensayos sin y con DTT, del mismo modo que para el modelo agudo.

##### -ENSAYO SIN DTT.-

En este primer caso, en la FIGURA 14 se muestra un ligero aumento significativo ( $p < 0.1$ ), en la formación de NADH como reflejo del tratamiento de intoxicación crónica con etanol, que es disminuido con el tratamiento adicional con adenosina.

##### -ENSAYO CON DTT.-

En el caso de utilizar DTT como protector, se observa el mismo efecto del etanol, pero en mayor magnitud con respecto al control, ya que la significancia es mayor ( $p < 0.01$ ). La adenosina también disminuye este incremento del etanol significativamente ( $p < 0.05$ ), pero no hasta el nivel del control.

- 1- RATA SIN TRATAMIENTO
- 2- AGUA - SALINA
- 3- AGUA - ADENOSINA
- 4- ETANOL - SALINA
- 5- ETANOL - ADENOSINA

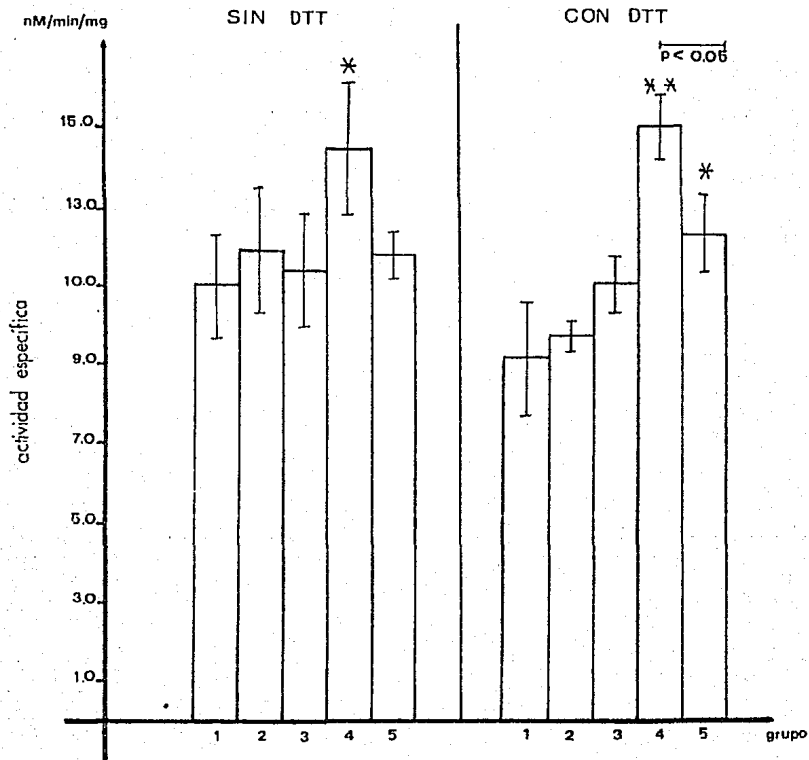


FIG.14 FORMACION DE NADH

XANTINA OXIDASA.  
MODELO CRONICO,

\*  $p < 0.1$     \*\*  $p < 0.01$

#### 4.5 EFECTO DEL ETANOL "IN VIVO" EN SANGRE Y REBANADAS DE HIGADO SOBRE LA DEGRADACION DE PURINAS.

Se trataron ratas del mismo modo que para el modelo agudo. Después de sacrificarlas, se cortaron rebanadas de hígado y se incubaron con solución de Krebs-Ringer, se recolectó la sangre de cada animal y se midió tanto el ácido úrico de plasma como del sobrenadante del medio de incubación de las rebanadas. Para más detalles, ver el capítulo de materiales y métodos.

La concentración de ácido úrico se consideró como un reflejo de la actividad de la xantina oxidasa.

La TABLA 1 muestra estos resultados, que indican que en sangre:

-La concentración de ác. úrico disminuye en el caso del tratamiento agudo con etanol y aumenta después del tratamiento con adenosina.

-La adenosina evita la disminución provocada por el etanol.

En el caso del ác. úrico liberado al medio por las rebanadas de hígado, se observa que hay un ligero incremento con respecto al caso control, y en el ensayo donde están presentes tanto etanol como adenosina, el valor obtenido se encuentra por debajo del control.

GRUPO	AC. URICO EN SANGRE (mg/dl)	AC. URICO EN SOBRENADANTE DE REBANADAS (mg/g/h)
CONTROL	1.83 ± 0.24 (4)	0.97 ± 0.03 (4)
Gluc+SSI	1.72 ± 0.23 (4)	1.02 ± 0.08 (4)
Gluc+ADO	2.13 ± 0.21 (4)	1.02 ± 0.02 (4)
EtOH+SSI	1.67 ± 0.33* (5)	1.09 ± 0.10** (5)
EtOH+ADO	2.30 ± 0.27 (4)	0.86 ± 0.03 (4)

TABLA 1. MEDICION DE AC. URICO EN SANGRE Y REBANADAS DE HIGADO DE ANIMALES TRATADO. Las rebanadas de hígado fueron incubadas 30 min. en Krebs-Ringer. El ác. urico se determinó por el método del ác. fosfotúngstico. Los resultados se expresan como el promedio ± error estándar. Los valores entre paréntesis indican el número de determinaciones.

\* p<0.005 comparado con el grupo control

\*\* p<0.1 comparado con el grupo control

#### 4.6 ADICION DE ADENOSINA "in vitro"

Como se menciona en el capítulo de materiales y métodos, se hicieron además rebanadas de hígado de animales sin tratamiento y de animales tratados con etanol + solución salina. Al medio de incubación se le adicionó adenosina a dos concentraciones: 10 mol/L y 10 mol/L. En la TABLA 2 se observa que no hay ningún cambio en la liberación de ácido úrico al medio de incubación por las rebanadas con ninguna de las dos concentraciones de adenosina, comparando las que se



tienen etanol, con las que sí lo tienen, lo cual puede reflejar que la formación de ác. úrico no está mediada por etanol, en estas condiciones experimentales. El flujo de ácido úrico aumenta con la adición de adenosina debido a que es un sustrato purínico.

TRATAMIENTO	AC. URICO LIBERADO (mg/g/h)
RATA INTACTA	0.97 ± 0.03
I + ADO 10 <sup>-5</sup> mol/L	1.23 ± 0.16
I + ADO 10 <sup>-8</sup> mol/L	1.10 ± 0.17
EtOH + SSI	1.09 ± 0.10
EtOH+SSI+ADO 10 <sup>-5</sup> mol/L	1.21 ± 0.08
EtOH+SSI+ADO 10 <sup>-8</sup> mol/L	1.22 ± 0.19

TABLA 2. EFECTO DEL ETANOL EN EL FLUJO CATABOLICO DE LA ADENOSINA, MEDIDO COMO ACIDO URICO. Los resultados se expresan como el promedio ± error estándar de 4 determinaciones.

I= ratas sin tratamiento  
 ADO= adenosina  
 EtOH= etanol  
 SSI= solución salina isotónica

#### 4.7 EFECTO DEL ETANOL ADICIONADO "IN VITRO"

Se prepararon rebanadas de hígado de animales intactos las cuales se incubaron bajo diferentes condiciones:

I. Con solución de Krebs-Ringer.

II. Krebs-Ringer + etanol 25 mmol/L

III. Krebs-Ringer + etanol 25 mmol/L + Adenosina 100µmol/L

IV. Krebs-Ringer + etanol 25 mmol/L + Adenosina 25 µmol/L

El sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de ácido úrico y las rebanadas se homogeneizaron para hacer las determinaciones enzimáticas de AK, ADA Y SAH-H.

#### 4.7.1. Actividad de la adenosina kinasa bajo este tratamiento.-

La FIGURA 15 indica la actividad de la adenosina kinasa bajo las condiciones señaladas; en general, el etanol adicionado "in vitro", no modifica significativamente la actividad de la enzima, sin embargo, las concentraciones altas de adenosina (columna IV, 25 mmol/L), en presencia de etanol, provocan una disminución del 60% en la actividad de la enzima.

#### 4.7.2. Actividad de la adenosina deaminasa.-

Para el caso de la adenosina deaminasa, el resultado de la adición de etanol, que se representa en la columna II de la FIGURA 16, nos indica que existe una ligera activación del 20% en la actividad de la enzima; dicho valor no es significativo estadísticamente. La activación es más evidente en el caso de adicionarle adenosina 100µmol/L (columna III), aumenta 52 %, sin embargo, la adenosina a concentraciones mayores (25 mmol/L, columna IV), provoca que la enzima regrese a valores que corresponden a los de las rebanadas sin ninguna adición. (3.68 nmol/min/mg de proteína).

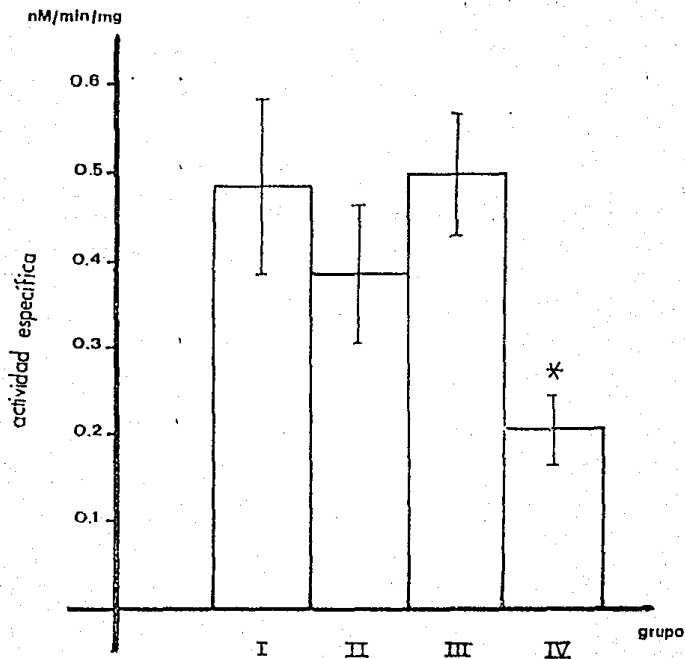


FIG. 15 ACTIVIDAD DE LA ADEOSINA KINASA.  
 MODELO "IN VITRO" DE ADICION DE ETANOL.

\*  $p < 0.02$

I. REBANADAS CONTROL.

II. KREBS-RINGER + ETANOL, 25 mmol/L.

III. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L + ADEOSINA 100  $\mu$ mol/L.

IV. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L + ADEOSINA 25 mmol/L.

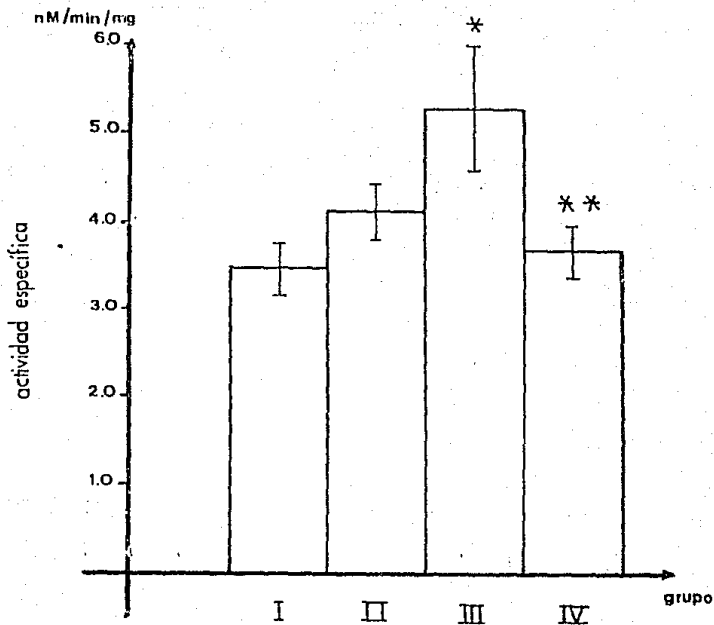


FIG. 16 ACTIVIDAD DE LA ADENOSINA DEAMINASA  
 MODELO "IN VITRO" DE ADICION DE ETANOL.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.05$  comparado con II

I. REBANADAS CONTROL

II. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L

III. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L. + ADENOSINA 100  $\mu$ mol/L

IV. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L. + ADENOSINA 25 mmol/L

#### 4.7.3. Actividad de la S-Adenosil-Homocisteína-Hidrolasa.-

La actividad enzimática de la SAH-H, bajo la adición de etanol "in vitro", disminuye considerablemente ( $p < 0.025$ ) y en el momento de que se hace la determinación con etanol más adenosina  $100 \mu\text{mol/L}$ , se revierte esta disminución retornando la actividad a niveles normales ( $149.1 \text{ pmol/min/mg}$  de proteína). Cuando se hace el ensayo con etanol + ADO  $25 \text{ mmol/L}$ , se observa una disminución mucho más aparente en la actividad de la enzima, probablemente porque se trata de una inhibición por producto final. FIGURA 17.

#### 4.7.4. Determinación de ácido úrico.-

La concentración de ácido úrico del sobrenadante de las rebanadas de hígado, se ha considerado como un reflejo de la actividad de la xantina oxidasa. Analizando la FIGURA 18, se puede concluir que el etanol adicionado "in vitro" promueve la activación de la enzima de forma sorprendente: de un valor de  $0.146 \text{ mg/g/h}$  en el caso de no tener etanol el medio de incubación, se eleva hasta  $0.411 \text{ mg/g/h}$  de ác. úrico formado cuando está presente etanol en el medio. Con una concentración de adenosina de  $100 \mu\text{mol/L}$  además del etanol, no se observan cambios con respecto al tratamiento con el etanol solo, la concentración de ác. úrico se mantiene en niveles elevados y cuando se adiciona adenosina  $25 \text{ mmol/L}$  además del alcohol, se promueve el retorno de la actividad de la enzima a valores que se pueden considerar similares al control ( $0.159 \text{ mg/g/h}$ ); es decir, se evita el aumento en la actividad de la enzima promovido por el etanol.

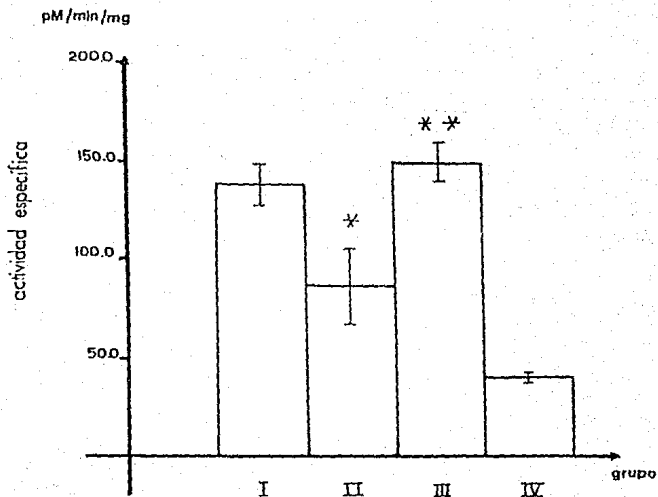


FIG. 17 ACTIVIDAD DE LA S-ADENOSIL-HOMOCISTEINA HIDROLASA.

MODELO "IN VITRO" DE ADICION DE ETANOL.

\*  $p < 0.025$

\*\*  $p < 0.01$  comparado con II

I. REBANADAS CONTROL.

II. KREBS-RINGER + ETANOL, 25 mmol/l.

III. KREBS-RINGER + ETANOL, 25 mmol/l. + ADENOSINA 100  $\mu$ mol/l.

IV. KREBS-RINGER + ETANOL, 25 mmol/l. + ADENOSINA 25 mmol/l.

- I. REBANADAS CONTROL
- II. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L
- III. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L + ADENOSINA 100  $\mu$ mol/L
- IV. KREBS-RINGER + ETANOL 25 mmol/L + ADENOSINA 25 mmol/L

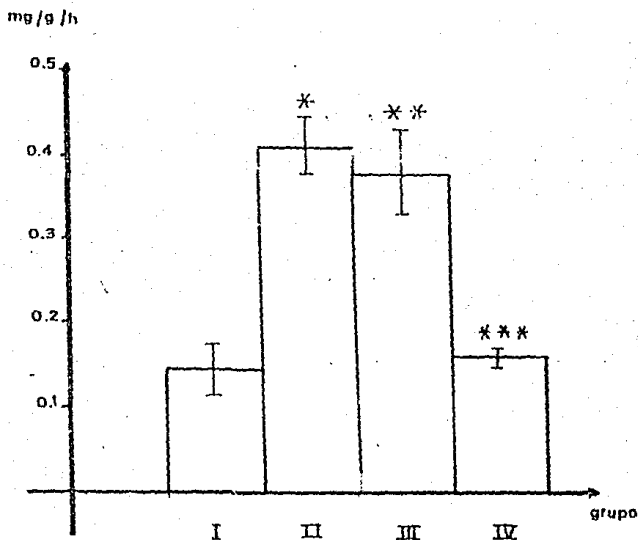


FIG. 18 ACIDO URICO LIBERADO POR REBANADAS DE HIGADO EN EL ENSAYO DE ADICION DE ETANOL

"IN VITRO"

\*  $p < 0.01$

\*\*  $p < 0.005$

\*\*\*  $p < 0.001$  comparado con II

# 5. Discussion



## 5. DISCUSION

En este trabajo se estudiaron enzimas de la vía metabólica de la adenosina, debido a que hay sugerencias preliminares de trabajo de nuestro laboratorio que indican que el efecto de la adenosina sobre los parámetros energéticos se prolonga en presencia de etanol hasta 2 horas, en tanto que en ausencia del hepatotóxico se manifiesta el mismo efecto a los 30 minutos, (12,15). Lo anterior hacía suponer que el metabolismo de la adenosina se retarda en presencia del etanol.

En la figura 18 se puede apreciar que la presencia del etanol, acelera el metabolismo de la adenosina al encontrarse valores de ácido úrico más elevados que en ausencia de éste.

Otros antecedentes relacionados con el metabolismo de las purinas y del etanol indican que existe una hiperuricemia inducida por el alcohol, lo cual indica que el metabolismo purínico se encuentra alterado a manera de que existe una degradación acelerada de purinas (38). Este antecedente sí coincide con lo encontrado en este trabajo, (FIG 18).

Dentro de los experimentos "in vivo" se planearon dos modelos de intoxicación con etanol: agudo y crónico, para conocer los efectos que pudiera estar causando el etanol a corto y largo plazo. Dichos modelos, no son estrictamente comparables, ya que un factor importante aquí fué la edad de las ratas utilizadas, que al término del modelo crónico fueron de mayor peso que las que se utilizaron para el modelo

agudo. Este hecho que no refleja en sí, modificaciones en las actividades enzimáticas debidas al etanol, sino un ligero desplazamiento de los valores normales, por ejemplo, en ausencia de etanol para enzimas como la ADA (fig.6), la AK (fig.7) y en la XO, en donde los valores en general son menores en el caso crónico que en el agudo.

#### 5.1. Discusión de resultados, modelo "in vivo".

Algunos de los cambios observados durante los ensayos son los siguientes:

Para las figuras 2 y 3, el aumento en las actividades enzimáticas de la adenosina kinasa y adenosina deaminasa, pueden ser interpretadas como una inducción por sustrato.

Esto no es observado en presencia del etanol, sugiriendo que posiblemente el flujo de la adenosina es más rápido y evita que se acumule el exceso de sustrato.

En la figura 6, sucede lo contrario para el caso de la ADA, en el modelo crónico. En presencia de adenosina hay una ligera disminución de la actividad, la cual es evitada con el etanol; sin embargo, esto no se puede comparar con el caso anterior, debido a que en primer lugar, no hay presencia de glucosa oral como para el modelo agudo y en segundo lugar, por la diferencia de edades en las ratas. La respuesta de inducción de las actividades enzimáticas por sustrato, se ve disminuida por efecto de la edad, lo que es revertido por la presencia del etanol.

Se observaron casos donde hubo modificaciones en las actividades enzimáticas debidas a la glucosa. En realidad, no se sabe la causa de este efecto, se ha visto que es un control inadecuado. porque a las concentraciones utilizadas, puede inducir respuestas bioquímicas que en cierta forma son negativas para la célula. Inhibe los procesos de fosforilación oxidativa, la desacopla y ello repercute a todos los niveles , inclusive a nivel enzimático.

En general, el modelo "in vivo" , no pone claramente de manifiesto algún tipo de cambio o efecto directo del etanol sobre las enzimas analizadas.

Los estudios realizados con la xantina oxidasa, sugieren fuertemente que esta enzima es la reguladora de la vía de degradación, ya que puede existir en una y otra forma como oxidasa y como deshidrogenasa, pudiendo ser éste un punto crítico en la acción del etanol y/o la adenosina.

La dificultad que se observa en la determinación de estas dos modalidades enzimáticas de la xantina oxidasa, es que para ambas el producto final de la reacción es el mismo, ácido úrico. Por esto, fué necesario optimizar el método de valoración de la enzima, tomando en cuenta varios factores:

a). Utilización de  $\text{NAD}^+$ .-

Al realizar el ensayo sin  $\text{NAD}^+$ , se pudo detectar la forma O de la enzima (oxidasa) por medio de la medición del ácido úrico formado a 292 nm. Al adicionarle  $\text{NAD}^+$ , al mismo ensayo,

se detectó un aumento de la velocidad de reacción de esta formación de ácido úrico.

Los cambios observados tanto en el modelo agudo como en el crónico, son más evidentes sobre la forma O de la enzima que sobre la deshidrogenasa. Esto se puede apreciar en las figuras 9, 10, 12 y 13; la actividad como oxidasa se ve incrementada por cualquiera de los tratamientos, como se ha mencionado en el capítulo de resultados, no habiendo efecto por etanol ni por adenosina "per se", sino que es una respuesta al tratamiento en las ratas, lo cual es observado con respecto a las ratas intactas. Cuando se valoró la actividad de deshidrogenasa, tampoco hubo cambios en relación al tratamiento con respecto a los controles, sin embargo, para la intoxicación crónica, se observa ya un aumento significativo para el tratamiento con etanol + solución salina, que era lo esperado. (fig. 11 y 14).

#### b). Inhibición del NADH.-

Una observación importante es el hecho que al eliminar el producto de la reacción de la deshidrogenasa, el NADH, en presencia de piruvato y lactato deshidrogenasa, se estimula la actividad de la oxidasa, la cual no es productora de NADH. Sin embargo, dicha estimulación pudiera indicar la presencia de NADH endógeno en la muestra y que ello estuviera produciendo la inhibición de la forma O de la enzima. La deshidrogenasa no se ve afectada por la acumulación de la coenzima cuando se valora su actividad determinando el ácido úrico que produce. Por otro lado, en la reacción

correspondiente a la deshidrogenasa, midiendo su actividad por medio del NADH formado, el sistema utilizador de NADH se adicionó desde el principio, lo cual sí protege de la inhibición de la enzima, ya que, si se detecta su actividad en ausencia de este sistema, se observa que es menor (datos no presentados). Todo esto, sugiere que el NADH, tanto intracelular, como el producido por la deshidrogenasa, inhibe a las dos formas de la xantina oxidasa.

c). Protección por DTT.-

En nuestros estudios se midió la actividad de la enzima en ausencia y presencia de Ditiotreitól, que es una sustancia protectora de grupos -SH. En términos generales, se puede observar que no hay un cambio muy marcado en el estado de la enzima. La ausencia o presencia de DTT no afecta la actividad de la enzima cuantificada como oxidasa o como deshidrogenasa, en contraposición con lo reportado en la literatura, en que el DTT estabiliza la actividad de la deshidrogenasa, sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, no se pudo comprobar esta acción protectora.

Comparando únicamente los grupos controles, se observa que cuando se elimina el NADH del medio en presencia de DTT, ya no existe la diferencia tan marcada de la actividad como cuando no hay DTT, lo cual sugiere una interacción entre el efecto inhibitor del NADH con los grupos -SH de la enzima.

En el caso de la figura 11, cuando el ensayo de la actividad de deshidrogenasa se valora en presencia de DTT, desaparece

la capacidad de respuesta incrementada en la actividad detectada en presencia de glucosa y etanol, lo que pudiera sugerir que el efecto puede estar relacionado con cambios en los grupos -SH de la enzima. Los cambios son discretos. En cambio, en el modelo crónico, tanto en ausencia como en presencia de DTT, el etanol tiene un efecto importante en el incremento de la actividad de la deshidrogenasa.

Comparando los resultados obtenidos para cada enzima de cada grupo de experimentación, tanto agudo como crónico, se puede decir que en general, no se encontraron modificaciones significativas en las enzimas, ni de producción de adenosina, como lo son la 5'-nucleotidasa y la SAH-H, ni en la de utilización (Adenosina kinasa), sin embargo, la xantina oxidasa, que es una enzima de degradación, presenta un ligero incremento de actividad sobre todo para la forma de deshidrogenasa, siendo que para la adenosina deaminasa, que también es enzima de degradación, no se presenta alteración alguna.

Esto no indica que estrictamente no hayan alteraciones, sino que no hay un efecto del etanol sobre las actividades enzimáticas en las condiciones experimentales utilizadas, excepto para la xantina oxidasa. Parece que es una enzima clave que regula el catabolismo de la adenosina y los resultados sugieren que se afecta de manera activante por el etanol.

Posiblemente, esta enzima se ve afectada por el propio metabolismo del etanol que aumenta la cantidad de

equivalentes reductores (NADH) en el citosol del hepatocito. Esto podría estar provocando la interconversión de la XO de su forma D (fisiológica) a la forma O, generadora de radicales libres y peróxido de hidrógeno perjudiciales para la célula (37), además de la sobreproducción de ácido úrico (36), que se ha mencionado. Lo anterior es válido para el modelo de intoxicación aguda, ya que en la intoxicación crónica, la participación de la deshidrogenasa alcohólica y la consecuente elevación de NADH, se ve disminuida considerablemente. Hay que considerar asimismo, que el  $H_2O_2$  generado por la XO, puede ser utilizado por la catalasa durante el metabolismo del etanol,

#### 5.2. Efecto "in vivo" de los diferentes tratamientos sobre la formación de ácido úrico en el plasma y rebanadas de hígado.

En la tabla 1 del capítulo de resultados, se muestra la concentración de ácido úrico en la sangre de los animales con o sin intoxicación aguda con etanol, y del ác. úrico que liberan al medio de incubación, las rebanadas de hígado de dichos animales. Esto se hizo con el objeto de conocer de manera indirecta la actividad de la XO productora de dicho ác. úrico.

No obstante de que el ácido úrico no es el producto final del catabolismo de purinas en la rata, se observó que el etanol por sí solo no modifica de gran manera la producción de ácido úrico.

En la tabla sólo se observa una ligera tendencia de aumento en el caso de las rebanadas. En el caso de la sangre, se ve que existe una disminución en la concentración de ác. úrico comparado con el grupo control, situación que no refleja lo ocurrido en el hígado; ésto se debe probablemente a que el ácido úrico no es el producto final de la degradación de las purinas en la rata, sino la alantoína y como tal se libera a la circulación. Otra posible situación es que en el caso de sobreproducción de ácido úrico y su liberación a la sangre, se estuviera manifestando un aumento en la filtración glomerular de éste de tal manera de mantener el nivel aún más bajo que el control y de ese modo, conseguir la homeostasis. Son resultados difíciles de interpretar debido a que toda la capacidad de mantenimiento de condiciones fisiológicas del animal está presente, sin embargo, se da un indicio de que se está formando más ác. úrico.

### 5.3. Adición de etanol "in vitro"

Estos experimentos se hicieron con el objeto de detectar el daño del etanol adicionado "in vitro" en una concentración considerada como la existente en circulación bajo una intoxicación alcohólica (aproximadamente, 25 mmol/l.). Asimismo, se probó el efecto de la adenosina adicionada al mismo medio de incubación con el etanol.

Para el caso de la adenosina kinasa, en la figura 15, el etanol no tiene un efecto aparente sobre la actividad de la enzima; sólo en presencia de concentraciones altas de



adenosina se detecta una disminución de actividad, tal vez debido a la gran cantidad de adenosina presente, ya que la Km para esta enzima es del rango micromolar y puede ser que se esté saturando demasiado la enzima y ello se manifieste como una inhibición. Además, se ha reportado, que a bajas concentraciones, la mayor parte de la adenosina es refosforilada, pero a altas concentraciones, es desaminada (21). En este punto, se puede correlacionar lo encontrado anteriormente en el laboratorio, respecto al retardo de la manifestación del efecto de la adenosina sobre los parámetros energéticos en presencia del etanol, ya que no hay utilización de la adenosina para la producción de nucleótidos.

Cuando se analizan los resultados correspondientes a la adenosina deaminasa, en la figura 16, se observa que el etanol promueve una ligera activación de la enzima, lo cual indica que ya desde este primer paso de degradación, el etanol está provocando un incremento en el flujo del catabolismo de la adenosina, y cuando ésta se encuentra presente a concentraciones bajas (100  $\mu\text{mol/L}$ ), se hace más evidente esta activación de la enzima, pero cuando la adenosina está en concentraciones mayores (25  $\text{mmol/L}$ ), los valores se regresan a los normales.

Para el caso de la actividad enzimática de la SAH-H bajo la adición "in vitro" de etanol, se observa una inhibición de la enzima cuando está presente el alcohol; es decir, bajo esta situación, la formación de adenosina a partir de SAH,

no es favorecida. Lo anterior puede ser debido a que el metabolismo de la adenosina en sí, se encuentre controlado por las enzimas de degradación, que se han visto favorecidas con este tratamiento. Asimismo, en presencia de etanol+adenosina, esta disminución en la actividad retorna a niveles semejantes a los del control y a concentraciones altas de adenosina + etanol, la enzima se inhibe por la gran cantidad del producto de la reacción que rige.

En la figura 18, para el caso de la determinación de la cantidad de ácido úrico liberado por las rebanadas de hígado de animales intactos, el incremento observado en presencia de etanol, confirma que sí existe una hiperuricemia provocada por éste en el hígado, es decir, existe una activación de la XO, lo cual se midió indirectamente con la concentración de ácido úrico. Se puede sugerir como ya se indicó anteriormente la elevación de los equivalentes reductores promovida por el etanol y con ello, la interconversión de la forma D a la forma O de la XO ; al mismo tiempo, la formación de  $H_2O_2$  por la forma O de la enzima que pudiera servir como cosustrato para la catalasa al metabolizar el etanol, con el subsecuente incremento en la producción de ácido úrico.

Cuando se adiciona al mismo medio con etanol, adenosina a bajas concentraciones, no se observan cambios con respecto al primero, sin embargo, cuando se encuentra en concentraciones mayores, la concentración de ácido úrico regresa a valores normales, es decir, la presencia de adenosina a alta concentración, promueve una "normalización" de la actividad de la enzima.

Los experimentos "in vitro", demuestran claramente el efecto del etanol sobre el flujo de la vía catabólica.

De esta manera, se hace evidente lo que en el modelo "in vivo" sólo era una sugerencia de incremento de actividad de la XO en la producción de ácido úrico. Adicionando el etanol "in vitro", a concentraciones reportadas como las encontradas bajo la intoxicación alcohólica en sangre, se refleja de mejor manera la sobreproducción de ácido úrico, lo cual probablemente se veía enmascarado en el modelo "in vivo" por efectos de dilución de los homogenados o directamente en el ensayo enzimático desarrollado para detectar la actividad de la XO. Estas determinaciones "in vitro" se hicieron midiendo ácido úrico, como producto final del metabolismo de la adenosina, pero el trabajo se continuará en el laboratorio de tal manera de hacer el ensayo enzimático de la XO después de realizar la intoxicación con etanol "in vitro" en rebanadas de hígado o hepatocitos aislados y así conocer directamente el efecto sobre la enzima.

Resumiendo:

En el trabajo realizado, debido a las condiciones de dilución de los homogenados utilizados como fuente de enzima, no fue claro el efecto del etanol, sugiriendo que éste no implica un cambio estructural en las enzimas, sino un cambio en los flujos catabólicos que se hace más evidente en los experimentos "in vitro". No obstante, se vió que la xantina oxidasa, es una enzima clave en los efectos del etanol y de

la adenosina. Considerando que los cambios de la forma D a la O de la enzima pueden estar mediados por grupos -SH, proteólisis y presencia de iones calcio, son factores involucrados con el etanol y la adenosina, por lo que se sugiere que los experimentos más adecuados serán las células aisladas para determinar cuáles son los efectores de los cambios en la xantina oxidasa.

Se observó que sobre todo para el modelo crónico existe un aumento de la actividad de la deshidrogenasa de la enzima, asimismo, la producción de ácido úrico por las rebanadas de hígado en los experimentos "in vitro" se hizo evidente en la presencia del etanol.

La adenosina kinasa fué la enzima que se inhibe por la presencia del etanol y concentraciones elevadas de adenosina considerándose este hecho como el responsable de que los parámetros energéticos que normalmente se elevan por la presencia de la adenosina en 30 minutos, en presencia de etanol se retarden hasta las 2 horas.

Por otra parte, en presencia del tóxico hay predominio de la vía catabólica, siendo la X.O. la probable responsable. Esta enzima disminuye su actividad acelerada por causa del etanol con adenosina y se recupera así el equilibrio del metabolismo de la adenosina.

En apoyo a nuestros resultados, recientemente se publicó un artículo que menciona que administrando etanol en forma aguda a ratas, se observa una conversión de la Xantina deshidrogenasa hepática a X.O. después de 12 horas de

tratamiento, y la administración conjunta con pirazola (inhibidor de la alcohol deshidrogenasa), revierte este efecto. Además, en experimentos "in vitro", si se incubaba el sobrenadante de hígado con acetaldehído (producto del metabolismo del etanol) a 37°C, sucede lo mismo, es decir, hay una conversión de la forma D a la forma O de la enzima, de manera dosis dependiente. Esto indica que es necesaria la biotransformación del etanol para que exista una interconversión de la deshidrogenasa a la oxidasa. (50)

# 6. Conclusiones

## 6. CONCLUSIONES

1. El etanol modifica el catabolismo de la adenosina.
2. De acuerdo con los experimentos "in vivo", el efecto parece estar mediado por un cambio en flujos y no por modificaciones estructurales de las enzimas. Los resultados en xantina oxidasa sugieren un aumento en su actividad.
3. En el modelo de intoxicación crónica, los efectos discretos de la adenosina desaparecen.
4. En el modelo crónico, se incrementa la actividad de la forma D de la Xantina Oxidasa.
5. Los experimentos "in vitro" tanto de adenosina como de etanol, sugieren que son los más indicados para estudiar el mecanismo de estos dos efectores en el catabolismo de purinas.
6. Nuestros resultados apoyan informes de la literatura de que en presencia del etanol, se observa un aumento en el catabolismo de purinas (hiperuricemia) y que son mediados por un aumento en la actividad de la xantina oxidasa, lo que posiblemente sea la causa de las crisis de gota observadas durante la ingestión de etanol en los pacientes que padecen de esta enfermedad, resultado que es más evidente en el tratamiento crónico en que se encontró un aumento de la forma

de deshidrogenasa de la enzima. Este efecto es posible revertirlo por el tratamiento simultáneo de etanol y adenosina.

7. El retardo en el efecto de la adenosina sobre los parámetros energéticos en presencia del etanol, pueden estar mediados por una inhibición de la adenosina kinasa, tal como lo sugieren nuestros resultados de los experimentos "in vitro".



# 7. Bibliografia

## B I B L I O G R A F I A

1. LAWRENCE A. KAPLAN. Química Clínica. Ed. Panamericana. 1984. Argentina. pp 701-720.
2. Drill's Pharmacology in Medicine. J. DiPalma (ed.) 4th edition. McGraw Hill. 1971. USA. pp 275-302.
3. ISSELBACHER, K.J. and GREENBERGER N.J. Metabolic effects of alcohol on the liver. New Engl. J. of Med. 1964, 270: 351.
4. CHAN THOMAS C.K. & MORLEY S. SUTTER. Ethanol Consumption and Pressure. Life Sci. 1983, 33:1965-1973.
5. Alcohol and the Liver. M. FISHER AND J. RANKIN (eds.). Canadian Hepatic Foundation. Plenum Press, N.Y., 1977, U.S.A. pp. 31-43, 101-143.
6. HERRERA, E. Bioquímica, Ed. Interamericana, 1a. edición, 1986, Madrid, España. pp 761-772.
7. HAULICA I., Preliminary data on the possible hypnogenic role of adenosine. J. of Neuroch. 1973, 21: 1019-1020.
8. FOX, IRVING AND KELLEY, WILLIAM. The role of adenosine and 2'deoxyadenosine in mammalian cells. Ann. Rev. Bioch. 1978, 47: 655-686.
9. SUÁREZ MUNGUÍA J., VALLES, V.E., CHAGOYA DE S.V. Effect of adenosine on the serum levels of glucose, insulin and glucagon in vivo. The Intern. J. of Bioch. 1987, 19:85-88.
10. BERNE, R, ROLL, T., RUBIO, R. Regulatory function of

adenosine. Martinus Nijhoff Publishers, 1983. U.S.A.

11. HARRIS, R.A., et al. Adenosine produces a diminution of triacylglyceroles in hepatic production of lipids. J. of Biol. Chem. 1976, 10: 673-681.

12. HERNÁNDEZ MUÑOZ R., SANTAMARÍA, A., GARCÍA-SÁINZ, J.A., PIÑA, E., AND CHAGOYA DE SÁNCHEZ, V. On the mecanism of ethanol- induced fatty liver and its reversibility by adenosine. Arch. Bioch. Bioph. 1978, 190:155-162.

13. HERNÁNDEZ MUÑOZ R., GLENDER, W., DÍAZ MUÑOZ, M., GARCÍA-SÁINZ, J.A. AND CHAGOYA DE SÁNCHEZ V. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. Bioch.Pharm. 1984, 33 (16): 2599-1604.

14. GARCÍA-SAINZ A., HERNÁNDEZ MUÑOZ R., SANTAMARÍA A., AND CHAGOYA DE SÁNCHEZ V. Mechanisms of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. Bioch. Pharm. 1979, 28: 1409-1413.

15. GARCIA-SAINZ A., HERNÁNDEZ MUÑOZ, R., GLENDER, W., PIÑA, E. AND CHAGOYA DE SÁNCHEZ, V. Effects of Adenosine on ethanol induced modifications on liver metabolism . Bioch. Pharm. 1980, 29: 1709-1714.

16. CHAGOYA DE SÁNCHEZ V., ALVAREZ P., JIMNEZ B., VILLALOBOS R., AND PIÑA E.. Regulation of fatty acid oxidation by adenosine at the level of its extramitochondrial activation. Bioch. and Bioph. Res. Comm. 1977, 76: 804-812.

17. CHAGOYA DE SÁNCHEZ V. AND PIÑA E. Adenosine, a Glucogenic and lipogenic compound. FEBS Letters. 1972, 19(4): 331-334.
18. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. , DÍAZ-MUÑOZ, M., CHAGOYA DE SÁNCHEZ, V. "in vivo" and "in vitro" adenosine stimulation of ethanol oxidation by hepatocytes, and the role of the malate-aspartate shuttle. *Bioch. Bioph. Acta.* 1987, 930: 254-263.
19. GONZÁLEZ RAZO P. Estudio sobre el mecanismo de inducción de gluconeogénesis y ureogénesis por adenosina "in vivo". TESIS de Licenciatura, 1987, Fac. Química, UNAM.
20. CHAGOYA DE SÁNCHEZ V., HERNÁNDEZ MUÑOZ R., DÍAZ MUÑOZ M., VILLALOBOS R., GLENDER W., VIDRIO S., SUÁREZ J. AND YÁÑEZ L. Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance. *Life Sci.* 1983, 33:1057-1064.
21. ARCH, J.R.S & NEWSHOLME, E.A. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays in biochemistry.* Vol. 14, Campbell y Aldrige, (eds.), Academic Press, 1978 N.Y., USA. pp-82-123.
22. ZEKRI, MUSTAPHA. Purification of bovine liver cytosolic 5'-nucleotidase. *Eur. J. Bioch.* 1988, 172:93-99.
23. WIDNELL, Ch.C. and UNKELESS, J.C.. Partial purification of a lipoprotein with 5'-nucleotidase activity from membranes of rat liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1968,

24. Idem referencia 6, pp.703.
25. HOFFMAN D.R., MARION, D.W., CORNATZER W.E., AND DUERRE J.A., SAM & SAH Metabolism in isolated rat liver. J. of Biol. Chem. 1980, 255 (22):10822-10827.
26. SCHRADER J., SCHUTZ W., AND BARDENHEUER H. Role of SAH-Hidrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. Bioch. J. 1981, 196:65-70.
27. H. UELAND, MAGNE. Pharmacological and Biochemical Aspects of SAH and SAH-H. Pharmacol. Rev. 1982, 34(3):223-253.
28. I. ANDERSON, E. Nucleoside and Nucleotide Kinase. In "The Enzymes", Boyer, P (ed.), VOL. IX. PART B. Third Edition. Academic Press, 1973, N.Y., USA. pp49-52.
29. BERGMAYER, H.S. Methods of enzymatic analysis. 3rd. edition, Vol. IV. Enzymes 2. Verlag Chemie. 1983, FRG. p.308.
30. ZIELKE, C.L. & SUELTER, C.H. Purine, purine nucleosides and purine nucleotides aminohydrolases. In "The Enzymes". Boyer, P. (ed.) VOL. IV. 3rd. Edition. Academic Press, 1971, N.Y., USA. pp 54-64.
31. BERGMAYER. METHODS OF ENZYMAIC ANALYSIS. Volume III. Enzymes 1. Verlag Chemie, 1983. FRG. .
32. LEHNINGER. BIOQUIMICA, Editorial Omega, Madrid, España,

1979. pp. 750-753.

33. DELLA CORTE E. & STIRPE F. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) into oxidase (Type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.* 1972, 126: 739-745.

34. KAMINSKI Z.W. & JEZEWSKA M.M. Effect of NADH on hypoxanthine hydroxylation by native NAD<sup>+</sup>-dependent xanthine oxidoreductase of rat liver and the possible biological role of this effect. *Bioch. J.* 1981, 200: 597-603.

35. MC CORD, JOE. Oxygen Derived Free Radicals in postischemic tissue injury. *New Eng. J. Med.* 1985, 312(3): 159-163.

36. FALLER J. & FOX I. Ethanol Induced Hyperuricemia. *New Eng. J. Med.* 1982, 307 (26): 1598-1602.

37. YOUNES M. & STRUBELT O. Enhancement of hypoxic liver damage by ethanol. *Biochem. Pharmacol.* 1987, 36(18) ; 2973-2977.

38. CHAGOYA DE SANCHEZ, V. BRUNNER A. AND PIÑA E. "In vivo" Modification of the energy charge in the liver cell. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 1972, 46: 1441-1445.

39. CHAGOYA DE SANCHEZ, V., BRUNNER A., SANCHEZ M.E., LOPEZ C. AND PIÑA E. Utilization of adenosine as a tool in studies on the regulation of liver glycogen biosynthesis.

Arch. Bioch. Bioph. 1974, 160: 145-150.

40. CHAGOYA DE SANCHEZ V. & PIÑA, E. The redox state of  $NAD^+/NADH$  systems in rat liver during in vivo inhibition of fatty acid oxidation by adenosine. FEBS Letters. 1977, 83 (2): 321-324.

41. KISAKI AND SAKURADA. Simple microassay methods for enzymes of purine metabolism. Laboratory and Clinical Medicine, 1977, 89 (5) : 1135.

42. W. DE LONG AND C. KALKMAN. Myocardial Adenosine Kinase: Activity, and Localization, determined with rapid, radiometric assay. Biochim. et Biophys. Acta. 1973, 320: 388-396.

43. SUÁREZ MUNGUIA, J. Determinación enzimática de la S-Adenosil-Homocisteína Hidrolasa. Comunicación personal. Trabajo no publicado.

44. STIRPE F., AND DELLA CORTE E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion "in vitro" of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O). J. Biol. Chem. 1969, 244(14): 3855.

45. LAYNE, N. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Methods in Enzymology, Vol. III, (Colowick, S. and Kaplan, N.O., editores). Academic Press, N.Y., 1957, U.S.A. p.447-454.

46. WENDEL P. CARAWAY. Determination of serum uric acid. American J. of Clinical Pathology, 1955, 25:840-45.

47. DELLA CORTE E. AND STIRPE F. The regulation of xanthine oxidase. Inhibition by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide of rat liver xanthine oxidase type D and of chick liver xanthine dehydrogenase. Biochem. J. 1970, 117:97.

48. ROWE P.B. AND WYNGAARDEN J.B. The mechanism of dietary alterations in rat hepatic liver xantine oxidase levels. J.Biol. Chem. 1966, 241: 5571.

49. SULTATOS, L.G. Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase system in the rat. J. of Pharmacol. and Exp. Ther. 1988, 26(3):946-949.



8.

Анехо

## 8. ANEXO

### TABLAS DE RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS.

Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar para cada ensayo. Los números entre paréntesis indican el número de veces que se realizó cada determinación.

Tratamiento	5'-N	ADA	AK
Intactas	23.50 $\pm$ 1.4 (4)	4.06 $\pm$ 0.04 (4)	0.045 $\pm$ 0.01 (3)
Glucosa+SSI	27.06 $\pm$ 3.0 (5)	4.63 $\pm$ 0.4 (5)	0.043 $\pm$ 0.01 (5)
Glucosa+ADO	25.36 $\pm$ 2.3 (5)	5.61 $\pm$ 0.5 (5)	0.074 $\pm$ 0.01 (4)
EtOH+SSI	23.70 $\pm$ 2.6 (5)	4.41 $\pm$ 0.5 (6)	0.056 $\pm$ 0.01 (5)
EtOH+ADO	23.18 $\pm$ 2.1 (5)	4.30 $\pm$ 0.2 (5)	0.077 $\pm$ 0.03 (4)

TABLA 1. ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS QUE METABOLIZAN A LA ADENOSINA DURANTE EL MODELO AGUDO DE INTOXICACION CON ETANOL.

(En nmol / min / mg de proteína) .

Abreviaturas: 5'-N= 5'-nucleotidasa, ADA= adenosina deaminasa, AK= adenosina kinasa. EtOH= etanol, SSI= solución salina isotónica, ADO= adenosina.

Tratamiento	5'-N	ADA	AK
Intactas	23.50 $\pm$ 1.4 (4)	4.06 $\pm$ 0.06 (4)	0.045 $\pm$ 0.01 (3)
Agua+SSI	21.97 $\pm$ 3.5 (4)	3.86 $\pm$ 0.5 (4)	0.081 $\pm$ 0.01 (4)
Agua+ADO	25.80 $\pm$ 2.5 (4)	3.26 $\pm$ 0.2 (3)	0.045 $\pm$ 0.01 (3)
EtOH+SSI	23.01 $\pm$ 2.0 (4)	4.64 $\pm$ 0.5 (4)	0.077 $\pm$ 0.02 (4)
EtOH+ADO	25.76 $\pm$ 4.1 (4)	4.86 $\pm$ 0.5 (4)	0.067 $\pm$ 0.01 (4)

TABLA 2. ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS QUE METABOLIZAN A LA ADENOSINA DURANTE EL MODELO CRONICO DE INTOXICACION CON ETANOL, (En nmoI / min / mg de proteina).

Abreviaturas: 5'-N= 5'-nucleotidasa, ADA= adenosina deaminasa, AK= adenosina kinasa, EtOH= Etanol, SSI= solución salina isotónica, ADO= adenosina.

MODELO AGUDO

Tratamiento	Actividad SAH-H
Intactas	257.3 $\pm$ 24.0 (4)
Glucosa+SSI	260.4 $\pm$ 7.8 (5)
Glucosa+ADO	294.8 $\pm$ 37.8 (5)
EtOH + SSI	245.3 $\pm$ 27.2 (6)
EtOH + ADO	228.9 $\pm$ 20.6 (5)

MODELO CRONICO

Tratamiento	Actividad SAH-H
Intactas	257.3 $\pm$ 24.0 (4)
Agua + SSI	253.8 $\pm$ 33.8 (4)
Agua + ADO	305.2 $\pm$ 9.7 (3)
EtOH + SSI	250.1 $\pm$ 37.7 (4)
EtOH + ADO	195.5 $\pm$ 18.2 (4)

TABLA 3. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE S-ADENOSIL-HOMOCISTEINA HIDROLASA EN LA INTOXICACION AGUDA Y CRONICA CON ETANOL.  
( En pmol/min/mg de proteina).

Abreviaturas: SAH-H= S-adenosil-homocisteina hidrolasa, EtOH= etanol, SSI= solución salina isotónica, ADO= adenosina.

Tratamiento	NAD <sup>+</sup>	S/DTT	C/DTT	S/DTT +Pir-LDH	C/DTT +Pir-LDH
Intactas	-	4.94 ± 0.5 (4)	7.30 ± 0.8 (4)	7.46 ± 0.7 (4)	8.30 ± 0.8 (4)
	+	2.20 ± 0.4 (4)	2.54 ± 0.2 (4)	2.08 ± 0.2 (4)	2.02 ± 0.1 (4)
Gluc+SSI	-	9.96 ± 0.8 (5)	9.57 ± 1.4 (5)	10.5 ± 0.9 (5)	9.53 ± 1.2 (5)
	+	2.90 ± 0.1 (5)	2.64 ± 0.1 (5)	3.02 ± 0.2 (5)	2.45 ± 0.1 (5)
Gluc+ADO	-	8.58 ± 0.9 (5)	9.34 ± 0.2 (5)	11.6 ± 1.4 (5)	10.4 ± 1.0 (5)
	+	3.30 ± 0.3 (5)	2.95 ± 0.1 (5)	3.30 ± 0.3 (5)	2.76 ± 0.1 (5)
EtOH+SSI	-	11.0 ± 1.0 (6)	11.4 ± 1.0 (6)	9.47 ± 0.9 (6)	10.1 ± 0.7 (6)
	+	2.36 ± 0.1 (6)	2.74 ± 0.2 (6)	2.42 ± 0.1 (6)	2.50 ± 0.1 (6)
EtOH+ADO	-	11.1 ± 0.9 (5)	8.63 ± 0.5 (5)	12.2 ± 1.2 (5)	12.1 ± 1.0 (5)
	+	3.09 ± 0.2 (5)	2.84 ± 0.1 (5)	2.83 ± 0.3 (5)	2.80 ± 0.1 (5)

TABLA 4. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA XANTINA OXIDASA.  
 DETERMINACION DE PRODUCCION DE AC. ÚNICO A 292 nm.  
 MODELO AGUDO (En nmol / min / mg de proteína)

Abreviaturas: DTT= ditioneitol, PIR-LDH= piruvato-lactato  
 deshidrogenasa, NAD= nicotin-adenin-dinucleotido oxidado, EtOH=  
 etanol, SSI= solución salina isotónica, ADO= adenosina.

Tratamiento	SIN DTT	CON DTT
Intactas	11.04 $\pm$ 1.30 (4)	9.13 $\pm$ 1.50 (4)
Gluc+SSI	13.90 $\pm$ 0.89 (5)	10.14 $\pm$ 0.75 (5)
Gluc+ADO	9.96 $\pm$ 0.43 (5)	9.98 $\pm$ 0.85 (5)
EtOH+SSI	12.56 $\pm$ 1.5 (5)	11.85 $\pm$ 1.07 (5)
EtOH+ADO	10.18 $\pm$ 0.3 (5)	11.07 $\pm$ 0.86 (5)

TABLA 5. XANTINA OXIDASA. MODELO AGUDO. DETERMINACION DE NADH A 340 nm. (En nmol / min / mg de proteína).

Tratamiento	SIN DTT	CON DTT
Intactas	11.04 $\pm$ 1.30 (4)	9.13 $\pm$ 1.50 (4)
Agua+SSI	11.91 $\pm$ 1.60 (4)	9.71 $\pm$ 0.37 (4)
Agua+ADO	11.37 $\pm$ 1.51 (3)	11.09 $\pm$ 0.71 (3)
EtOH+SSI	14.45 $\pm$ 1.62 (4)	14.96 $\pm$ 0.77 (4)
EtOH+ADO	11.85 $\pm$ 0.63 (4)	12.35 $\pm$ 1.00 (4)

TABLA 6. XANTINA OXIDASA. MODELO CRONICO DETERMINACION DE NADH A 340 nm. (En nmol / min / mg de proteína)

Abreviaturas: DTT= ditioneitol, EtOH= etanol, SSI= solución salina isotónica, ADO= adenosina.

TRATAMIENTO		SIN DTT	CON DTT	SIN DTT	CON DTT
NAD <sup>+</sup>				+Pir-LDH	+Pir-LDH
Intactas	-	4.94 ± 0.5 (4)	7.27 ± 0.8 (4)	7.46 ± 0.7 (4)	8.29 ± 0.8 (4)
	+	2.00 ± 0.4 (4)	2.54 ± 0.2 (4)	2.08 ± 0.23 (4)	2.02 ± 0.1 (4)
Agua+SSI	-	7.97 ± 0.8 (4)	6.56 ± 0.5 (4)	7.52 ± 0.92 (4)	6.50 ± 0.6 (4)
	+	3.38 ± 0.3 (4)	2.81 ± 0.2 (4)	2.90 ± 0.25 (4)	2.60 ± 0.3 (4)
Agua+ADO	-	7.83 ± 0.7 (3)	7.60 ± 0.1 (3)	9.28 ± 0.8 (3)	8.53 ± 0.3 (3)
	+	2.92 ± 0.2 (3)	2.72 ± 0.1 (3)	2.03 ± 0.3 (3)	1.92 ± 0.2 (3)
EtOH+SSI	-	6.97 ± 0.6 (4)	7.51 ± 0.6 (4)	6.35 ± 0.6 (4)	7.36 ± 0.3 (4)
	+	2.42 ± 0.1 (4)	2.49 ± 0.2 (4)	2.15 ± 0.2 (4)	2.17 ± 0.2 (4)
EtOH+ADO	-	7.60 ± 0.8 (4)	7.68 ± 0.4 (4)	8.04 ± 0.8 (4)	7.79 ± 0.7 (4)
	+	2.26 ± 0.2 (4)	2.4 ± 0.1 (4)	1.88 ± 0.1 (4)	2.31 ± 0.2 (4)

TABLA 7. XANTINA OXIDASA. MODELO CRONICO. DETERMINACION DE PRODUCCION DE AC. URICO A 292 nm. (En  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  de proteina).

Abreviaturas: NAD<sup>+</sup>= nicotín-adenín-dinucleótido oxidado, DTT= ditioneitol, Pir-LDH= piruvato-lactato deshidrogenasa, EtOH= etanol, SSI= solución salina isotónica, ADO= adenosina.

	Molas/min/mg	pMolas/min/mg	mg/h	
REBANADAS +:	AK	ADA	SAH-H	AC. URICO
KREBS RINGER	0.485 ± 0.1 (6)	3.48 ± 0.3 (4)	137.8 ± 10.9 (6)	0.146 ± 0.03 (6)
K-R+EtOH 25mM	0.387 ± 0.1 (4)	4.17 ± 0.3 (5)	85.7 ± 12.5 (6)	0.111 ± 0.03 (6)
K-R+EtOH 25mM +ADO100µM	0.503 ± 0.3 (3)	5.30 ± 0.7 (3)	149.1 ± 9.65 (3)	0.379 ± 0.05 (3)
K-R+EtOH 25mM +ADO25mM	0.205 ± 0.04 (7)	3.68 ± 0.3 (8)	40.4 ± 2.99 (5)	0.159 ± 0.01 (6)

TABLA 8. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO "IN VIVO" DE ADICION DE ETANOL A REBANADAS DE HIGADO DE ANIMALES INTEGROS.

Abreviatura: AK= Adenosina kinasa, ADA= adenosina deaminasa, SAH-H= S-adenosil-homocisteina-hidrolasa, K-R= solución de Krebs-Ringer, EtOH= etanol, ADO= adenosina.