

116  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EMPLEO DE UN ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDEO (PIROXICAM) EN EL CONTROL DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA INDUCIDA CON ETANOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARCELA ROCHA BARRERA



MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



## **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.

## CONTENIDO

	Pag
I. ANTECEDENTES .....	1
1.0 Generalidades .....	1
2.0 Funciones hepáticas .....	2
2.1 Metabolismo de lípidos .....	2
2.2 Metabolismo de carbohidratos .....	9
2.3 Metabolismo de proteínas .....	10
3.0 Desequilibrio en el metabolismo de las grasas .....	11
3.1 Causas de la esteatosis hepática .....	13
3.1.1 En relación al flujo de ácidos grasos .....	13
3.1.2 En relación a la secreción de lipoproteínas..	13
3.2 Efecto del etanol sobre el metabolismo de las grasas .....	15
4.0 Metabolismo del etanol .....	18
4.1 Oxidación del etanol .....	18
4.1.1 Deshidrogenasa alcohólica .....	19
4.1.2 El sistema de oxidación microsomal .....	20
4.1.3 El de la catalasa .....	20
5.0 Radicales Libres .....	23
5.1 Toxicidad .....	23
5.2 Mecanismos de protección contra radicales libres .....	27
6.0 Antiinflamatorios no esteroideos .....	29
6.1 Clasificación .....	29
6.2 Mecanismos de acción .....	29
II OBJETIVO E HIPOTESIS .....	33

III MATERIAL Y METODOS .....	34
1.0 Material .....	34
1.1 Material biológico .....	34
1.2 Equipo .....	34
1.3 Reactivos .....	34
2.0 Métodos .....	34
2.1 Determinación de triacilglicéridos en hígado .....	34
2.2 Determinación de proteínas .....	41
IV RESULTADOS Y DISCUSION .....	44
V CONCLUSIONES .....	55
VI BIBLIOGRAFIA .....	56

## ANTECEDENTES .

## 1.0 GENERALIDADES

El empleo del etanol como droga psicotrópica esta legalmente aceptado por la mayoría de los gobiernos y religiones en el mundo, a pesar de que llega a producir adicción.

México es un país que enfrenta graves problemas originados por el elevado porcentaje de su población que consume etanol, esto preocupó al gobierno anterior dando como resultado la creación del Consejo Antialcohólico, este organismo se encarga de promover, en colaboración con otras instituciones: "El Programa Contra el Alcoholismo y el Abuso de Bebidas Alcohólicas". Este documento fué editado en 1985 y en el se puede leer lo siguiente: "En México la cirrosis alcohólica se encuentra entre las diez primeras causas de muerte en la población general y en la población masculina de 25-44 años de edad ocupa el primer lugar" (1).

En 1986 la cirrosis hepática ocupó el noveno lugar entre las principales causas de mortalidad en la población general con tasa de 21.9 X 100 000 habitantes siendo un gran problema en 9 Entidades Federativas (2).

La cirrosis se define como un trastorno hepático caracterizado por lesiones progresivas que producen bandas fibróticas o tejido cicatrizal el que atrapa las células hepáticas y trae como consecuencia una destrucción de la arquitectura microscópica lobulillar así como la alteración de las funciones del mismo (3).

En vista de que el uso y abuso del etanol afecta con frecuencia las funciones del hígado, se establecerán las características y funciones normales de este órgano para posteriormente relacionarlas a sus alteraciones por la ingesta aguda de etanol.

## 2.0 FUNCIONES HEPATICAS.

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo, se divide en dos lóbulos principales y se localiza en la cavidad abdominal inmediatamente por debajo del diafragma. Las unidades funcionales del hígado son los lobulillos; constituidos a su vez por células parenquimatosas denominadas hepatocitos. Esquema 1 (3).

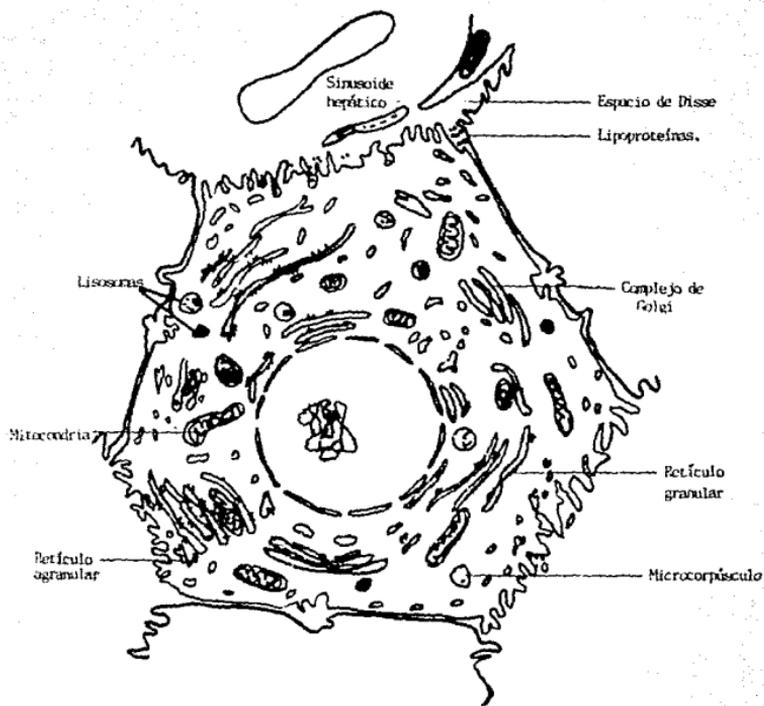
Es el principal órgano en lo que respecta al metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, lípidos, porfirinas y ácidos biliares. Es capaz de sintetizar la mayor parte de las proteínas orgánicas, excepto las gammaglobulinas y la hemoglobina. Es el principal sitio de almacenamiento de hierro, glucógeno, lípidos y vitaminas. Desempeña un papel importante en la detoxificación de los xenobióticos (moléculas extrañas al organismo) y en la excreción de los productos metabólicos finales como la bilirrubina y el amoníaco con el cual sintetiza la urea.

### 2.1 Metabolismo de lípidos.

El hígado ocupa un papel central en el flujo de lípidos entre los distintos tejidos de los mamíferos. El estado nutricional del organismo y los tejidos, son el factor principal que controla la tasa de lipogénesis. Bajo condiciones normales, la mayor parte de los ácidos grasos que llegan al hígado y son esterificados, provienen del tejido adiposo o de la dieta (4).

Los triacilglicéridos de la dieta son transportados desde el intestino hacia otros tejidos del cuerpo, y los formados en el hígado son secretados y depositados en el tejido adiposo para su almacenamiento. Finalmente los ácidos grasos almacenados como triacilglicéridos (en tejido adiposo), son tomados por otros tejidos cuando éstos requieren de una fuente de energía. Fig.1 (5).

Como sabemos, el medio del sistema circulatorio es una solución acuosa en la cual los lípidos son poco solubles. Para ser transportados a través del plasma, éstos son



ESQUEMA 1. CELULA HEPATICA (4).

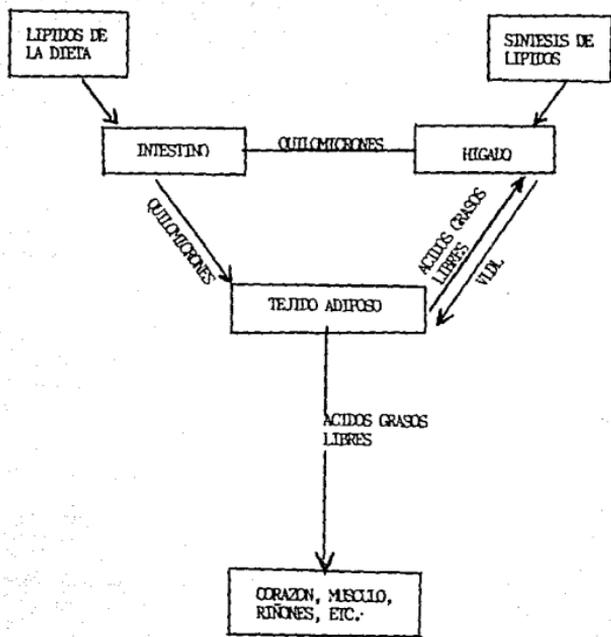


FIG.1 MOVILIZACION DE LIPIDOS ENTRE LOS DISTINTOS TEJIDOS (5)

"envueltos" en macromoléculas llamadas lipoproteínas: complejas y largas estructuras formadas por una unión física entre lípidos y proteínas, poseen una estructura miscelar, con un lado hidrofóbico (constituido por los lípidos) y uno hidrofílico (formado por las proteínas) Fig.2 (5).

Existen cinco clases de lipoproteínas séricas:

1. Quilomicrones. Transportan triacilglicéridos y son sintetizados en la mucosa intestinal. La hidrólisis catalizada por la lipoprotein lipasa de las células endoteliales produce una disminución progresiva de los triacilglicéridos en las moléculas de los quilomicrones, con la formación de una partícula de quilomacrón remanente.
2. VLDL (Del inglés very low density lipoproteins). Lipoproteínas de muy baja densidad o también se les conoce como pre-betas en función de su movilidad electroforética. La estructura esta constituida en un 90% por lípidos, de los cuales 50-65% son triacilglicéridos, son sintetizados principalmente en el hígado.
3. IDL (Del inglés intermediate density lipoproteins). Lipoproteínas de densidad intermedia. Son formadas en el plasma durante la conversión de VLDL a LDL.
4. LDL (Del inglés low density lipoproteins). Lipoproteínas de baja densidad o también se les conoce como lipoproteínas beta en función de su movilidad electroforética. La molécula está constituida por 75% de ésteres de colesterol, son formadas en el plasma durante el catabolismo de las VLDL.
5. HDL (Del inglés high density lipoprotein). Lipoproteínas de alta densidad o también se les conoce como lipoproteínas alfa en función de su movilidad electroforética. Son sintetizadas en el hígado e intestino, se cree que facilitan el catabolismo de las VLDL y los quilomicrones. Fig.3 (5).

Las lipoproteínas se identificaron por dos técnicas diferentes que las separan en base a dos de sus propiedades fisicoquímicas, bien sea sometiendo las a un campo gravitacional donde se separan en función de su densidad (VLDL, LDL, IDL, etc.) o bien en función de sus cargas libres y se denominan pre-beta, beta y gamma. Esquema 2(3).

Para poder ser secretados por el hígado, los triacilglicéridos deben formar lipoproteínas, al ensamblarse con apoproteínas específicas llamadas "proteínas aceptadoras

HDL

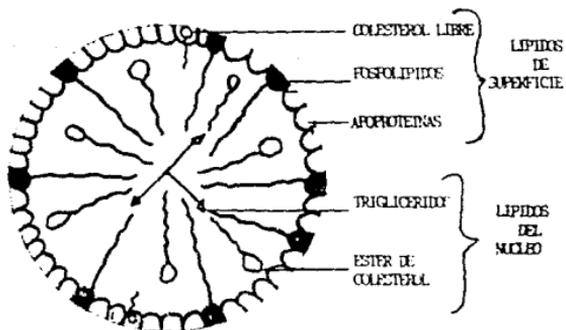


FIG.2 ESQUEMA DE UNA LIFOPROTEINA DE ALTA DENSIDAD (3)

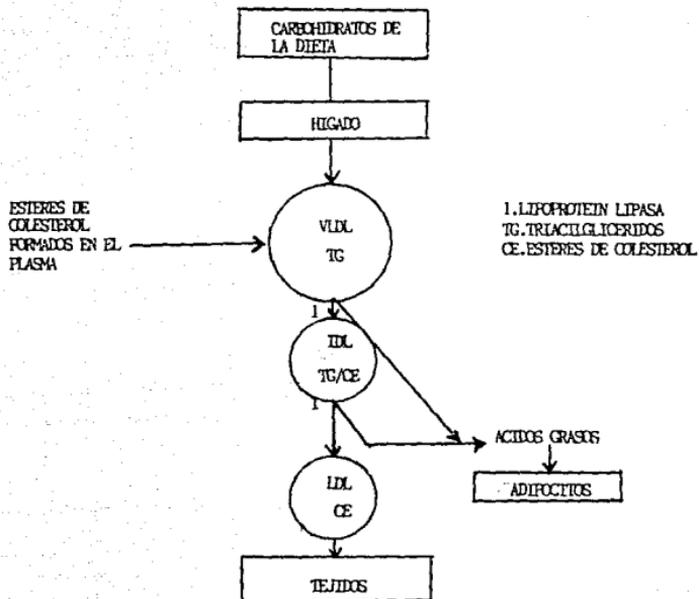
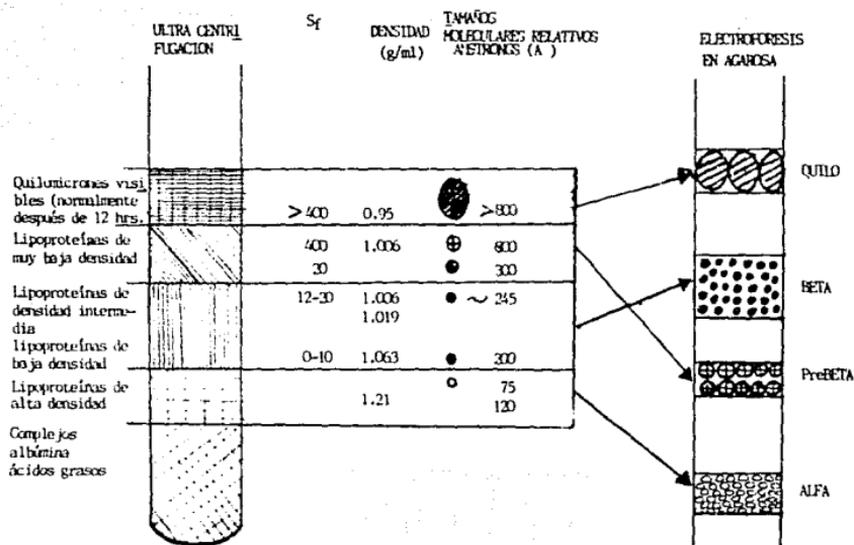


FIG.3 METABOLISMO DE VLDL, IDL Y LDL



$S_f$ . Índice de flotación de Svedberg

ESQUEMA 2. CARACTERIZACION GENERAL DE LAS PRINCIPALES LIPOPROTEINAS

de lípidos", esto se hace en los compartimientos subcelulares y culmina con la formación de una vesícula secretora y la exocitosis de la nueva VLDL en el espacio perisinusoidal de Disse. Algunas de las apoproteínas son:

- Apo A-I. Es la principal estructura proteínica de las HDL y es un activador de la lecitincolesterol aciltransferasa.
- Apo B. Es la principal estructura proteínica de las LDL. Esta relacionada en la unión entre las proteínas de alta densidad y los receptores de las células.
- Apo C-II. Es el activador de la lipoprotein lipasa. Están presentes en las VLDL, las HDL y los quilomicronos.
- Apo D. Aparentemente puede ser un acarreador de los ésteres de colesterol, transferirlos desde las HDL.
- Apo E. Es el factor que sirve para la unión de los quilomicronos remnentes con sus receptores presentes en el hígado (5).

A continuación se revisa brevemente el metabolismo de los hidratos de carbono y el de las proteínas en el hígado más adelante, para los fines de este trabajo, nos enfocaremos únicamente a las alteraciones que causa el consumo de etanol sobre el metabolismo de los lípidos.

## 2.2 Metabolismo de hidratos de carbono.

Los polisacáridos representan una forma de almacenamiento energético. El hígado es capaz de sintetizar glucógeno, en polisacárido de almacenamiento principal, mediante la glucogénesis y la degradación del glucógeno a través de la glucogenólisis. Todas las células de los mamíferos metabolizan la glucosa a piruvato y lactato por la vía de la glucólisis; para que la glucosa entre en esta vía es necesaria su fosforilación. La glucólisis puede realizarse en ausencia de oxígeno (anaerobia) y el producto final es el lactato. Los tejidos pueden utilizar el oxígeno (aerobios), tienen la facultad de metabolizar el piruvato a acetilCoA, esta puede entrar al ciclo de Krebs para su oxidación completa a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , con conversión de una gran cantidad de

energía libre como ATP en el proceso de fosforilación oxidativa. Dado que el índice de consumo energético en la mayoría de los tejidos es relativamente constante, el ATP, necesario para el mantenimiento de la integridad y las funciones celulares, es normalmente provisto por el metabolismo oxidativo del NADH mitocondrial.

La gluconeogénesis es una importante fuente de glucosa sanguínea cuando existe un agotamiento del glucógeno hepático.

La gluconeogénesis no es simplemente una inversión del mecanismo de la glucólisis, dado que las reacciones catalizadas por la piruvatoquinasa, la fosfofructoquinasa y la hexoquinasa no son reversibles. El lactato y los aminoácidos actúan como precursores para el ciclo gluconeogénico (3).

### 2.3 Metabolismo de proteínas.

El metabolismo hepático de las proteínas es fundamental para la conservación de la vida; consta de reacciones catabólicas como anabólicas. Algunas de estas reacciones existen en otras células del organismo pero son más lentas que en los hepatocitos. En las células hepáticas los aminoácidos pueden correr varias suertes. Pueden unirse para dar proteínas estructurales, enzimáticas o circulantes (del plasma); pueden ser metabolizadas para producir energía mediante su transformación en intermediarios de los carbohidratos, este metabolismo suministra también el nitrógeno y las cadenas de carbono necesarias para producir otros compuestos en el hígado.

Con excepción de las inmunoglobulinas, todas las proteínas plasmáticas son producidas por las células hepáticas, unas de las proteínas más importantes que sintetiza el hígado es la albúmina, junto con otras proteínas, es producida por los ribosomas y pasa después al espacio extracelular. La transferencia de nitrógeno entre aminoácidos es una de las funciones principales de los hepatocitos; el hígado puede sintetizar los aminoácidos no esenciales mediante reacciones de transaminación entre ácidos aminados y cetoácidos. Los aminoácidos suministran el nitrógeno y las cadenas de carbono necesarias para la síntesis hepática de la creatinina, las purinas y las pirimidinas.

El amoníaco es una sustancia tóxica que se libera por la desaminación de los aminoácidos antes de que se utilicen para la producción de energía y es producido continuamente

te por las bacterias en el intestino, de donde pasa a la corriente sanguínea. La formación de urea representa un mecanismo de eliminación del amoníaco; la urea es el principal producto nitrogenado de excreción en el hombre, o sea, es el producto final más abundante del catabolismo de las proteínas. Todas las enzimas que se requieren en el ciclo de la ornitina (mecanismo de formación de la urea), se encuentran en el hígado.

El hígado representa un mecanismo de regulación entre la ingestión con alimentos y las necesidades de aminoácidos del organismo para la síntesis de proteínas (6). Todos los aminoácidos absorbidos por el intestino después de una comida pasa al hepatocito (con excepción de la valina, leucina y la isoleucina), posteriormente la célula hepática mantiene un suministro prácticamente constante de aminoácidos esenciales para las demás células.

### 3.0 DESEQUILIBRIO EN EL METABOLISMO DE LAS GRASAS.

Se define a la esteatosis como el acúmulo de grasa en las células parequimatosas: donde la célula lesionada es incapaz de metabolizar o movilizar concentraciones aún normales de lípidos, en tanto que la célula normal puede sintetizar grandes cantidades de grasa cuando se le presenta un exceso de sustrato. Microscópicamente pueden verse pequeñas o grandes gotas de grasa alrededor de la membrana del retículo endoplásmico como resultado de la coalescencia de triacilglicéridos retenidos; la cantidad de grasa manifiesta un desequilibrio en la producción, utilización y movilización de las mismas (7).

En circunstancias normales, los lípidos son transportados del intestino y del tejido adiposo hacia el hígado, en forma de quilomicrones, en el primer caso, y en forma de ácidos grasos libres para el segundo caso, donde son esterificados en triacilglicéridos convertidos en colesterol y fosfolípidos o degradados a cuerpos cetónicos; parte de los ácidos grasos son sintetizados en el hígado a partir de acetato.

Al ocurrir una acumulación progresiva de triacilglicéridos, el hígado aumenta de dimensiones, es blando, amarillo grasoso y fácil de fracturar, los hepatocitos se transforman, prácticamente, en lipocitos con núcleos periféricos comprimidos (7).

En humanos el grado de esteatosis tiene correlación con las deficiencias dietéticas, las personas con baja ingesta de proteínas presentan con más frecuencia este padecimiento. En función de este trabajo son de interés los hallazgos de un estudio de sujetos con hígado normal el cual mostró que la ingestión de 150-200g de etanol por día, durante 12 días, produce hígado graso, sin tener en cuenta el contenido de la dieta (7). Habitualmente el hígado graso del alcohólico se resuelve sin dejar secuelas, esto sucede cuando se suprime la ingesta de alcohol y se retorna a una alimentación adecuada, en muy pocos casos puede considerarse como una lesión precirrótica.

### 3.1 Causas de la esteatosis hepática.

Para explicar el mecanismo por medio del cual se produce hígado graso se han propuesto numerosas teorías, que incluyen anomalías fisiológicas y bioquímicas, y también trastornos en el metabolismo de las lipoproteínas.

El hígado normal contiene aproximadamente el 5% de su peso en grasa (peso del hígado 1.4kg), durante el acúmulo de grasa puede llegar a 40-50%, el peso total equivalente a 0.4 o 0.6kg. Esto se refleja clínicamente por hepatomegalia y anomalías en la función hepática y se denomina indistintamente: degeneración grasa, metamorfosis —grasa o esteatosis hepática, que es el nombre más adecuado.

Se ha demostrado en los estudios sobre la esteatosis hepática que uno, o la combinación de cualquiera de los siguientes mecanismos está involucrado. Algunos se vuelven — más importantes que otros, dependiendo del agente que cause la alteración:

3.1.1 Un incremento en el flujo de ácidos grasos proviene de un desequilibrio en la síntesis de triacilglicéridos y su secreción esto puede ser ocasionado por:

- a) Una mayor movilización de los ácidos grasos desde el tejido adiposo por ingestión elevada en la dieta.
- b) Un incremento en la síntesis de los mismos.
- c) Una disminución en la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias.
- d) Un incremento en la esterificación de ácidos grasos a triacilglicéridos.

3.1.2 Disminución en la secreción de lipoproteínas, es decir el defecto de uno o más de los pasos involucrados en la unión, transporte intracelular o secreción de las VLDL nacientes. Fig.4 (8).

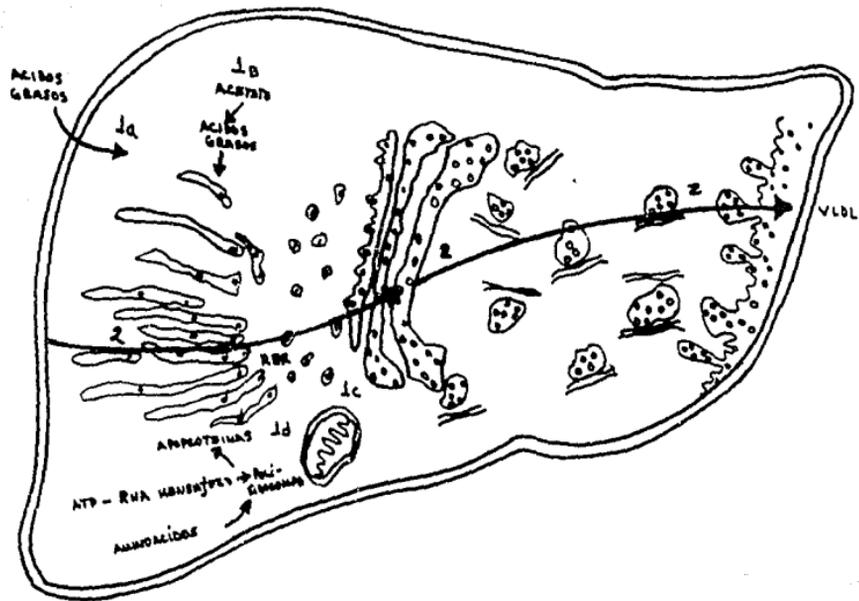


FIG.4 MECANISMOS DE FORMACION DE HIGADO GRASO

### 3.2 Efecto del etanol sobre el metabolismo de grasas.

La manera en la que la ingesta aguda de etanol puede producir esteatosis es por:

#### 1. Un aumento en el flujo de ácidos grasos hacia el hígado.

- a) Cuando hay una concentración elevada de etanol en sangre (mayor que 50 moles/l), se incrementan los ácidos grasos libres en el suero (9), sin embargo, en niveles muy bajos de etanol en sangre, no se detectan cambios significativos de ácidos grasos libres en el suero (10).

La captación hepática de ácidos grasos es proporcional a la concentración de los mismos en el plasma.

Una administración prolongada de alcohol ocasiona la formación de un hígado graso con concentraciones normales de ácidos grasos en el suero.

Así, la esteatosis hepática puede ser el resultado de un aumento en el flujo de ácidos grasos de los tejidos periféricos hacia el plasma, con lo que aumenta la captación hepática de dichos ácidos grasos. Fig.4

- b) Un incremento en la síntesis de ácidos grasos.

El etanol inhibe el ciclo de los ácidos tricarbóxicos en los hepatocitos, esto se debe en parte a:

El daño que sufren las mitocondrias, al incremento en la relación  $NADH/NAD^+$  y a la disminución en la conversión de malato a oxalacetato. Un aumento en la producción de acetato, el cual está disponible para la síntesis de ácidos grasos. El incremento en los niveles de acetato, también inhibe la oxidación de ácidos grasos (8).

- c) Una disminución en la beta-oxidación de ácidos grasos. El acetaldehído es el principal producto del metabolismo del etanol, en el hombre su concentración aumenta después de la ingestión de etanol (11).

El acetaldehído aumenta los valores de ácidos grasos libres y de triacilglicéridos en el suero. Así, la producción de acetaldehído puede formar un ciclo vicioso en el daño a la mitocondria (12).

d) Un incremento en la esterificación de ácidos grasos a triacilglicéridos, la alteración que se registra en el sistema de esterificación de los ácidos grasos ha sido asociada con el incremento en los niveles hepáticos de  $\alpha$ -glicerofosfato, sustrato para la formación de triacilglicéridos (13).

La producción de  $\alpha$ -glicerofosfato es aumentada por el NADH, y el etanol directamente induce la actividad de la enzima  $\alpha$ -L-glicerofosfato transferasa, que cataliza el primer paso en la formación de triacilglicéridos (11).

2. Una disminución en la liberación de lipoproteínas desde el hígado. Cuando se eleva el nivel de etanol en el hombre, inicialmente se aumentan los niveles de triacilglicéridos en el plasma (10), sin embargo, el incremento en la liberación de lipoproteínas desde el hígado no es suficiente para compensar el aumento en la producción de triacilglicéridos. Cuando se alcanzan niveles elevados de alcohol en la sangre (mayores que 50 moles/l), disminuyen los triacilglicéridos y aumentan los ácidos grasos libres en el plasma. (Fig.4 mecanismo 2).

El alcohol aparentemente no afecta la absorción intestinal de los lípidos, la síntesis de proteínas o la formación de lipoproteínas, tampoco el paso de los quilomicrones hacia el hígado. El etanol aumenta la relación citosólica de NADH/NAD<sup>+</sup>, se cree que este cambio no es un factor determinante en la formación de hígado graso a causa de su consumo por las siguientes razones:

- 1o. Por que la relación NADH/NAD<sup>+</sup> aumentada después de la ingestión de etanol regresa a los valores normales cuando se acumula la grasa (8).
- 2o. El tratamiento con antioxidantes disminuye el hígado graso y la relación NADH/NAD<sup>+</sup> (8).

Las diferentes deshidrogenasas ubicadas en el citosol del hepatocito comparten las pozas de NADH y NAD<sup>+</sup>, y por la ley de acción de masas la escasez del NAD<sup>+</sup> y el exceso en la poza de NADH, se reflejará en la mayor producción de los metabolitos reduci-

dos. La mayor relación NADH/NAD<sup>+</sup> hace que se forme más glicerofosfato que dihidroacetona fosfato, los sustratos de la deshidrogenasa de glicerofosfato. Con ello el metabolismo se desplaza hacia la síntesis de triacilglicéridos hepáticos (14).

#### 4.0 METABOLISMO DEL ETANOL.

El etanol prácticamente no es metabolizado en la luz del tubo digestivo, solo una pequeña cantidad de éste es parcialmente oxidado por acción de una deshidrogenasa alcohólica presente en las mucosas intestinales (14), la mayor parte del etanol consumido se absorbe como tal a través de las mucosas, tanto del tubo digestivo como del sistema respiratorio, dicha absorción sucede por una simple difusión a favor del gradiente de concentración. Por lo tanto la velocidad de absorción del etanol y su consecuente concentración en la sangre circulante dependerá de: la concentración de etanol ingerida y la velocidad a la cual se ingieren alimentos, la cantidad y tipo de alimentos, la edad, el sexo, el peso corporal y la proporción del tejido adiposo del organismo. El aumento en la concentración de etanol en la sangre puede variar desde 30 hasta 270mg/100ml (6.5-58.7 moles/l) en una hora (14).

Se ha demostrado que la concentración de etanol es mayor en la vena porta que en la circulación general, este hecho es de gran interés práctico puesto que parte del alcohol es oxidado por el hígado antes de alcanzar la circulación general.

La distribución de etanol en el organismo ocurre en proporción al contenido de agua en los tejidos. El hombre posee un mayor volumen total de agua corporal que la mujer, lo que explica una mayor concentración de etanol en sangre en las mujeres después de ingerir la misma cantidad de etanol que el hombre.

La fase de eliminación se caracteriza por un descenso progresivo de su concentración sanguínea. El 90% de alcohol que desaparece en la sangre se oxida en forma completa hasta  $H_2O$  y  $CO_2$ ; pequeñas cantidades de etanol se excretan como tal por los pulmones, la orina y el sudor (14).

#### 4.1 Oxidación del etanol.

La oxidación inicial de etanol a acetaldehído se realiza como se mencionó anterior-

mente en el hígado por medio de tres sistemas enzimáticos:

4.1.1 El de la deshidrogenasa alcohólica. DHA. (E.C.1.1.1.1).

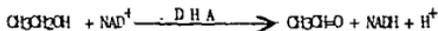
4.1.2 El sistema de oxidación microsomal del etanol. (Some).

4.1.3 El de la catalasa. (E.C.1.11.1.6).

4.1.1 Sistema de la DHA. Representa la vía principal de oxidación del etanol in vivo.

Se ha puesto de manifiesto el polimorfismo de la deshidrogenasa alcohólica en el hombre (14), de lo que resulta que las afinidades tan variables de las formas de la enzima para su sustrato, son en gran parte las responsables de la diferente velocidad de eliminación in vivo.

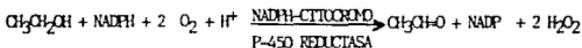
La reacción catalizada por este sistema es la siguiente:



Esta reacción sucede en el citosol del hepatocito.

Durante las fases iniciales de absorción del etanol en el tracto intestinal, la reoxidación del NADH en el citosol del hepatocito es suficiente para la conversión del etanol en acetaldehído, sin embargo al continuar la oxidación del etanol conforme a la reacción anotada en el párrafo anterior, se consume cada vez más  $\text{NAD}^+$ , los sistemas sistólicos de su reoxidación son insuficientes. El  $\text{NAD}^+$  disminuye progresivamente y forma cada vez más NADH, por lo tanto, se alcanza un nuevo equilibrio en un estado redox cada vez más reducido (existe cada vez más NADH y menos  $\text{NAD}^+$ ), a medida que mas etanol se convierte en acetaldehído, por medio de la DHA.

4.1.2 El sistema de oxidación microsomal del etanol requiere de NADPH y  $O_2$ , oxida el etanol (y otros alcoholes alifáticos de cadena larga) y forman acetaldehído,  $NADP^+$  y  $H_2O$  por medio de la siguiente reacción:

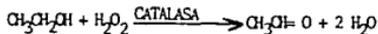


Un componente importante del sistema es el citocromo P-450.

La existencia de este citocromo explica en parte la mayor susceptibilidad de los alcohólicos a algunos agentes agresores del medio ambiente (15).

Este sistema microsómico se encuentra en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos. La inducción de la actividad del sistema se asocia además con un incremento en la actividad de diversos constituyentes del retículo endoplásmico liso involucrados en el metabolismo de las drogas, como el citocromo P-450. Estos cambios son importantes clínicamente dado que convierten al alcohólico en un paciente resistente a los efectos de varios sedantes comunes y barbitúricos, lo que implica la necesidad de administrar dosis mayores. Sin embargo, si el etanol y los barbitúricos se consumen simultáneamente, la inhibición competitiva a nivel de este sistema enzimático produce una disminución de la depuración y la presencia de niveles anormales elevados de uno o bien de ambos. Pueden presentarse casos de sobredosis letales como consecuencia de esta interacción (3).

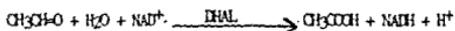
4.1.3 La reacción de oxidación del etanol con la participación de la catalasa es la siguiente:



Sin embargo, se ha considerado no significativa la participación de la catalasa hepática en el metabolismo del etanol in vivo. La conclusión anterior se logró

después de haber administrado un potente inhibidor de la catalasa el 3-amino-1,2,4-triazol. El cual administrado simultáneamente no produce alteraciones en la velocidad del metabolismo del etanol (15).

De todas las moléculas formadas a partir del etanol, el acetaldehído ha acaparado la atención en los años recientes. Es un producto común formado por cualquiera de los tres sistemas enzimáticos que oxidan el etanol. La degradación del acetaldehído se realiza en una reacción catalizada por la deshidrogenasa aldehídica, que tiene como coenzima al  $NAD^+$ :



Durante el metabolismo del etanol se suspenden en gran parte las reacciones de oxidación de los hepatocitos relacionados con el ciclo de Krebs, también se inhibe la gluconeogénesis; esto se debe al incremento en la relación  $NADH/NAD^+$  en el citoplasma de los mismos. Cada molécula de etanol que es oxidada secuencialmente por la ADH y la ALDH en acetato genera dos moléculas de NADH en el citoplasma (16).

La mayor relación de  $NADH/NAD^+$  hace que se forme más glicerolfosfato que dihidroxiacetona fosfato, con ello el metabolismo se desplaza hacia la síntesis de triacilglicéridos hepáticos. Fig.5 (14).

Para explicar el daño hepático producido por el etanol a nivel molecular se han invocado varias teorías, una de ellas es sobre inmunidad, otra es la hipoxia celular, también se piensa que los radicales libres del oxígeno tienen un papel importante en el daño celular hepático inducido por el consumo crónico de etanol.

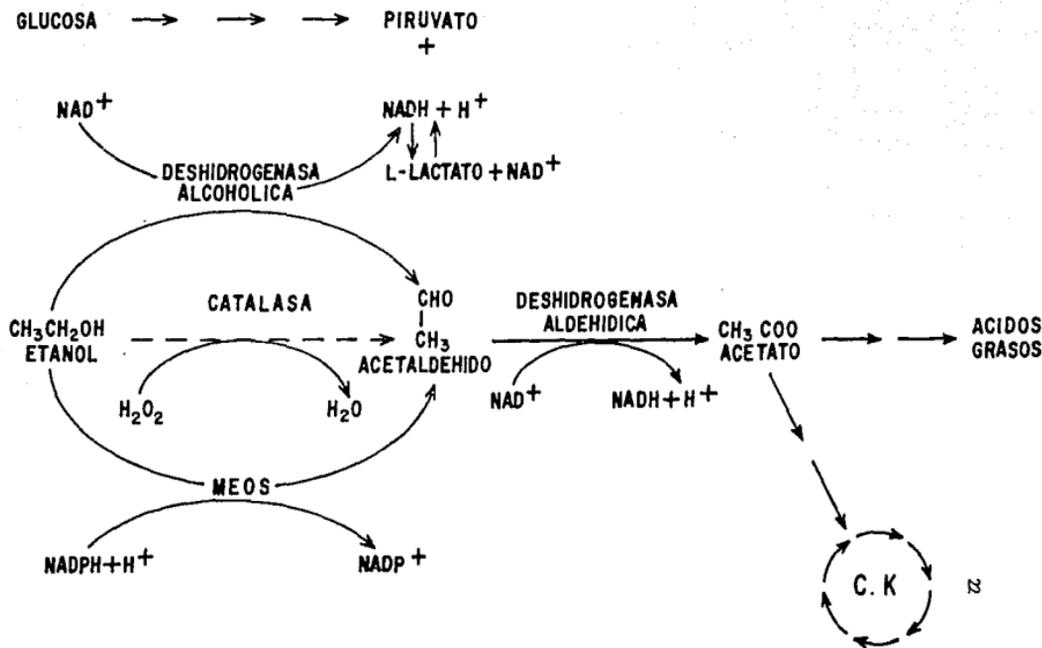


FIG. 5 METABOLISMO DEL ETANOL Y SU INTERACCION CON LAS PRINCIPALES VIAS.

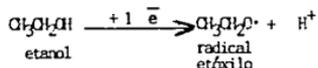
## 5.0 RADICALES LIBRES.

Para esta tesis es importante revisar la génesis de los llamados radicales libres así como el posible daño que producen tales radicales libres en las células del organismo.

Los radicales libres son fragmentos de moléculas que contienen un electrón no apareado (17,15,19).

Generalmente no es fácil detectarlos ya que son especies muy reactivas y su vida media es muy corta, además de que están presentes en muy bajas concentraciones (18,19). Durante el metabolismo normal la principal fuente de los radicales libres presentes en los tejidos es el oxígeno a partir del cual se forman el ión superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidróxilo ( $OH^\cdot$ ), a los cuales se les suma el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , que en sí no es un radical libre pero cuya degradación puede dar origen al radical hidróxilo ( $OH^\cdot$ ) (20).

En el proceso de degradación y eliminación de algunos agentes xenobióticos por parte de los organismos multicelulares también llegan a formarse radicales libres. En estudios recientes se ha demostrado que el etanol puede ser transformado en un radical libre.



## 5.1 Toxicidad.

En los tejidos, los radicales libres, tanto los provenientes del oxígeno como los de otros orígenes, debido a su alta reactividad y a su capacidad oxidante, reaccionan con las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos (la reacción con éstos últimos da origen a la llamada lipoperoxidación y ocasionan alteraciones en la o las funciones de las moléculas afectadas. De esta manera, elevando la poza de radicales libres, el

etanol contribuye a alterar las células del organismo.

El acetaldehído, como se mencionó anteriormente, es el primer producto de la oxidación del etanol, se piensa que puede producir radicales libres, en presencia de oxígeno que ataca a los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas y organelos produciendo lipoperoxidos y lipoperóxidos (21).

Numerosos estudios de diferentes laboratorios señalan incrementos en los productos de la lipoperoxidación, principalmente el malondialdehído, después del consumo de etanol. Cuando el metabolismo del etanol fué bloqueado por pirazol a nivel de la ADH disminuyó este producto y aumentó con el disulfiram, un inhibidor de la ALDH que promueve la acumulación de acetaldehído genera radicales libres que pueden ser los responsables del daño, Fig.6 (21).

Los radicales libres, como se conoce, producen alteraciones moleculares que modifican algunas funciones celulares como con la permeabilidad, el transporte, la secreción, etc.

Los radicales generados pueden reaccionar con diferentes compuestos e iniciar reacciones tóxicas *in situ*, sin cruzar membrana celular o subcelular.

A continuación se explicará la alteración que sufre la membrana: La membrana de los hepatocitos es un sitio crítico de reacción para los radicales libres por los siguientes hechos:

- Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana citoplásmica y las proteínas estructurales con la consecuente pérdida de las funciones: rompimiento de gradientes iónicos transmembranales, escape de enzimas, esteatosis, etc., Fig.7 (6).

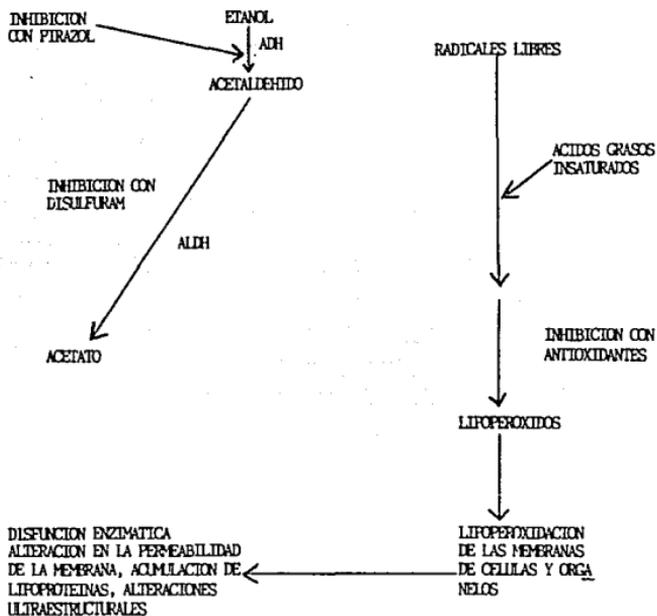


FIG.6 MECANISMO PROPUESTO PARA EXPLICAR EL DAÑO CAUSADO POR EL ALCOHOL EN EL HIGADO (21)

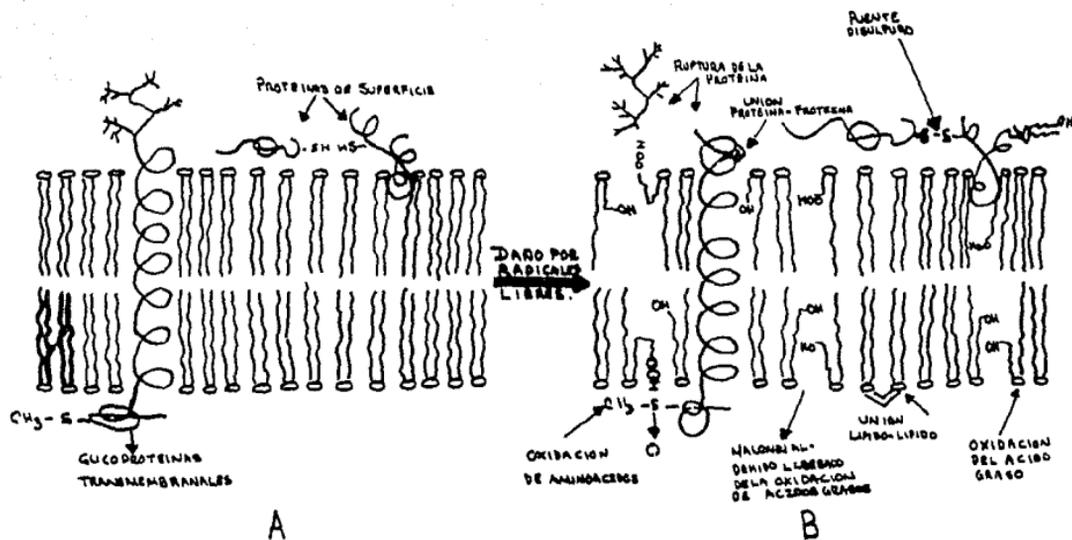


FIG.7 MEMBRANA NORMAL (A)  
 MEMBRANA DAÑADA POR RADICALES LIBRES (B)

## 5.2 Mecanismos de protección contra los radicales libres.

Para protegerse de un exceso de radicales libres la célula cuenta con dos mecanismos complementarios:

- A. Una batería de enzimas oxidantes. Entre las que se encuentran; la citocromo oxidasa, la superóxido dismutasa, la catalasa, la peroxidasa, la xantina oxidasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (6,22).
- B. Un grupo de atrapadores fisiológicos entre los que se encuentran; las vitaminas A, C,E, el ácido úrico, el glutatión reducido y la bilirrubina. Fig.8 (6).

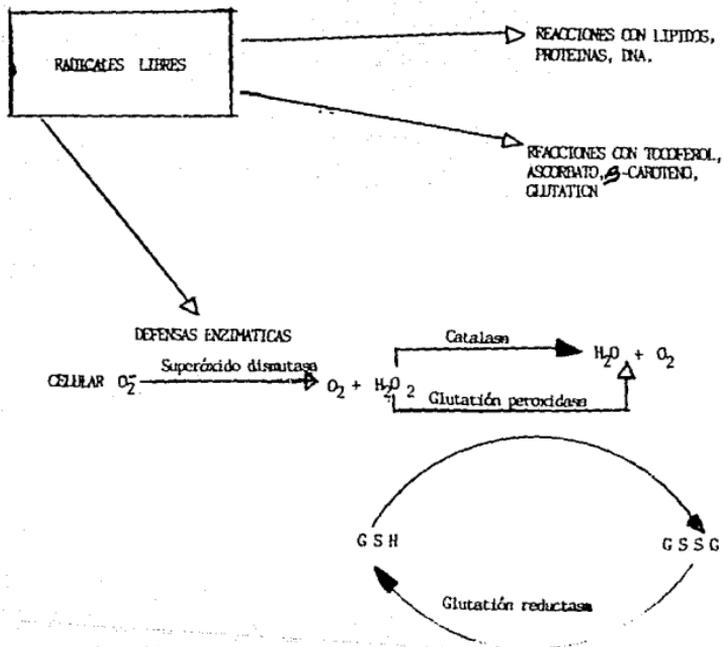


FIG. 8 ESQUEMA DE MECANISMOS DE PROTECCION CONTRA LOS  
 RADICALES LIBRES (6).

## 6.0 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

En estudios efectuados por Sagone (20), se estableció que el ácido benzoico, el compuesto representativo del grupo de los salicilatos, es descarbonilado e hidroxilado por el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), producido por la estimulación de granulocitos. Esto sugirió que los salicilatos se oxidan de forma similar que el ácido benzoico por los AINES. La reacción rápida de los salicilatos con el radical  $\text{OH}^{\bullet}$  puede estar directamente relacionada con las propiedades antiinflamatorias que se les conoce.

### 6.1 Clasificación.

Las drogas de este grupo poseen no sólo actividad antiinflamatoria, sino en general son antipiréticos y analgésicos.

A. Salicilatos. Como la aspirina. Fig.9

B. Otros ácidos orgánicos. Son derivados del ácido salicílico, éstos han sustituido a la aspirina (reproven, etc.). Fig.9

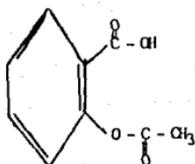
C. Derivados de paracetamol. Fig.9

Derivados de pirazolona. Fig.9

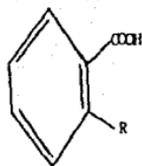
Derivados de quinolona (23). Fig.9

### 6.2 Mecanismos de acción. Fig.10

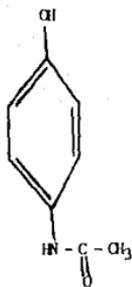
- Inhibición de la síntesis de prostaglandinas.
- Inhibición de la síntesis de leucotrienos.
- Inhibición de la secreción, metabolismo o acción de histamina.
- Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.
- Acción de atrapadores de los radicales libres de oxígeno (24).



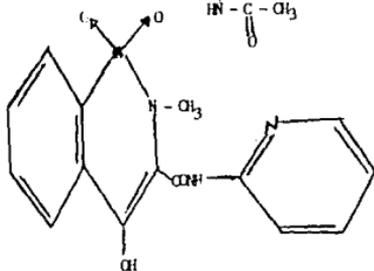
ASPIRINA



DERIVADOS DEL ACIDO SALICILICO



ACETAMINOFENOL



PIROXICAM

FIG. 9 ESTRUCTURA QUIMICA DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.

En 1971 Vane descubrió que el mecanismo de acción de los AINEs es inhibir a la enzima ciclo oxigenasa, con lo que se inhibe la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.

En dosis terapéuticas los salicilatos desacoplan la fosforilación oxidativa con lo cual se aumenta el consumo periférico de oxígeno con un incremento en la producción de  $CO_2$ . La acción de los desacopladores consiste en separar la oxidación de la fosforilación en la cadena respiratoria. Esto da por resultado una respiración no controlada, puesto que la concentración de ADP o Pi ya no limitan la velocidad de la respiración.

En estudios efectuados por Kaplan se demostró que el AINE piroxicam inhibe la generación de aniones superóxido ( $O_2^-$ ) generados por neutrófilos humanos como respuesta a concavalina A y al acetato mirístico de formol.

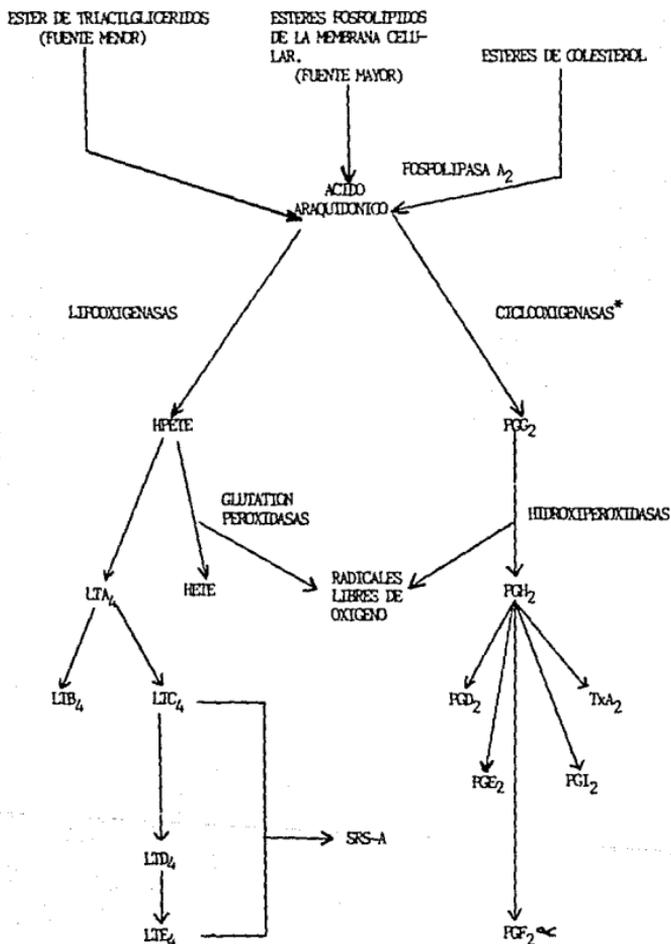


FIG. 10 METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO.

## II. OBJETIVO E HIPOTESIS.

### OBJETIVO.

Explorar el posible efecto de un AINE sobre la acumulación de grasa en el hígado como respuesta a una carga aguda de etanol.

### HIPOTESIS.

Si el etanol incrementa la poza de radicales libres y se conoce que algunos AINEs son atrapadores de radicales libres entonces es posible que los AINEs modulen el daño causado por la acumulación de grasa en el hígado.

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### 1.0 Material.

##### 1.1. Material biológico.

Los experimentos fueron realizados empleando ratas macho de la cepa Wistar, peso promedio 220g, con 16 horas de ayuno.

##### 1.2. Equipo.

- Homogenizador de tejido tipo Potte Eweljhem.
- Potenciómetro Herisau.
- Espectrofotómetro APOL. Zeiss.

##### 1.3. Reactivos.

- Etanol marca Merck. Grado analítico.
- Piroxicam marca Feldene, Fasicam, 10mg/Kg de peso.
- Todos los demás reactivos fueron de grado analítico de las marcas: Sigma EU, Merck y Baker.

#### 2.0 Métodos.

##### 2.1. Determinación directa de triacilglicéridos en hígado.

Método de Van Handel y Zilvermit (25).

Fundamento.- Los triacilglicéridos son separados para su determinación absorbiendo los fosfolípidos en zeolita (silicato). Posteriormente los triacilglicéridos son extraídos con cloroformo y son determinados por la formación de un cromógeno.

### Técnica.

1. A las ratas se les administran las sustancias de la siguiente manera:

Rata 1. Control ( $R_1$ ). Glucosa. Vía oral.

Rata 2. Problema ( $R_2$ ). Etanol 5g/kg de peso. Vía oral.

Rata 3. ( $R_3$ ) Etanol 5g/kg de peso más piroxicam 10mg/kg de peso. Vía oral.

Rata 4. ( $R_4$ ). Piroxicam 10mg/kg de peso. Vía oral.

En donde:

$R_1$  es la rata control que nos permite conocer los valores de triacilglicéridos en las condiciones experimentales consideradas como normales.

$R_2$  es la rata problema y nos permite conocer la alteración que causa el etanol en el metabolismo de los lípidos.

$R_3$  en esta sabremos si el piroxicam afecta las alteraciones producidas por el etanol sobre la concentración de triacilglicéridos.

$R_4$  esta rata permite controlar el posible efecto del medicamento que se esta empleando en relación con el metabolismo de los lípidos.

2. Terminada la administración dejar transcurrir el tiempo que se requiere para registrar, en función del tiempo los efectos de los metabolitos y fármacos usados en relación con el metabolismo de los lípidos.

3. Preparar vasos de precipitado con solución amortiguadora de fosfatos y colocarlos en baño de hielo.

4. Sacrificar las ratas por decapitación. Extraer el órgano en estudio (hígado), pesarlo y colocarlo rápidamente en la solución amortiguadora.

5. Lavar y picar finamente el hígado (efectuar 3 cambios de buffer hasta que quede clara la solución). Homogenizar, introducir 3 veces el homogenizador.

Una vez que se tiene el homogenado efectuar lo siguiente:

a. Pesar 4g de zeolita, colocarlos en tubos de ensayo y adicionar 5ml de cloroformo (para activar la zeolita).

- b. Adicionar 1 ml de homogenado (mezclar).
- c. Adicionar 10 ml de cloroformo (para extraer los lípidos).
- d. Agitar por espacio de 10 minutos cada tubo.
- e. Filtrar y trabajar el filtrado como se indica a continuación:

	Problema Sap*	Problema No sap**	Estandar Sap*	Estandar No sap**	Blanco
Filtrado	1 ml	1 ml	---	---	---
Estandar	---	---	1 ml	1 ml	---
Poner en baño maria a 80°C hasta evaporación.					
KOH/ETOH	0.5ml	---	0.5ml	---	---
ETOH 95%	---	0.5ml	---	0.5ml	---
Mezclar en vortex y colocarlo en baño maria 60-70°C, 12'					
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	---

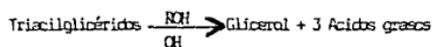
\* Sap. Lípidos saponificados.

\*\* No sap. Lípidos no saponificados.

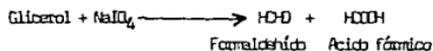
	Problema Sep	Problema No sep	Estandar Sep	Estandar No sep	Blanco
Mezclar y colocar en baño maria a ebullición por 15'. Enfríar a chorro de agua.					
Metaperoxy dato.	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
Dejar reposar 10' y forrar los tubos con papel aluminio (porque el complejo que se forma es inestable en presencia de luz).					
Arsenito de sodio	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
Mezclar y dejar reposar por algunos minutos.					
Picidyl cro notrópico.	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Agua	---	---	---	---	1ml
Mezclar y poner en baño maria a ebullición por 30'. Dejar enfriar y leer a 570m el cromógeno.					

El procedimiento consta de cinco pasos;

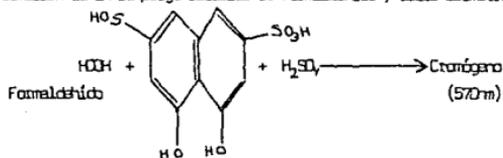
1. Homogenización del tejido.
2. Adsorción de los fosfolípidos en la zeolita, seguida de la extracción de los triacilglicéridos con cloroformo.
3. Hidrólisis de triacilglicéridos con  $\text{NaOH}$ , en los ácidos grasos y el glicerol.



4. Oxidación del glicerol con metaperiodato de sodio a ácido fórmico y formaldehído.

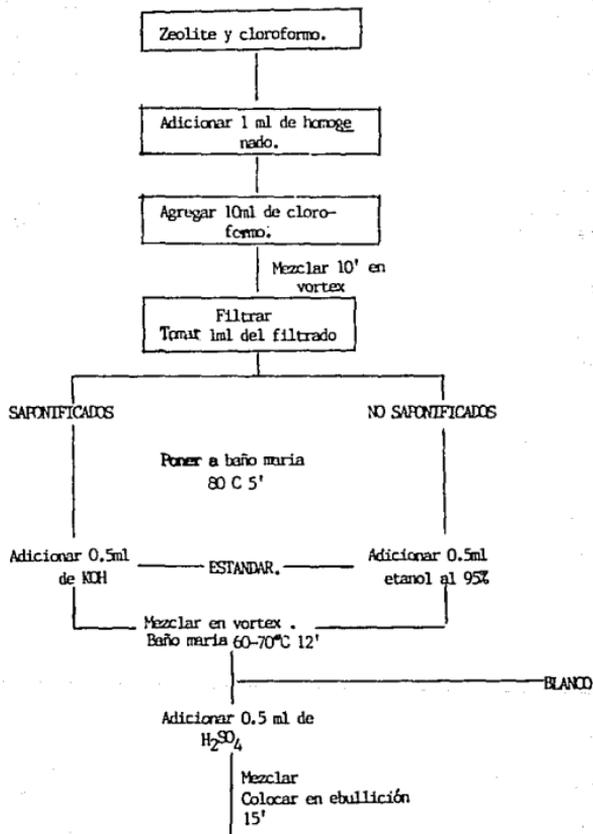


5. Formación de un complejo colorido de formaldehído y ácido cromotrópico (26).



Ac. cromotrópico

## DIAGRAMA DE FLUJO.



Enfriar al  
chorro de agua

Agregar 0.1ml de  
 $\text{NaIO}_4$

Dejar reposar 10'  
Adicionar 0.1ml de  
arsenito de sodio.

+ Aluminio

Mezclar y esperar  
unos minutos.

Agregar 5ml de ác.  
cromotrópico.

Mezclar y colocar en  
baño a ebullición 30'

Enfriar y leer a  
570m.

## 2.2 Determinación de proteínas.

Método de Biuret modificado (27).

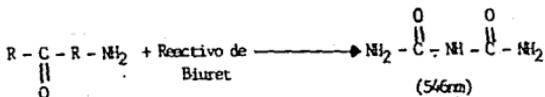
## 1. Problema.

- Tomar 10  $\mu$ l de homogenado.
- Adicionar 75  $\mu$ l de agua desionizada.
- Adicionar 15  $\mu$ l de ácido tricloroacético (con objeto de eliminar la interferencia de la turbidez).

Resuspender con 100  $\mu$ l de agua desionizada y efectuar lo que a continuación se indica:

	Problema	Estandar	Blanco
Problema	100 $\mu$ l	—	—
Agua desionizada	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Estandar	—	100 $\mu$ l	—
Reactivo de Biuret.	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Mezclar, dejar reposar 30'. Adicionar KCN para corregir turbidez y leer a 546nm.			

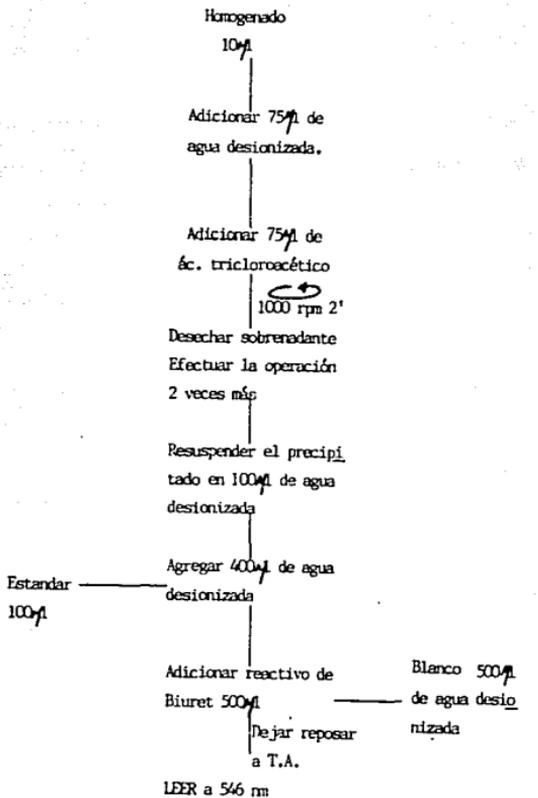
## Reacción (26).



**Fundamento.**

Las proteínas son concentradas por precipitación con ácido tricloroacético y con el reactivo de biuret (alcalino  $\text{Cu}^{++}$ ), forman un complejo colorido con los enlaces peptídicos de las proteínas y se lee a 540nm.

## DIAGRAMA DE FLUJO.



T.A. Temperatura  
ambiente

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

##### Resultados.

De los resultados obtenidos en el laboratorio se observa que: en el hígado de las ratas del grupo 2, a las cuales se administró etanol se registran valores elevados de triacilglicéridos esto coincide con los datos clásicos descritos en la literatura, a partir de la primera hora el aumento es de 2.04mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup>, a las 2 hr de 2.52mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup>, a las 4 hr la concentración fué de 2.83mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup>. Aparece una tendencia a disminuir en los siguientes tiempos estudiados de 6 y 8 hr en los cuales se registran valores de 2.0mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup> y 2.25mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup> respectivamente.

En el grupo de ratas control, no se detectan cambios significativos en la concentración de triacilglicéridos, únicamente se administró glucosa a este grupo. A las 4 hr existe el máximo valor de 1.98mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup> tendiendo posteriormente a disminuir, a las 8 hr la concentración de triacilglicéridos es de 1.29mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup>.

En el hígado de la rata a la que se administró piroxicam, grupo 4, es en el que se verifica la actividad del fármaco, los niveles de triacilglicéridos no sufren cambios apreciables en todos los tiempos de experimentación aunque presenta un valor ligeramente elevado a las 4 hr, la concentración es de 1.62mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup> y disminuye en los subsiguientes tiempos, esto es indicativo de que el fármaco por sí mismo no ocasiona una depleción de triacilglicéridos hepáticos en los animales que no fueron tratados con etanol.

Las ratas del grupo 3 fueron tratadas con etanol más piroxicam, desde el primer tiempo después de la administración simultánea de las sustancias, se obtienen valores bajos en la concentración de triacilglicéridos en comparación con los valores registrados en el grupo tratado solamente con etanol, a la hora es de 1.51mg de TAG X mg de prot. y a las 4 hr de 2.01mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup>, detectándose el máximo

control del acúmulo de triacilglicéridos a las 8 hr en donde se tiene de concentración 1.49mg de TAG X mg de prot.<sup>-1</sup> con una  $P < 0.01$

### Discusión.

Durante las fases iniciales de absorción del etanol en el tracto gastrointestinal, la reoxidación de NADH en el citosol de la célula hepática es suficiente para la conversión del etanol en acetaldehído, hasta que la poza de  $\text{NAD}^+$  disminuye progresivamente y se forma cada vez más NADH, por lo tanto se alcanza un nuevo equilibrio en un estado cada vez más reducido. Ante una ingesta alcohólica la oxidación inicial del etanol a acetaldehído se realiza por la deshidrogenasa alcohólica principalmente, esta reacción se lleva a cabo en el citosol.

Debido al exceso en el consumo agudo de etanol se producen alteraciones bioquímicas, algunas corresponden a acciones propias de la molécula de etanol y otras aparecen como consecuencia de la oxidación de éste; unas moléculas se gastan, como lo son el  $\text{NAD}^+$  y el NADH y otras se producen en exceso: el aldehído, el  $\text{NADP}^+$ , el NADH y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A medida que se oxida el etanol la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  aumenta, lo que no sólo bloquea la oxidación del etanol sino que afecta a todo el metabolismo. Así, las diferentes deshidrogenasas ubicadas en el citosol del hepatocito, comparten pozas de  $\text{NAD}^+$  y NADH y por la ley de acción de masas la escasez del  $\text{NAD}^+$  y el exceso de NADH, se refleja en la mayor producción de los metabolitos reducidos, en comparación con los oxidados. Por ejemplo en el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el aumento en la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , promueve la síntesis de gliceraldehído-3-fosfato a costa de 1,3-difosfoglicerato, lo que ocasiona la inhibición de la glucólisis hepática, esto conduce a un descenso en la producción de ATP y un aumento de ADP, lo que estimula la respiración mitocondrial y con ello se activa la reoxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$  para abatir el exceso de NADH y agilizar el metabolismo del etanol. Lo anterior sólo se lleva a cabo si las lanzaderas de la introducción de equivalentes reductores a la mitocondria, operan activamente ya que es bien conocido el hecho de que el NADH citosólico no puede penetrar al interior de la mitocondria del hepa

tocito (16).

En la vía glucolítica la conversión de la glucosa a piruvato esta catalizada por 10 enzimas que actúan secuencialmente y tiene lugar en dos fases, para fines del presente trabajo es importante el estudio de la segunda fase, dado que en ésta interviene la coenzima que se produce en exceso por la oxidación de etanol, el NADH.

El 3-fosfogliceraldehído es oxidado por el  $\text{NAD}^+$ , captura un fosfato inorgánico y forma el ácido 1,3-difosfoglicérico, éste último cede un grupo fosfato para producir ATP y el ácido 3-fosfoglicérico, que se isomeriza a ácido 2-fosfoglicérico, éste se deshidrata, en la reacción que cataliza la enolasa, formando el fosfoenol piruvato, finalmente el fosfoenol piruvato cede su grupo fosfato al ADP, formando ATP y ácido pirúvico. Fig. 11 (16).

Cuando el aporte de oxígeno es pequeño, la reoxidación del NADH, formado a partir de  $\text{NAD}^+$  durante la glucólisis es alterada. En estas circunstancias, el NADH es reoxidado al acoplarse a la reducción del piruvato en lactato y el  $\text{NAD}^+$  así formado se utiliza para permitir que ulteriormente prosiga la glucólisis:



El equilibrio global de la reacción se halla desplazado hacia la derecha, sin embargo, puesto que el piruvato es el principal precursor del ciclo de Krebs, la reacción es desplazada hacia la izquierda. Por la oxidación del etanol, como se mencionó anteriormente, la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  esta aumentada, por ésto se incrementa la formación de lactato ya que el NADH es reoxidado a  $\text{NAD}^+$ , esto origina que disminuyan las reacciones de oxidación del ciclo de Krebs, debido a la falta del precursor, además se inhibe la gluconeogénesis y el lactato difunde fuera del hepatocito, propiciando una acidosis. Otra alteración que produce el incremento en la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  es la formación de más glicerofosfato que dihidroxicetona, con ello el metabolismo se desplaza hacia la síntesis de triacilglicéridos hepáticos.

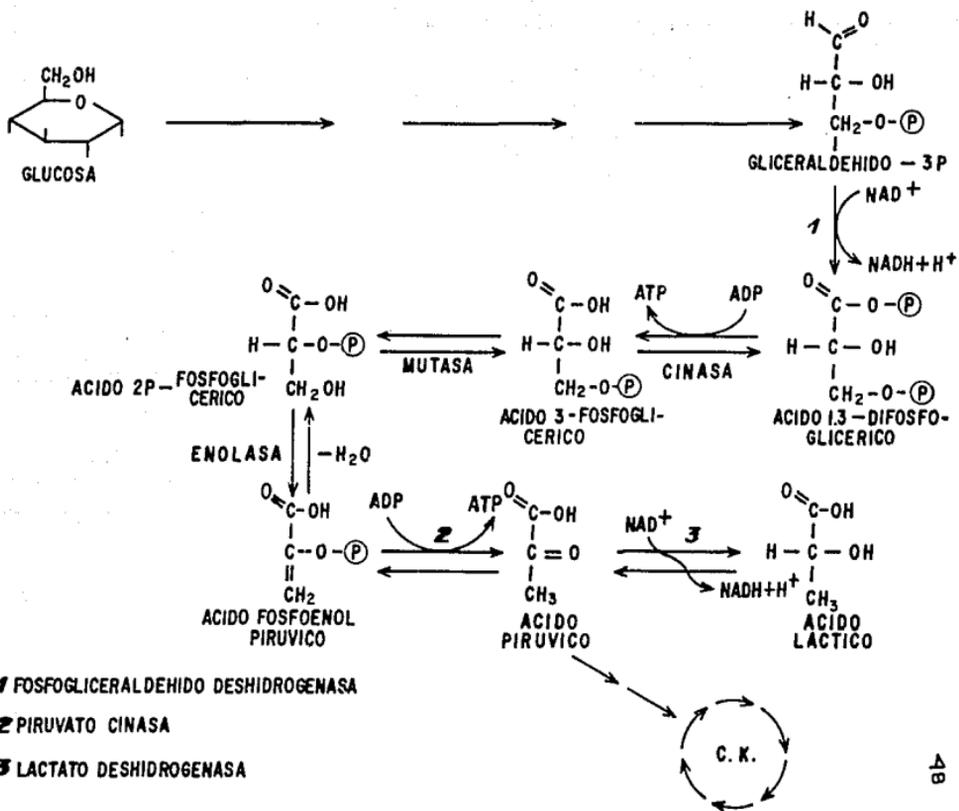


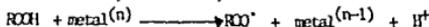
FIG. 11 VIA GLUCOLITICA.

Videla (28) mencionó que una ingesta aguda de etanol produce cambios metabólicos; los mecanismos responsables de éstos no son bien conocidos, sin embargo existen evidencias que han demostrado que la lipoperoxidación puede estar relacionada con los efectos tóxicos que el consumo agudo de etanol causa en el hígado.

La lipoperoxidación es una reacción en cadena con efectos devastadores. Los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte constitutiva de la membrana fosfolípidos, glicolípidos, glicéridos, esteroides y las proteínas transmembranales, son susceptibles al daño por un exceso de radicales libres. La lipoperoxidación de ácidos grasos insaturados y la oxidación de proteínas estructurales determinan cambios en la permeabilidad de la membrana con la consecuente pérdida de las funciones.

El proceso continuo puede ilustrarse de la siguiente manera:

1. Iniciación.- Producción de  $R^{\bullet}$  a partir de un precursor.



2. Propagación.



3. Terminación.



La lipoperoxidación es una reacción en cadena que produce un suministro de radicales libres, continuo que inicia la peroxidación posterior.

Algunos estudios realizados (28), sobre el papel que juega la lipoperoxidación en el daño al hígado, sugieren que éste puede ser el mecanismo mediante el cual el hígado sea dañado. La generación de radicales libres durante la oxidación del eta-

nol y su propagación en las células puede ser la base para utilizar atrapadores de radicales libres con objeto de prevenir algunos de los daños producidos por el etanol.

ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES (AINEs). Para explicar el mecanismo de acción de los AINEs se revisó lo publicado por Hiller y Willson, Sagone y Weissmann. Algunos autores citan que las propiedades antiinflamatorias de estas drogas están muy relacionadas con la capacidad que tienen para alterar la liberación de radicales libres hidróxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), de las células fagocíticas, con respecto a estos recientes estudios de Hiller y Willson apoyan este concepto, quienes estudiaron la capacidad de reacción del radical libre hidróxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) con varios AINEs (20), por medio de una radiólisis en agua y confirmaron que el radical hidróxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) reacciona rápidamente con estas drogas. En experimentos preliminares se estableció que el ácido salicílico y el ácido acetil salicílico son descarboxilados por radicales libres generados por el sistema enzimático xantín-xantín-oxidasa.

Sagone (20), menciona que la forma más adecuada para explicar el mecanismo de acción de los AINEs, se relaciona con la capacidad de éstos para reaccionar directamente con los radicales hidróxilo, más que con la capacidad de los AINEs para inhibir la actividad de la ciclooxigenasa y con eso, la subsecuente liberación de radicales a partir de las prostaglandinas  $\text{G}_2$ .

En esta tesis se entoca el estudio a las propiedades de un AINE, el piroxicam. Es un agente antiinflamatorio de estructura nueva, químicamente diferente de los derivados del ácido carboxílico como la indometacina, el ibuprofeno y el naproxén. No ejerce su actividad por estimulación suprarrenal, es un potente inhibidor de la prostaglandina biosíntesis y carece de efectos farmacológicos sobre los sistemas cardiovascular y nervioso central.

El piroxicam se distingue además de los otros AINEs, por una serie de rasgos farmacocinéticos. Su vida media plasmática es larga (45hr en el hombre), por lo que la

administración de una sola dosis diaria (10-40 mg), permite mantener durante todo el día concentraciones terapéuticas.

Weissmann (29), realizó estudios sobre el efecto de algunos ADNEs en neutrófilos estimulados con N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), Conavalina A (Con A), etc. tanto in vivo como in vitro. Los efectos de estas drogas fueron comparados con dos inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico: el ácido eicosatrienoico (ETI) y el ácido eicosatetraenoico (ETIA).

Después de una revisión de la literatura encontré que para explicar el mecanismo de formación de hígado graso existen numerosas teorías, que incluyen además de alteraciones fisiológicas y bioquímicas, trastornos en el metabolismo de las lipoproteínas y uno de los siguientes casos o en combinación algunos de ellos, puede originar la formación de hígado graso.

- Un incremento en el flujo de ácidos grasos debido a:

Una mayor movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo como consecuencia de una ingestión elevada de éstos en la dieta.

Un incremento en la síntesis de los mismos.

Una disminución en la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias.

Un incremento en la esterificación de ácidos grasos en las mitocondrias.

- Una disminución en la secreción de lipoproteínas.

- El consumo agudo de etanol. En la oxidación del etanol se produce el radical etóxilo.

De los resultados obtenidos y que se representan en las figuras 12 y 13 se considera que el mecanismo que nos permitiría explicar el efecto protector del piroxicam es, debido a su capacidad para actuar como atrapador de radicales libres de oxígeno y nos basamos en estudios efectuados por Kaplan (29), quien señala que en neutrófilos estimulados con FMLP, Con A, etc., el ácido acetilsalicílico, el piroxicam,

Contenido de triacilglicéridos hepáticos en función del tiempo después de una carga aguda de etanol.

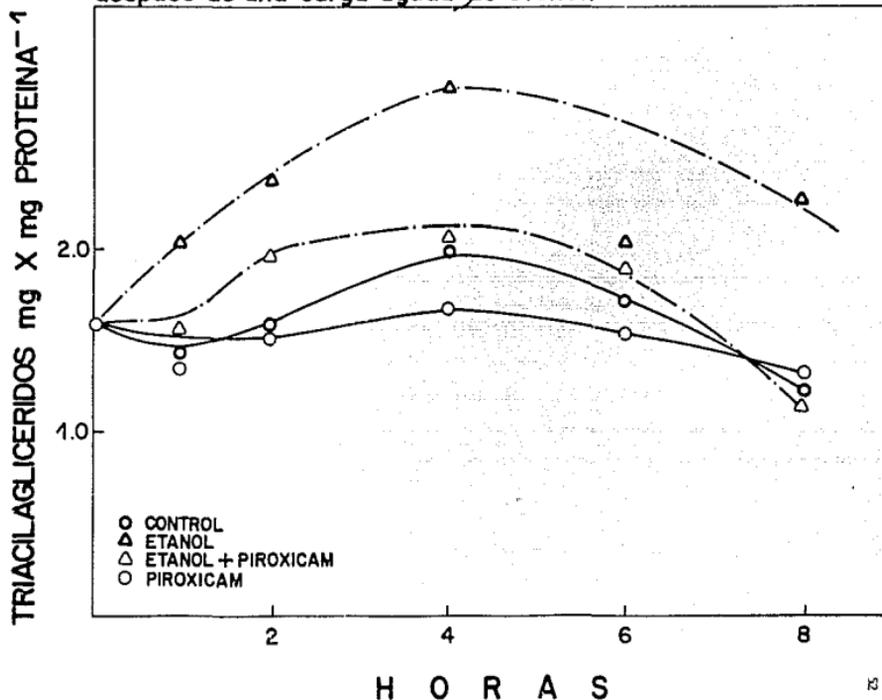


FIG. 12 Efecto del piroxicam en el control de acumulo de triacilglicéridos como respuesta a una carga aguda de etanol. Se emplearon ratos macho cepa Wistar, con 14 días de ayuno, se les administraron las siguientes sustancias, por vía oral: R<sub>1</sub> control (grupo), R<sub>2</sub> problema etanol 5g/kg de peso, R<sub>3</sub> etanol 5g/kg de peso más piroxicam 10mg/kg de peso, R<sub>4</sub> piroxicam 10mg/kg de peso. Transcurrido el tiempo de exposición requerido, se extrajo el órgano blanco, el hígado, y se determinaron por un método colorimétrico los triacilglicéridos presentes. Los únicos valores registrados en los cuatro casos fue a las 4h después de la administración de las sustancias. R<sub>1</sub> 1.09mg de TAG X Prot<sup>-1</sup>, R<sub>2</sub> 2.32mg de TAG X Prot<sup>-1</sup>, R<sub>3</sub> 2.01mg de TAG X Prot<sup>-1</sup> y R<sub>4</sub> 1.62mg de TAG X Prot<sup>-1</sup>. Para los tiempos de 0h y 8hr después de la administración, disminuyen las concentraciones de TAG.

el E1YA y el E1T inhiben la agregación, degranulación y la generación de aniones superóxido  $O_2^-$  como respuesta al FMLP.

El piroxicam solamente inhibe la generación de aniones superóxido  $O_2^-$  en respuesta al acetato miristato de formol (PMA) y a la Con A. Los neutrófilos que fueron expuestos a dosis terapéuticas de ibuprofen, indometacina o piroxicam mostraron perfiles de inhibición como respuesta al FMLP similares a los observados con estos agentes *in vitro*.

La teoría que se considera adecuada para explicar la formación de hígado graso es la relacionada con la generación de radicales libres durante la oxidación del etanol. Estudios efectuados por Videla (28), sugieren que la estimulación de los procesos de lipoperoxidación causados por la ingestión de alcohol se relacionan con la formación de radicales libres de oxígeno durante la oxidación de etanol en el hígado. La membrana plasmática es un sitio crítico para las reacciones de los radicales libres; los radicales generados extracelularmente inician reacciones tóxicas en la membrana con los ácidos grasos insaturados presentes en éstas, lípidos, glicolípidos, etc., y con las proteínas transmembranales son susceptibles de sufrir daños por los radicales producidos.

El piroxicam es un atrapador de radicales libres de oxígeno, Segone (20) en estudios que efectuó con AINEs demostró que atrapan radicales libres, en el caso de sus experimentos radicales hidróxilo. Por su parte Weissmann (29), experimentó con neutrófilos humanos y encontró que el piroxicam inhibe la formación de aniones superóxido  $O_2^-$  de neutrófilos estimulados.

La propiedad de atrapador de radicales libres que se atribuye al piroxicam probablemente es el mecanismo por el cual éste protege al hígado del acúmulo de grasas orgánicas por el consumo de etanol.

Dados los resultados obtenidos en el laboratorio consideramos que sería importante realizar estudios con otros AINEs, para determinar si tienen un efecto protector en el hígado.

# ANALISIS ESTADISTICO

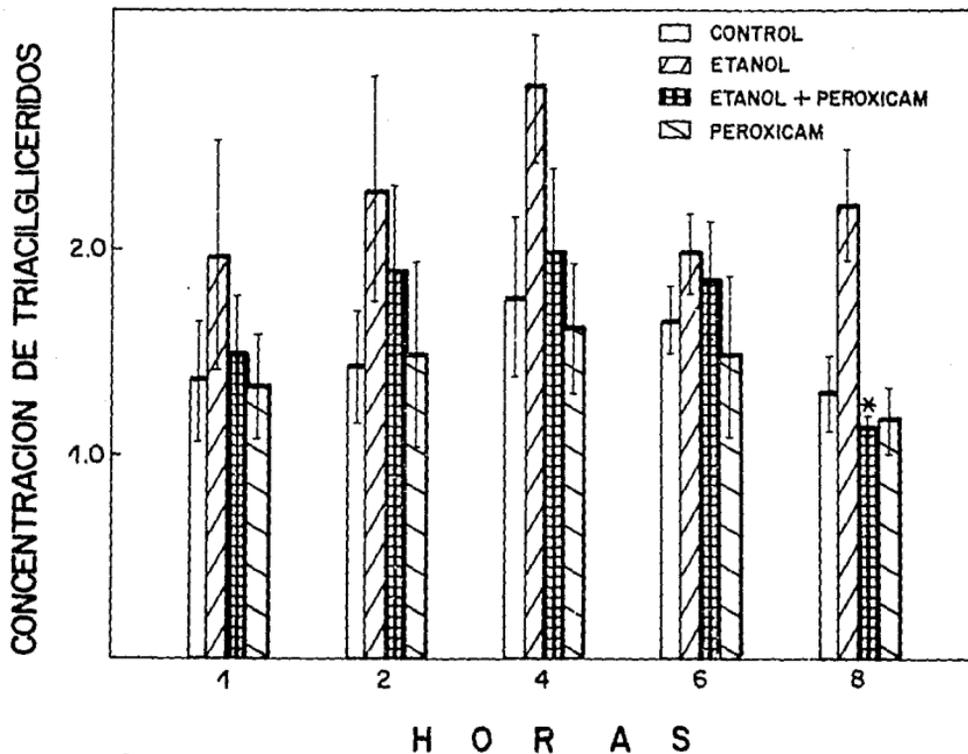


FIG. 13 Estudio estadístico del efecto del piroxicam sobre triacilglicéridos formados como respuesta a carga aguda de etanol. \* $P < 0,01$

## V. CONCLUSIONES.

1. El piroxicam controla la acumulación de grasa en el hígado producida por una ingestión aguda de etanol.
2. La formación de radicales libres durante la oxidación del etanol es la teoría por la que nos inclinamos para explicar la esteatosis hepática.
3. En relación a la hipótesis planteada sobre el papel de los AINEs en el control del daño hepático es posible, en base a los resultados obtenidos concluir que, además del control ejercido por el AINE, este sucede vía la disminución de la poza de radicales libres.
4. El uso terapéutico del piroxicam ofrece un nuevo enfoque en el tratamiento para el control del hígado graso causado por el consumo agudo de etanol, en las fases iniciales, y con ello se evita que éste evolucione a las formas irreversibles como lo son la cirrosis y la fibrosis.

## VI . BIBLIOGRAFIA.

1. Programa contra el alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas. En: Mensaje Bioquímico, Yolanda Saldaña, UNAM, México 1987, PP. 144-145, Vol.X
2. Consejo Nacional Alcohólico: "Programa contra el alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas. Acciones específicas". Secretaria de Salud, México 1987, PP. 40,121,159.
3. Kaplan Pesce. Química Clínica, Medica Panamericana, Argentina 1986, 8a.Ed., PP. 490,492-498,646-647.
4. Dr. Weston D. Warder. Anatomía Humana, Interamericana, México 1981, 3a.Ed., PP.446.
5. Montgomery-Conway. Biochemistry, Mosby 1983, fourth edition, PP. 409-422.
6. Bruce A. Freeman. P.H.D. and James D. Crapo. Biology of disease. Free radicals and tissue injury, Laboratory investigation, USA 1982, Vol.47, No.5, PP.412-429.
7. Fatty Liver. Biochemical and clinical aspects. In: Disease of the liver, Leon Schiff-Eugene R. Schiff, Lippincott company, USA 1987, sixth edition, PP. 949-978.
8. Lieber Cs. Et Al: Effect of ethanol on plasma free fatty acids in man, J. Lab. Med. 1962, 59:896.
9. Schapiro Kh Et Al: Effect of prolonged ethanol ingestion on the transport and metabolism of in man, N. Eng. J. Med. 1968, 272:610
10. Mezey E. Metabolic effects of ethanol, Fed. Proc. 1985, 44:134.
11. Dianzani Mu: Biochemical aspects of fatty liver. In Salater T.F. (ED). Biochemical mechanisms of liver injury, Academic Press, New York 1978, PP. 45-96
12. Rebusas G, Isselbacher JJ: Studies and pathogenesis of ethanol induced fatty liver: I. Synthesis and oxidation of fatty acids by liver. J. Clin. Invest. 1961, 40:1355.

13. Hiltzman J.L. The effects of several week of ethanol consumption on ethanol kinetics in normal man and woman, *Clin. Pharmacol.*, 1985, PP. 38, 187.
14. Martha Zentella de Piña, *Metabolismo del etanol*, UNAM, México 1987, PP. 144-173.
15. Teschke Ry Gellert. Hepatic microsomal ethanol oxidations system (Meos): Metabolic aspects and clinical implications, *Alcoholism Clinic.* 10:20
16. Roberts K.M. *Bioquímica de Harper, el manual moderno*, México 1988, 11a. Ed. PP. 157-166, 216-219, 232-235.
17. Trevor F. Slater. Free radical mechanism in tissue injury, *Biochem. J.* (1984) 222, PP.1-15.
18. Free radical damage in liver, in: *Free radicals in biology*, Academic Press. Inc, 1980, PP. 49-90, Vol.IV
19. Peter A. Louthorn. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease, *Clin. Proc.*, 1988, 63:390-408
20. Arthur L. Lagone Jr. Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: Evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems, *J. Immunology*, USA 1987, PP. 2177-2183, Vol. 138
21. *Alcoholic hepatitis in: Diseases of the liver*, Leon Schiff and Eugene R. Schiff Lippincott company, USA 1987, sixth edition, PP. 669-685.
22. Alexander N. Glazer. Fluorescence- based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine, *J. Biology*, USA 1988, J.2: 2487-2491.
23. Frederik H. Meyer. *Manual de farmacología clínica, el manual moderno*, 1978, PP. 664-673.
24. Hamor G.H. In *principels of medical chemistry*, Foye W.O. Philadelphia, Lea & Febiger, second edition, 1981, PP.561-590.
25. W.M. Butler. The direct determination of liver tryglicerides, *J. Lipid Resh* 1960, PP. 65-66.

- 26 Lawrence A. Kaplan . Clinical chemistry theory analysis and correlation  
The C.V. mosby company, UA 1984, PP. 1330.
- 27 Kerserv. W. Vaughn in the estimation of serum proteins by the biuret method,  
Biochemical J. 1949, 49: XXII.
- 28 Luis A. Videla. Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation,  
Life sciences, UA 1982, PP. 2395-2407, Vol. 31
- 29 Kaplan B. Howard. Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on  
human neutrophil functions in vitro and in vivo. Biochemical Pharmacology,  
Printed Gran Britain 1984, Vol.33 no.3 PP. 371-378