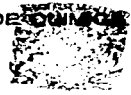


37
31.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENOS PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**EFFECTO DEL ETANOL SOBRE EL
DESARROLLO DEL HEPATOMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS



MEXICO, D. F.,

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

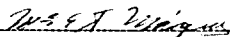
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

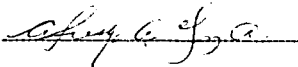
Presidente Prof. Rodríguez Sotres Rogelio.
Vocal Prof. Montiel Aguirre Jesus Fernando.
Secretario Prof. Torres Marquez María Eugenia.
1er. Suplente Prof. Loza Tavera Herminia de Jesus.
2o. Suplente Prof. Pedraza Chaverri Jose.

Esta tesis se realizó en los Departamentos de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología " Ignacio Chávez" y de la Facultad de Medicina UNAM.

Asesor : María Eugenia Torres Márquez.



Sustentante : Alicesha Araceli González Arenas.



**La comprensión humana no es
simple luz sino que recibe infusión
de la voluntad y los afectos;
de donde proceden ciencias que
pueden llamarse " ciencias a discreción".
Por que el hombre cree con más
disposición lo que preferiria
que fuera cierto. En consecuencia
rechaza cosas difíciles por impaciencia
en la investigación; silencia cosas,
por que reducen las esperanzas;
lo más profundo de la naturaleza,
por superstición; la luz de la experiencia,
por arrogancia y orgullo; cosas
no creídas comúnmente, por deferencia
a la opinión del vulgo. Son pues
innumerables los caminos, y a veces
imperceptibles, en que los afectos
colorean e infectan la comprensión.**

*Francis Bacon,
Novum Organon
(1620)*

Dedico esta tesis a:

A mi madre

Dra. Araceli Arenas Dávila

A mi padre

Fis. Luis González Hita

Por enseñarme que el amor verdadero es lo único eficiente para remediar la peor situación y que todo se gana con esfuerzo y dedicación

Por enseñarme que cada instante de vida debe aprovecharse al máximo y que con carácter es como se afrontan los problemas.

A ambos por todo el amor y sacrificio otorgados durante todos estos años y con la promesa de seguir siempre adelante

AGRADECIMIENTOS.

- A mi hermano por estos extraordinarios 18 años compartidos.
- A mis abuelos Romelia, Moisés, Margarita y Luis por todo el gran amor y confianza brindados durante todos estos años.
- A mi tío Oscar por ver en él un ejemplo de amor a la vida.
- A toda mi familia por el enorme cariño y apoyo hacia mi persona
- A Gelita por todos sus cuidados
- A Ricardo Jasso por estos 5 años, haciéndome ver que las victorias y los fracasos siempre van de la mano
- A Diana, Marco, Ricardo Solares y Carol por haber estado conmigo cuando más los necesité, mostrándome que la estabilidad y la felicidad solamente dependen de uno mismo.
- A Mariana, Maira, Miguelito, Frida y Catalán, Gina y Juan Carlos por su maravillosa amistad
- A Margarita Robledo de Dávila, Lupita y Arlet por demostrarme que hasta la peor tragedia es superable
- A Mirrus y Sissi (donde quiera que estes) por tanta fidelidad y cariño.
- Finalmente a toda la gente que pudiera estar involucrada con mi persona y con este trabajo y que indirectamente pudiera estar omitiendo.

- Agradezco a la **Dra. Ma. Eugenia Torres** el apoyo incondicional, la confianza brindada y sus valiosas enseñanzas a lo largo de estos 2 años de trabajo, especialmente por abrirme las puertas a este apasionante y maravilloso mundo de la investigación.

- Agradezco la colaboración de **Ricardo Jasso** en la realización experimental de este trabajo.

- Agradezco a **Alicia Vega**, compañera de laboratorio, por todas sus atenciones.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN1
Metabolismo de las células tumorales1
La participación del metabolismo de los carbohidratos en las células en proliferación y formación de tumores2
GLUCOLISIS4
Alteración del control de la glucólisis en células tumorales como consecuencia de la inducción de isoenzimas con características especiales4
GLUTAMINOLISIS5
Producción de lactato a partir de glutamina por isoenzimas especiales en células tumorales5
Interacción de la glutaminólisis aerobia6
Posible función de la glutaminólisis y de la glucólisis aerobia en la formación de células tumorales7
OXIDACION DE PIRUVATO8
Interacción de la oxidación de piruvato y la glutaminólisis8
TRANSIDROGENACION9
METABOLISMO DEL ETANOL10
HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA12
OBJETIVOS13
METODOLOGIA14
Propagación del hepatoma14
Esquema de inoculación14
Lavado de células y determinación del número celular14
Determinación de la actividad de la ADH14
Obtención del extracto enzimático en el hepatoma15
Obtención del extracto enzimático en hígado15
Preparación de las muestras para determinación de etanol, NAD, NADH y NADPH15
Determinación de etanol15
Determinación de Piruvato16
Determinación de Lactato16
Determinación de NADP17
Determinación de NADPH17
Sempurificación de la enzima ADH17
Gel nativo18

RESULTADOS19
Figura 1. [ETOH] en hígado y en hepatoma al tiempo de sacrificio20
Figura 2. Efecto del etanol sobre la densidad celular del hepatoma21
Figura 3. Actividad de la ADH en hepatoma23
Figura 4. Actividad de la ADH en hígado24
Figura 5. Relación NADH/NAD en hepatoma.25
Figura 6. Relación NADPH/NADP en hepatoma26
Figura 7. Actividad de ADH semipurificada en gel nativo.28
DISCUSIÓN29
PERSPECTIVAS32
CONCLUSIONES33
BIBLIOGRAFÍA34

SECCIÓN DE ABREVIATURAS

- ADH - Alcohol deshidrogenasa
AMPc - Adenosin monofosfato ciclico
BSA - Albumina serica de bovino
ETOH - Etanol
G6P - Glucosa 6 fosfato
G6P-DH - Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GDH - Glutamato deshidrogenasa
GDP - Glucosa 1,6 difosfato
LDH - Lactato Deshidrogenasa
NAD⁺ - Dinucleotido de nicotin adenina
NADH - Dinucleotido de nicotin adenina **reducido**
NADP - Dinucleotido de nicotin adenin fosfato
NADPH - Dinucleotido de nicotin adenin fosfato **reducido**
NBT - Azul de nitrotetrazolio
PMS - Metsulfato de fenazina
SSI - solucion salina isotomica
Tris - Tris [hidroximetil] aminometano.

INTRODUCCIÓN.

El hepatocarcinoma es uno de los cánceres que resultan más comunes en el mundo. Su incidencia (alrededor de un millón de nuevos casos cada año en el mundo) va en aumento y la tasa de mortandad es elevada. La única terapia existente para este padecimiento es la cirugía, la cual no puede ser utilizada en todos los pacientes. El etanol al 95% ha sido utilizado en el tratamiento de quistes renales y hepáticos. La destrucción de pequeños carcinomas hepatocelulares se ha llevado a cabo por medio de inyecciones intratumorales de etanol una vez que se realiza una disección tumoral, ya sea percutánea o intraoperativamente, como terapia de apoyo o terapia preventiva para evitar la aparición de un segundo tumor. Sin embargo, a pesar de que se reportaron casos que lograron sanar aún no se conoce el mecanismo que permite que el etanol tenga este efecto como agente terapéutico por lo que el estudio en esta área representa un extenso campo de investigación (François, 1993).

Otros trabajos realizados han demostrado que el etanol disminuye la proliferación de los hepatocitos tanto en cultivo, como en hígado en regeneración (Diehl y cols, 1988), además de ser utilizado como agente terapéutico en el hepatocarcinoma humano (François, 1993; Shima y cols 1990).

Por lo anterior, este trabajo de investigación se enfocó en estudiar el efecto de las dosis de etanol que llegan a estar presentes en la sangre después de la ingesta, sobre el desarrollo de células de hepatoma que se desarrollan en líquido de ascitis.

Esto se realizó propagando *in vivo* en ratas Wistar, una línea de células cancerosas de hepatoma AS-30D que crece en líquido de ascitis peritoneal. El origen por transformación con carcinógenos químicos y las características de estas células se ha reportado previamente (Smith y cols, 1970).

Los aspectos del metabolismo de estas células carcinogénicas relacionados con este trabajo se describen en el apartado siguiente.

METABOLISMO DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Las células cancerosas han sido reportadas como altamente glucolíticas y se siguen realizando estudios para dilucidar el papel de la glicolisis en la proliferación de células normales y cancerosas. Ha sido bien demostrado que las células cancerosas de hepatoma de lento desarrollo muestran un índice bajo de glicolisis, mientras que las poco diferenciadas de rápido desarrollo presentan un alto índice glucolítico. Además de un

incremento en la capacidad para formar lactato en condiciones de hipoxia, una propiedad característica de las células tumorales, las células tienen una alta capacidad de producir lactato en presencia de oxígeno, es decir glicólisis aerobia (Warburg, 1956, Bixsel y cols, 1972)

La inhibición de la glicólisis por el oxígeno se denomina efecto Pasteur, que es un mecanismo para ajustar el consumo de glucosa en presencia de oxígeno a las necesidades energéticas de la célula. Un mol de glucosa, bajo condiciones anaerobias, produce dos moles netos de ATP, comparado con los 38 moles que se producen en condiciones aerobias, por lo tanto, la respiración es el mecanismo más económico de síntesis de ATP. El concepto de la glicólisis aerobia significa que la producción de piruvato a partir de glucosa excede la capacidad del ciclo de los ácidos tricarbónicos y de la cadena respiratoria, sin embargo, esto implica que las células tumorales utilizan solo el 5 % de la energía disponible de la glucosa, desde el punto de vista de los requerimientos energéticos este es un desperdicio de las fuentes energéticas por las células tumorales. Una elevada glicólisis aerobia también se presenta en células de la mucosa intestinal, médula renal, células retinales y células que han sido estimuladas por la hormona del crecimiento para proliferar. Esto indica que no es un proceso único de las células tumorales como fue propuesto por Warburg para explicar su elevada capacidad de producción de ácido láctico. (Warburg, 1956, Pedersen, 1978)

LA PARTICIPACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN LAS CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN Y FORMACIÓN DE TUMORES.

Como ya se menciona, la alta capacidad de realizar glicólisis aerobia no está presente sólo en células tumorales sino también en células proliferativas normales, células quiescentes de retina, células de médula renal y eritrocitos, la razón de este comportamiento no es el mismo para cada tipo de célula (Warburg, 1956, Rogers y cols, 1980)

En todas las células proliferativas, el lactato no es generado solo por la glicólisis, sino que también una gran cantidad es producido a partir de la glutamina (Reitzer, y cols, 1980, McKeegan, 1982, Linder-Horowitz, M. y cols, 1969, Zuelke y cols, 1976)

La elevada formación de lactato en células proliferativas normales es causado por un incremento en la glicólisis y o glutaminólisis y no porque la oxidación de piruvato se vea disminuida. Adicionalmente en células tumorales decrece la oxidación de piruvato, lo que no es debida en su totalidad a una deficiencia de la mitocondria, sino a una

alteración selectiva (Rogers y cols, 1980, Linder-Horowitz, y cols,1969; Zielke y cols, 1976; Krebs, y cols, 1972, Fodge y Rubin, 1975, Hornsby y Gill, 1981, Hornsby, 1982, Nakano y cols,1982.)

En todas las células en proliferación los intermediarios glucolíticos se encuentran elevados y éstos se canalizan hacia la síntesis de DNA, proteínas y otras macromoléculas (Zielke y cols 1976, Hume y cols, 1978, Culvenor, y Weidemann, 1976, Eigenbrodt y Glossmann, 1980, Donnelly y Scheffler, 1976) Estos altos niveles de intermediarios son causados por cambios en las actividades y afinidades de las enzimas glicolíticas y glutaminolíticas por sus substratos, los cambios en estas enzimas en células proliferativas normales son reversibles y son consecuencia por ejemplo de una fosforilación, mientras que en células tumorales estos cambios son de carácter irreversible, causados por inducción de isoenzimas que exhiben a *priori* características cinéticas diferentes (Warburg, 1956, Linder-Horowitz y cols, 1969, Aithal y cols, 1980, Presek y cols, 1980, Fister y cols, 1982, Sauer y cols, 1980, Mandel y cols, 1983, Bustamante y Pedersen, 1977, Beitner, y cols, 1979, Eigenbrodt y cols, 1983, VanVeelen y cols, 1987)

Las células tumorales son diferentes a las células proliferativas normales también por su elevada glutaminolisis, su elevada capacidad de síntesis de ácidos nucleicos y su elevada síntesis lipídica, además de una capacidad disminuida en la oxidación de piruvato y acetil-CoA, una baja sensibilidad al oxígeno y un bajo requerimiento hormonal para su crecimiento (Warburg, 1956, Rogers y cols, 1980, Reitzer y cols ,1979, Weber, 1972, 1977, Scott y cols 1979, Siperstein y Fagan, 1964, Sabine,1983, Engeser,1982, Carroll y cols, 1978, Arany y cols, 1981, Kennedy y cols, 1980, Karlberg y cols, 1981, Goetz, 1975).

La inducción tumoral es un proceso de múltiples pasos, con la excepción de las transformaciones inducidas por virus. Estos pasos están presentes en tejidos con ausencia o escasa capacidad de proliferación como el hígado, el cerebro y el músculo. En hepatocitos, esta elevada potencia de proliferación está caracterizada por una alta cantidad de enzimas convertidoras de carbohidratos a ácidos nucleicos y fosfolípidos. Algunas causas que provocan la inmortalización son presumiblemente la reducida oxidación de piruvato y acetil-CoA, baja sensibilidad al oxígeno y un incremento en la velocidad de la glicólisis. La transformación metabólica es debida principalmente al bajo requerimiento hormonal necesario para su crecimiento, al grado de que la malignidad se ha definido por este pobre requerimiento hormonal para el crecimiento, por una elevada glicólisis aeróbica, una alta glutaminolisis y la alta capacidad de síntesis de ácidos nucleicos y lípidos (Hissell y cols, 1972, Reitzer y cols, 1980, Sauer y cols, 1980, Weber, 1972; 1977, Carroll y cols, 1978, Kennedy y cols, 1980, Karlberg y cols, 1981;

Goetz, 1975; Papamatheakis y Marciani, 1979; Hanafusa y cols, 1977; Hunter y Sefton, 1980; Farber, 1984; Schulte-Hermann, 1981; Beatty y Reed, 1980; Lazo y Sols, 1980; Hepp, 1966; Darfler, 1983; Gregory, 1976, 1977; Wenner y Tomei, 1981; Ossoswski y Reich, 1980; Kaplan y Ozzane, 1983; Burk, 1967; Kovacevic y Morris, 1972; Scott, 1979.)

GLICÓLISIS

Alteración del control de la glicólisis en células tumorales como consecuencia de la inducción de isoenzimas con características especiales.

Se ha sugerido que la alta glicólisis aerobia en células tumorales puede ser atribuida principalmente a cambios en las isoenzimas de la hexocinasa en el punto inicial de la vía glucolítica y la piruvato cinasa al final de esta (Eigenbrodt et al. 1981)

Las isoenzimas catalizan la misma reacción pero difieren estructuralmente y, en todos los casos, en la respuesta a sus metabolitos. En el efecto Pasteur o inhibición de la glicólisis por oxígeno se ha considerado que la modulación metabólica de la actividad de la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa puede ser necesaria. Así, una simple explicación del fenómeno de la alta glicólisis aerobia puede basarse en que los mecanismos regulatorios usuales, están selectivamente alterados en estas células, por la inducción de isoenzimas que responden de diferente forma a los metabolitos. Hay algunas observaciones que soportan esta hipótesis

1. Hexocinasa Todos los tipos de células con alta glicólisis aerobia, como las de retina, renales, de médula y las tumorales tienen un tipo especial de hexocinasa mitocondrial (tipo II) la cual no es inhibida por concentraciones de G6P menores de 0.6mM y ésta es regulada por los niveles de G16BP (a diferencia de otras isoenzimas de hexocinasa). Todas las células tumorales que han sido probadas (células de hepatoma H-91, fibroblastos de embrión de pollo transformados con la cadena de Schmidt-Ruppin del virus del sarcoma de Rous, células tumorales en ascitis de Erlich y linfocitos leucémicos) contienen una alta cantidad de esta forma especial de hexocinasa en comparación de las células normales de las cuales se derivan (Bustamante y Pedersen, 1977; Baitner y cols 1979; Singh y cols 1978)

2 - Fosfofructocinasa Aunque esta enzima juega un papel central en la regulación de la glicólisis por el oxígeno, ninguna isoenzima característica es expresada en células con una alta glicólisis aerobia. Debido a que las tres isoenzimas de la fosfofructocinasa tienen características cinéticas similares (inhibición de ATP, activación de la F1-6DP y activación de AMP), todas ellas permiten el mismo índice de glicólisis aerobia (Kahn y cols 1980, Bruni y cols 1983)

3 - Piruvato cinasa Todas las células con una elevada glicólisis aerobia contienen una forma de piruvato cinasa (tipo M2), la cual tiene una baja afinidad por el fosfoenolpiruvato y sufre una fuerte inhibición por la alanina con respecto a otras isoenzimas. Esta isoenzima puede ser fosforilada e inactivada *in vivo* e *in vitro* por cinasas de proteínas independientes de AMPc. Bajo ciertas condiciones de cultivo (con menos de 100 μ M de glucosa o con fructuosa) la isoenzima M2 de la piruvato cinasa puede estar funcionalmente inactiva en células proliferativas o tumorales (Ibsen y cols, 1982; Schering y cols, 1982; Eister y cols, 1983)

GLUTAMINÓLISIS

Producción de lactato a partir de glutamina por isoenzimas especiales en células tumorales.

Bajo condiciones de limitación de carbohidratos toda la producción de lactato es derivada de la glutamina. La conversión de glutamina a lactato es catalizada por siete enzimas, cinco de las cuales pertenecen al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Tres de éstas catalizan reacciones irreversibles bajo condiciones fisiológicas (McKeehan, 1982)

1. La glutaminasa que cataliza la reacción en células proliferativas normales y tumorales es activada fuertemente por fosfato, en contraste con la isoenzima encontrada en células de otros tejidos, con excepción de riñón (Linder y cols, 1969; Regan y cols, 1973; Ardawi y Newsholme, 1982)

2. La enzima mítica que cataliza la reacción en células tumorales y proliferativas normales está localizada intramitocondrialmente y utiliza NAD o NADP, lo cual tiene implicación en la generación de equivalentes reductores necesarios para la síntesis de lípidos. Esta capacidad para usar NAD es diferente a la de otras isoenzimas existentes en

mamíferos Además, la enzima malica dependiente de NAD ejerce efectos de regulación sobre la glutaminólisis. Esta enzima es activada además por metabolitos como succinato, fumarato e isocitrato (McKeehan, 1982).

Interacción de la glutaminólisis y de la glicólisis aerobia

A concentraciones elevadas de glucosa (5 mM) la mayoría de las líneas celulares tumorales metabolizan más mole. de glucosa que de cualquier otra molécula orgánica disponible. Alrededor del 80% de la glucosa es convertida a lactato, mientras que un 10% es oxidada por ciclo de Krebs. A pesar de este alto índice pliocítico en condiciones de 5mM de glucosa, solo el 50% de la energía de las células es producida por glicólisis, 40% proviene de la glutaminólisis y 10% de la oxidación de piruvato y ácidos grasos. Después de la glucosa la glutamina es la principal fuente de energía en células proliferativas normales y células tumorales (Rentzer y cols, 1980; McKeehan, 1982; Linder-Horowitz M y cols 1969; Zielke y cols, 1976). Estudios de células mutantes que presentan distintas lesiones en la cadena respiratoria y por tanto una capacidad glutaminolítica inadecuada, han mostrado que el requerimiento total de energía celular puede satisfacerse solamente duplicando la velocidad glicolítica. Estos mutantes muestran una alta dependencia de glucosa extracelular, de CO_2 , HCO_3^- y de aspartato. Por lo tanto, en células proliferativas normales, la glutaminólisis es indispensable para la producción de energía, pero no para un proceso anabólico como la producción de aspartato (Donnelly y Scheffler, 1976; Zielke y cols 1981).

También la reducción en las concentraciones de glucosa (5 M a 50 μ M) manteniendo una concentración alta y constante de glutamina (5 mM) resulta en el bloqueo total de la formación de piruvato y lactato a partir de glucosa. Todo el lactato formado bajo estas condiciones se deriva de la glutamina y el 90% de este requerimiento energético se satisface por glutaminólisis. Bajo estas condiciones el carbono de los carbohidratos solo se detecta en nucleótidos, aminoácidos y en macromoléculas como RNA, DNA, fosfolípidos, proteínas y carbohidratos complejos. La concentración de glucosa que induce la mitad de la inhibición máxima de la oxidación de la glutamina es igual a la concentración de glucosa necesaria para la mitad de la máxima producción de lactato aerobio. Esta observación sugiere que la oxidación de la glutamina es principalmente regulada por la producción de energía. Esta regulación recíproca de la glicólisis y glutaminólisis ha sido encontrada continuamente en sistemas *in vitro* de células animales y no ha sido encontrada ninguna excepción que dependa del tiempo de

cultivo, del estado de proliferación o de la transformación (Sumbilla y cols, 1981; Renner y cols, 1972)

Lo anterior sugiere que si se suple una fuente de carbono, por ejemplo etanol, cuyo metabolismo este restringido a proporcionar energía, la glucosa presente podría solo ser utilizada con fines biosintéticos, dentro de la vía de las pentosas para la síntesis de azúcares precursores de ácidos nucleicos o de equivalentes reductores para la síntesis de lípidos. Incluso para la producción de acetil-CoA en un exceso tal que permita la síntesis de ácidos grasos.

Posible función de la glutaminólisis y de la glicólisis aerobia en la formación de células tumorales.

La limitación en la glucosa extracelular o su substitución con otras hexosas resulta en una marcada reducción en la formación de lactato sin un decaimiento proporcional en la velocidad de proliferación. Estos y otros estudios no concuerdan en la hipótesis de que para la proliferación celular se necesita un alto flujo de carbono en la transformación de glucosa a lactato. Sin embargo, la formación de lactato a partir de glucosa se ve fuertemente elevada después de la estimulación proliferativa de células en reposo y, además, la mayoría de las líneas de células tumorales muestran una buena correlación entre la glicólisis aerobia y la malignidad del tumor. Si bien, el alto flujo a través de la glicólisis no aparece como el único prerrequisito para la proliferación celular (Fodge y Rubin, 1975; Renner y cols, 1979; Renner y cols, 1972)

Se ha reportado que la estimulación de células tumorales con suero fetal de bovino aumenta la producción de lactato a partir de glutamina, además de que existe una correlación de las actividades de la glutaminasa y la enzima malica dependiente de NAD con la velocidad y el grado de crecimiento tumoral. La correlación entre la actividad de las glutaminasas mitocondriales y la malignidad de los hepatomas mediada por la respiración dependiente de glutamina en mitocondrias aisladas de tumor sugieren que la glutamina puede ser un importante combustible para la respiración de células tumorales (Linder y cols, 1969; Sauer y cols, 1980)

Se ha señalado que un factor en común entre las células proliferativas normales y las tumorales es que pueden contar con la energía producida por la glicólisis, si es que la glutamina se ve limitada, o bien, utilizar energía producida por glutaminólisis si los carbohidratos son los que están limitados. Sin embargo, existen diferencias importantes entre ambos tipos de células. Las células proliferativas normales aumentan la glicólisis y

la glutaminólisis únicamente cuando se han estimulado con suero fetal de bovino para su crecimiento. Las células tumorales mantienen constitutivamente una alta glicólisis y glutaminólisis. Otra diferencia es que en células proliferativas normales, la estimulación de la actividad de las enzimas y la velocidad de la glicólisis son fuertemente reducidas por altos niveles de oxígeno, mientras que en la glicólisis las células tumorales son insensibles al efecto de altas concentraciones de oxígeno (Fodge y Rubin 1975; Carroll y cols, 1978, Arany y cols, 1981)

OXIDACIÓN DE PIRUVATO

Interacción de la oxidación del piruvato y la glutaminólisis.

En células tumorales, se ha observado que la velocidad de glutaminólisis es inversamente proporcional a la suma de energía proveniente de la glicólisis y de la oxidación del piruvato. Algunas líneas celulares y tumorales usan preferentemente glutamina sobre piruvato, este fenómeno ha conducido a las siguientes hipótesis (Hornsby, 1981, 1982)

1 - Un defecto general en la cadena respiratoria en las células tumorales pudiera bloquear la oxidación del piruvato, sin embargo, no se ha encontrado alguna característica defectuosa en la función mitocondrial de la célula tumoral (Pedersen, 1978, López-Gómez et al, 1993)

2 - Un daño en el sistema de lanzadera de equivalentes reductores y carbonos de carbohidratos desde el citosol hacia la mitocondria. En realidad, se pudo demostrar que la lanzadera del glicerol fosfato estaba ausente en algunas líneas de células tumorales y algunos tipos de células proliferativas normales, pero la capacidad de las lanzaderas de malato-aspartato y malato-citrato pueden ser lo suficientemente grandes para permitir la oxidación del piruvato (Greenhouse y Lehninger, 1976; Lopez-Alarcon y cols, 1979, Eboli y Galeotti, 1981)

3 - La baja velocidad de la oxidación del piruvato puede deberse al hecho de que una isoenzima especial de la piruvato deshidrogenasa exista en las células tumorales. Experimentos recientes indican que, en adición a la oxidación del piruvato, la conversión de acetil-CoA a oxoglutarato ocurre en baja proporción en las células tumorales. Esto quiere decir que los ácidos grasos o el acetooacetato que son convertidos a acetil-CoA sin la reacción de la piruvato deshidrogenasa, pueden ser oxidados lentamente en células proliferativas normales, mientras que en células tumorales no ocurre la oxidación.

Investigaciones sistematicas con células adrenocorticales presentaron una disminución en la oxidación de piruvato y un incremento simultáneo en la respiración con glutamina causado por una inhibición de la piruvato e isocitrato deshidrogenasa (Hornsby y Gill, 1981; Homsby, 1982; Lazo y Sols, 1980; Sumbilla y cols, 1981; Stanist y cols 1983)

TRANSHIDROGENACIÓN

Krebs y Veech (83) señalan que la relación entre los estados redox de NAD y NADP en células de mamíferos puede estar relacionada a los niveles de sustrato de deshidrogenasa dependientes de NAD y NADP interrelacionados por reactivos compartidos. La coordinación de estos sistemas de interrelación entre deshidrogenasas y en particular de transhidrogenasas relacionadas energeticamente han sido materia de controversia. Lo fundamental de este argumento son los estados redox de NAD y NADP mitocondrial *in vivo*.

La mayoría de las reacciones sintéticas de las células de mamífero tienen lugar en el citosol. La localización intramitocondrial de la transhidrogenasas excluye la participación directa de este proceso anabólico en el citosol. Los mecanismos de lanzadera son requeridos para permitir la interacción de las reacciones dependientes de nucleotidos de nicotinamida localizados entre los medios intra y extra mitocondrial (Borst, 1963). En primera instancia el papel de las transhidrogenasas es altamente reconocido en la reacciones intramitocondriales dependientes de NADP. Diversos estudios con mitocondrias aisladas han fundamentado lo anterior en lo que se refiere a las reacciones mitocondriales de monooxigenación y al metabolismo del isocitrato y glutamato.

Estos estudios enfatizan principalmente el papel de la energía ligada a la transhidrogenasa en el abastecimiento de equivalentes reductores a expensas de energía. Otros autores (Mitchell y cols 1966) relacionan a dicha enzima como un componente de un cuarto sitio de acoplamiento en la cadena respiratoria, ya que, cuando la reducción de NAD es catalizada a expensas de NADPH, esta enzima puede conducir a una translocación de iones H^+ (Skulavchev, 1971) y síntesis de ATP (Van de Stadt y cols 1971.) Lo cual sugiere que la generación de NADH en el metabolismo del etanol no tendría una influencia estimuladora directa sobre la síntesis de NADPH y, por lo tanto, en los procesos anabólicos que se llevan a cabo en el citosol de las células tumorales.

METABOLISMO DEL ETANOL.

El etanol ingerido oralmente se absorbe principalmente en el intestino por difusión simple en función del gradiente de concentración y del área disponible para que se realice este evento. Varios factores van a influir sobre la absorción, el más importante es la presencia de alimentos en el estómago, ya que su presencia tiende a diluir al etanol, retrasa el vaciamiento gástrico y pospone la absorción del alcohol hasta el intestino delgado. Altas concentraciones de etanol en el tracto gastrointestinal representan un mayor gradiente de concentración que aceleran la velocidad de ingreso del etanol en el organismo hasta que su concentración entre la sangre y el tracto gastrointestinal se equilibra. En vista de que el etanol es rápidamente metabolizado y distribuido por todo el cuerpo, se logra mantener un cierto gradiente que permite que todo el alcohol sea eventualmente absorbido desde el intestino (Ahmed, 1995).

Una vez que el etanol llega a la sangre, este es distribuido a otros compartimentos del cuerpo a una velocidad proporcional al flujo sanguíneo y de manera semejante al agua corporal. Debido a que el cerebro recibe una gran cantidad del flujo sanguíneo, fuertes concentraciones de etanol llegan rápidamente a este órgano (Ahmed, 1995). Aproximadamente el 90% de la eliminación del etanol ocurre a través del metabolismo hepático. El aire espirado contiene etanol en proporción a la presión de vapor de esta sustancia (43.9 mmHg a 20 °C) y a la temperatura corporal. La relación del alcohol exhalado y del que se encuentra en la sangre es de 1:2100.

La secuencia metabólica se inicia con la transformación del etanol a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa (ADH), y entonces es oxidado a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). El acetato es entonces oxidado a CO_2 y H_2O primordialmente (Ahmed, 1995).

Tanto la ADH como la ALDH son enzimas dependientes de NAD, con un mol de etanol como sustrato se producen un mol de acetato y dos moles de NADH. Entonces, para que pueda continuar la oxidación del etanol, se debe remover el acetaldehído así como reoxidar el NADH. Las mitocondrias del hígado poseen una forma eficiente de ALDH que remueve el acetaldehído. Por lo tanto, gran parte de éste es utilizado con fines energéticos. El NADH es reoxidado a NAD por la conversión de metabolitos reducidos transportados por la mitocondria o por la intervención de NADP^+ y FAD que son cofactores que participan junto a otros dos sistemas enzimáticos, el sistema microsómico oxidante del etanol y la aldehído oxidasa (Ahmed, 1995).

El promedio de la velocidad del metabolismo del etanol por individuos no alcohólicos es de 100mg/Kg de peso hora o 7g hora en una persona de 70 Kg de peso.

Los alcohólicos metabolizan el etanol a mayores velocidades (aprox el doble de la velocidad normal) debido a la inducción que ya presenta la ADH o la oxidasa citocromo P-450. Este último es otro sistema que cataliza el metabolismo del etanol en el hígado aunque en forma secundaria. Este sistema ha sido llamado sistema microsómico oxidante del etanol (MEOS) y convierte el etanol a acetaldehído. Este sistema enzimático, sin embargo es inducido por prolongados periodos de exposición al etanol. Durante la oxidación de etanol por este sistema la relación NADH/NAD no se incrementa (Ahmed, 1995).

Poco se conoce del metabolismo del etanol cuando este ingresa al organismo a nivel intraperitoneal. Este modelo de administración se utilizó, ya que necesitábamos asegurar que el etanol estuviera en contacto con las células de hepatoma que están en la cavidad peritoneal. De tal forma, que algunos de los eventos metabólicos descritos previamente podrían ocurrir en forma distinta, por lo que en esta tesis se determinaron algunos parámetros en este sentido.

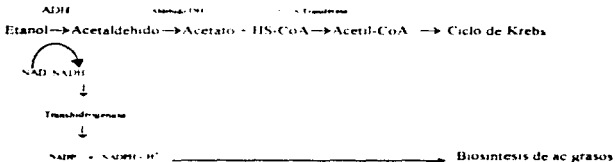
Con los antecedentes expuestos anteriormente nos propusimos los siguientes hipótesis y objetivo general con los correspondientes particulares.

HIPÓTESIS

El etanol es capaz de afectar el desarrollo del hepatoma AS30D, particularmente a nivel metabólico

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si el efecto del etanol sobre las células de hepatoma AS30D ocurre a nivel metabólico y sabiendo de antemano que estas células obtienen su energía en un 50% a partir de la glicólisis, en un 40% a partir de la glutaminólisis y en un 10% a la oxidación del piruvato, el etanol podría competir con todas las anteriores como fuente de energía, por el siguiente mecanismo



De ser así, podría ocasionar un incremento en la disponibilidad de glucosa o glutamina para vías biosintéticas e incrementar la velocidad de desarrollo del hepatoma. O por otro lado, la modificación de equivalentes reductores, debido al incremento en la actividad de la enzima Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NAD, aumentaría la cantidad de NADH disminuyendo la glicólisis. En este sentido una transhidrogenación podría tener las funciones de reoxidar el NADH a expensas de NADP y podría disminuir la actividad de la vía de las pentosas por la presencia de altos niveles de NADPH, lo cual podría verse reflejado en disminución del desarrollo del hepatoma

Una posibilidad alterna es que el etanol estuviera funcionando como un elemento tóxico, capaz de producir deshidratación en las células de hepatoma que estarían en contacto más directo con el agente dada la forma como se administró el etanol

OBJETIVO GENERAL

Estudiar si el etanol afectaba el desarrollo del hepatoma AS30D y si esto ocurría a nivel metabólico

OBJETIVOS PARTICULARES

Tras exponer a las ratas inoculadas o no con el hepatoma (según el caso) a las diferentes dosis de etanol (17,86, 310 μ M) inyectado intraperitonealmente,

- medir el efecto sobre la densidad celular del hepatoma.
- medir la actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH) en hepatoma e hígado.
- medir el cambio en los equivalentes reductores (NADH/NAD, NADPH/NADP).
- medir la concentración de etanol en el hepatoma y en el hígado al tiempo de sacrificio de las ratas
- realizar un zimograma de la actividad de la ADH en el hígado y hepatoma.

METODOLOGÍA

PROPAGACION DEL HEPATOMA

El hepatoma se propagó por la inoculación intraperitoneal (ip) de 1.5 ml de liquido de ascitis recién obtenido en ratas Wistar de aproximadamente 250 g. Dejándolo desarrollar durante 7 días, ver Lopez-Gomez y cols (1993)

ESQUEMA DE ADMINISTRACIÓN DE ETANOL

Las ratas fueron inyectadas ip con 17, 86 y 310 μ moles de etanol disueltos en solución salina isotónica (SSI), aprox. 20 μ l, a las 48, 96 y 120 hs, después de haber sido inoculadas con el hepatoma. Las células se colectaron a los 7 días de desarrollo del hepatoma.

LAVADO DE LAS CÉLULAS Y DETERMINACIÓN DEL NÚMERO CELULAR

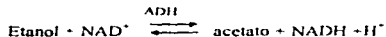
Se tomaron 5ml de liquido de ascitis + 15ml de SSI y se centrifugaron a 271 x g durante 1 min. Se decantó el sobrenadante y se repitió el procedimiento dos veces más.

Al botón se le adicionaron 5 ml de BSA al 10% y 10 ml de SSI y se centrifugó a 271 x g por 1 min. El botón se separó por decantación, se le hizo otro lavado y finalmente se resuspendió en el mismo medio anterior.

El número celular se determinó por conteo en un hemocitometro y la viabilidad se verificó por la exclusión de azul de tripano. Se tomaron 10 μ l de células, 10 μ l de azul tripano y se llevo a 1 m con SSI. Las células viables tienen una apariencia birrefringente y no se tiñen de azul.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADH

La determinación de la actividad se realizó como lo describen Vallee y Hoch (1955) con algunas modificaciones, como se describe a continuación. La reacción que permitió determinar la actividad enzimática fue como sigue:



ADH = Alcohol deshidrogenasa

Se colocó en la celda de reacción buffer de pirofosfatos 20 mM pH 8.8, etanol 0.4 M, BSA al 0.1% y 10 µl del extracto enzimático de hepatoma o de hígado, (entre 1-4 mg/ml). Para iniciar la reacción se agregó NAD 10 mM y la generación de NADH · H⁺ se siguió a 340 nm

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DEL HEPATOMA

En un tubo se pusieron aproximadamente 6.25×10^8 células del hepatoma, se lavaron como se describió anteriormente, se les adicionó triton a una concentración final del 1%, se agitaron en vortex por algunos segundos y se dejaron reposar en hielo durante 15 min. Después, se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min. En el sobrenadante se encontró la actividad enzimática de la ADH y se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry y cols (1951)

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DEL HIGADO

Se tomó un fragmento de hígado, aprox 1 g, al cual se le realizaron tres lavados con SSI, se homogeneizó y se le adicionó triton a una concentración final del 1%. Se agitó en vortex algunos segundos y se dejó reposar en hielo durante 15 min. Después, se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min. y se determinó la actividad enzimática de ADH en el sobrenadante

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ETANOL, NAD, NADH Y NADP

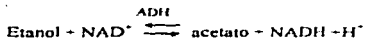
Se tomaron aproximadamente 6.25×10^8 células y se les adicionó ácido perclórico para obtener una concentración final del 5%, se incubaron en hielo por 10 minutos. Se adicionó indicador universal y se neutralizó el pH con una solución 2M de hidróxido de potasio. Se centrifugó la muestra a 12,000 x g durante 5 min para eliminar macromoléculas y la sal formada durante la neutralización.

DETERMINACIÓN DE ETANOL

La [etanol] se midió en el líquido de ascitis o en el hígado de un lote de ratas, después de haber sido inyectadas con 310 µmoles de etanol, correspondiente a 25nmoles/10⁶ células, a las 48, 96 y 144 horas después de haber inoculado al hepatoma.

La determinación se realizó según lo descrito por Hans y Beutler (1985), como se indica a continuación.

La reacción que nos permitió medir la concentración de Etanol es como sigue:

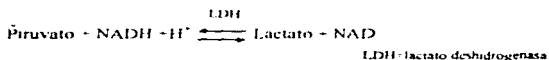


En la cubeta de reacción se adicionó buffer de fosfatos (pH=9) 114 mM, NAD 1.86mM, 40µl de la muestra y para iniciar la reacción ADH 68 U/ml.

DETERMINACIÓN DE PIRUVATO.

La determinación de piruvato se realizó como lo describen Lamprecht y Heinz (1985), según se detalla a continuación

La reacción que permitió medir la concentración de Piruvato fue como sigue.



La reacción se llevó a cabo a una temperatura constante de 25°C. Se adicionaron en la cubeta de reacción 500 µl de muestra neutralizada, NADH 0.23 mM, EDTA 23 µM y se llevó con agua hasta 1 ml. La reacción se inició con LDH 19 U/ml y la cinética de la reacción se siguió a 340nm

DETERMINACIÓN DE LACTATO

Se determinó como lo describen Guttman y Wahlefeld (1974).

La reacción que permitió medir la concentración de NADH + H⁺ fue como sigue:



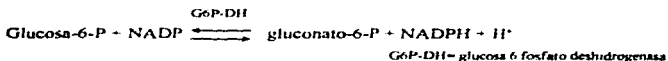
Se adicionaron en la cubeta de reacción NAD 3 mM, 67 µl de la muestra neutralizada y se lleva hasta 1 ml con buffer hidrazina/glicina (0.4 M de hidrazina; 0.5M

de glicina pH 9.0). La reacción se inició con LDH 19 U/ml. La cinética de la reacción se llevó a cabo a 340 nm.

DETERMINACIÓN DE NADP

Se realizó como lo describe Kleinberg (1985)

La reacción que permitió medir la concentración de NADP fue como sigue:

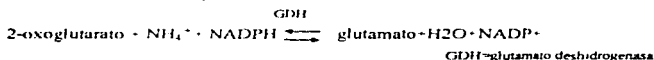


En la cubeta de reacción se adicionó 1 ml de la muestra, MgSO₄ 5mM, Glucosa 6-P 5mM y la reacción se inicio con la adición de 5.6 U/ml de G6P-DH. La cinética de reacción se siguió a 340nm

DETERMINACIÓN DE NADPH

La medición de NADPH se realizó como lo describe Klineberg (1985) Para la preparación de las muestras se tomaron 6.25×10^8 células, se agregó una solución de KOH en etanol 0.3M para romper las células y se neutralizó con HCl 1N. Para precipitar el cromógeno se utilizó una solución saturada de sulfato de amonio. Finalmente se centrifugó para eliminar las macromoléculas a 1,000 x g durante 10 min.

La reacción que permitió medir la cantidad de NADPH fue como sigue:



En la cubeta de reacción se adicionó 1ml de la muestra, 2-oxoglutarato 2.5 mM y NH₄⁺ 5 m M. La reacción se inicia con GDH 1.2 U/ml

SEMPURIFICACION DE LA ENZIMA ADH

La muestra se trató con tritón al 1%, se calentó a 52 °C por 15 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 1500 x g durante 5 min. El sobrenadante se filtró y al filtrado se le añadieron 349 g de NH₄SO₄/l, dejando reposar durante 30 minutos y se centrifugó a 1,500 x g durante 5 min. El sobrenadante se filtró nuevamente y al filtrado se

le añadieron 208 g de NH_4SO_4 , dejando reposar por 30 minutos, se centrifugó por última vez, se decantó y se resuspendió la pastilla en la menor cantidad posible de buffer de fosfatos pH=7 10mM con glicerol al 10%

La muestra se preparó por dilución de 25 μg del extracto obtenido en 10 μL de una solución de sacarosa saturada conteniendo azul de bromocresol

GEL NATIVO

Las soluciones para el gel nativo de acrilamida se prepararon como lo describen Chrambach y Rodbard (1971) El gel se formo con un gradiente del 5 al 7.8 % de acrilamida

Se corrieron las muestras con 25 μg de proteína, obtenidos de la precipitación parcial de la ADH, por carril con buffer de corrida de tris-glicina pH = 8.89 en la cámara superior y tris-HCl pH = 7.47 en la cámara inferior y se aplico una corriente de 15 mA.

Finalmente una parte del gel se revelo con azul de coomassie para determinar bandas de proteína entre las cuales esta la ADH y otra parte del gel se revelo con Buffer tris pH=7.5, alcohol 0.01%, NAD 0.01%, PMSE 0.02 mM y NBT 0.005 % para determinar la posición en que migra la ADH en estos geles

RESULTADOS OBTENIDOS

Cantidad de ETOH

Los modelos utilizados a la fecha para estudiar los efectos del etanol sobre diferentes parametros en las ratas, consideran el ingreso de este agente por via oral. No obstante en el modelo utilizado en esta tesis, lo que interesaba era que el etanol estuviera en contacto con las células del hepatoma a la mayor concentracion que fuera posible. Dado que las celulas crecen en liquido de ascitis en la cavidad peritoneal, la inyeccion de 310µmoles de etanol en este caso se realizo en dicha cavidad, tal como se describio en la seccion de metodos, posteriormente se determino el etanol que estaria presente en el liquido y en el higado de la misma rata al momento en que se sacrificaron los animales.

En la fig. 1 se observa que aun despues de 24 hs. de la ultima inyeccion de etanol habia una concentracion de $0.75 \text{ nmoles de ETOH } 10^6$ de celulas de hepatoma y $1.44 \text{ nmoles de ETOH } 10^6$ de hepatocitos, lo que sugiere que aunque el ETOH pueda ser absorbido por los organos embebidos en el peritoneo, la reabsorcion debe ser lenta.

Densidad celular

El primer objetivo de este trabajo fue determinar si existe efecto del etanol sobre la densidad celular. En la fig. 2 se observa el numero de celulas de hepatoma en el liquido de ascitis, el cual es representado como 100% y que corresponde a $15.25 \pm 0.95 \times 10^4$ células/rata.

Al comparar este valor con el numero de celulas alcanzado en el liquido de ascitis de las ratas expuestas a 17, 86 y 310 µmoles de etanol, se observo una disminucion de 17, 9 y 35 % respectivamente, lo que sugiere que el etanol produce un efecto de deletereo en el desarrollo del hepatoma, que se ve más acentuado cuando se utilizan 310 µmoles de etanol.

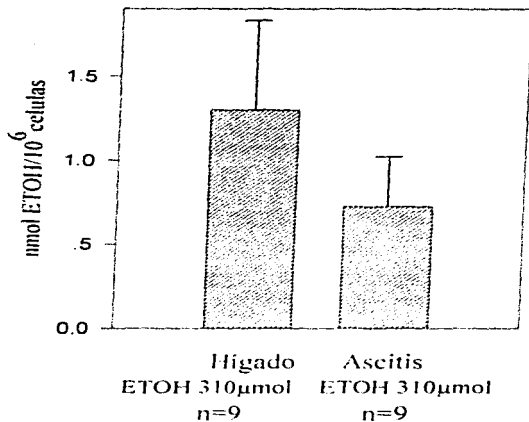


Figura 1. [ETOH] en Higado y en Hepatoma al tiempo de sacrificio. Se administró una dosis de 310 μ moles de ETOH rata cada 48, 96 y 144 h después de inoculado el hepatoma, las ratas se sacrificaron a las 168 h y se cuantificó el ETOH en el líquido de ascitis o en el homogenizado de hígado, por medio de la ADH como se describe en métodos. Para normalizar los valores y hacerlos comparativos entre los dos sistemas, se consideró que 10^6 células se encuentran suspendidas en 40 μ l. de líquido de ascitis y también se hizo la equivalencia de que 1 g de hígado = 120×10^6 células.

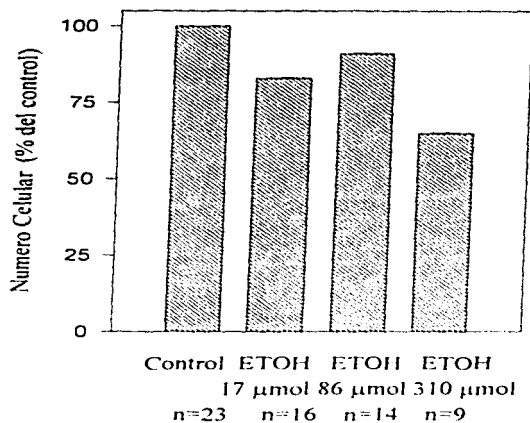


Figura 2. Efecto del etanol sobre la densidad celular del hepatoma. Cada barra representa la $X \pm ES$ con respecto al control el cual fue de $15.25 \pm 0.95 \times 10^9$ células/rata). Los tratamientos fueron de 17, 86 o 310 µmoles de ETOH vía I.P. a las -48, 96 y 144 hs. de haber inoculado el hepatoma. Las ratas se sacrificaron 24 hs. después de la último tratamiento con ETOH, esto es 7 días después de haberse inoculado el hepatoma. Cada rata acumuló entre 50 y 70 ml de líquido de ascitis.

Actividad de la ADH

Ya que el etanol tuvo un efecto negativo sobre la densidad celular del hepatoma, se midió la actividad de la ADH dependiente de NAD, primera enzima en el metabolismo del etanol para saber si tal efecto se debía a un cambio en la inducción de la enzima (Ahmed, 1995) que se reflejara en el aumento de actividad, o bien a que el etanol actuara como agente químico sobre el hepatoma. En la fig 3, se observa que existe un incremento de la actividad de la ADH en las células de hepatoma tratadas con las diferentes dosis de etanol, con respecto al control este incremento fue del 25% para 17 μ moles, 53% para 86 μ moles y 352 % para la dosis de 310 μ moles. Este efecto también ocurre en hígado normal, ver figura 4, pero en menor proporción, del 4% para 17 μ moles del 20 % para 86 μ moles y del 345 % para 310 μ moles. Esto indica que el lapso de 8 días en los que se desarrolla el hepatoma y las concentraciones utilizadas, preferentemente la de 310 μ moles, son suficientes para inducir un incremento en la enzima.

Relaciones NADH/NAD y NADPH/NADP

Debido a que el alcohol es metabolizado por la ADH dependiente de NAD, la relación NADH/NAD puede verse afectada si la capacidad de la célula para reoxidar el nucleótido fuese limitante y de manera indirecta también se vería afectada la relación NADPH/NADP (Goodman y Gilman, 1970), por lo que se determinó [NAD], [NADH], [NADP] y [NADPH].

Las [NADH] y [NAD], obtenidas corresponden a los valores citosólicos de estos metabolitos, ya que se determinaron a partir de las concentraciones de lactato y piruvato.

En la figura 5 se observa que la relación NADH/NAD en el hepatoma se incrementa con respecto al control en 57% para 17 μ moles, 47% para 86 μ moles y 83% para 310 μ moles de ETOH, aunque estas diferencias solo resultan estadísticamente significativas para la dosis máxima de etanol. Este incremento en la relación se debe muy probablemente al aumento en la cantidad de NADH producido por la ADH dependiente de NAD al oxidar el etanol hasta acetato.

El efecto sobre la relación NADPH/NADP se observa en la figura 6, aquí la relación NADPH/NADP está disminuida con respecto al control en 84% para 17 μ moles, 86% para 86 μ moles y 79% para 310 μ moles de ETOH.

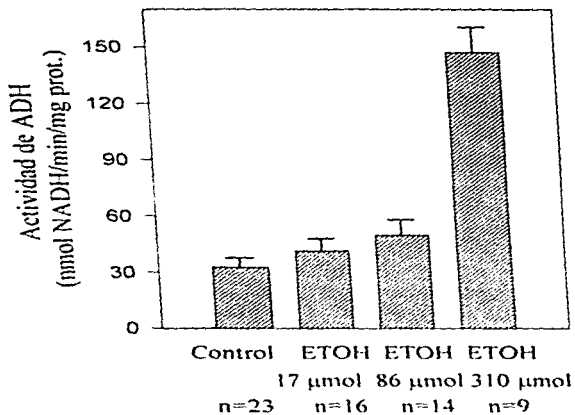


Figura 3. Actividad de la ADH en Hepatoma. Las ratas se sacrificaron a los 8 días de haber inoculado el hepatoma con los diferentes tratamientos con ETOH. 17, 86 y 310 μ moles via I.P. cada 48, 96 y 144 hs. La actividad de la ADH se determinó como se describe en metodos. Cada barra representa la $\bar{X} \pm ES$ de 3 a 8 experimentos realizados por triplicado.

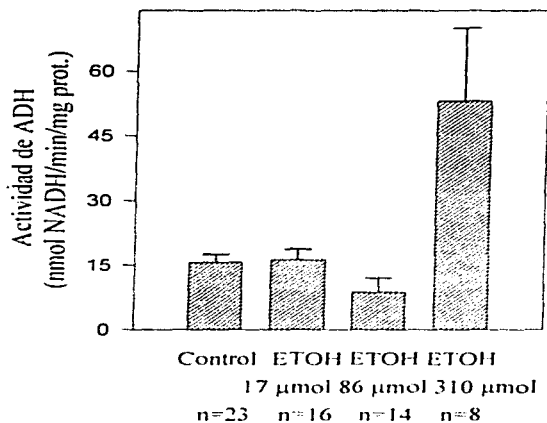


Figura 4. Actividad de la ADH en Hígado. Las ratas se sacrificaron a los 8 días de administrar el ETOH con los diferentes tratamientos 17, 86 y 310 µmoles vía I.P. cada 48, 96 y 144 hs. La actividad de la ADH se determinó como se describe en métodos. Cada barra representa la $\bar{X} \pm ES$ de 3 a 8 experimentos realizados por triplicado.

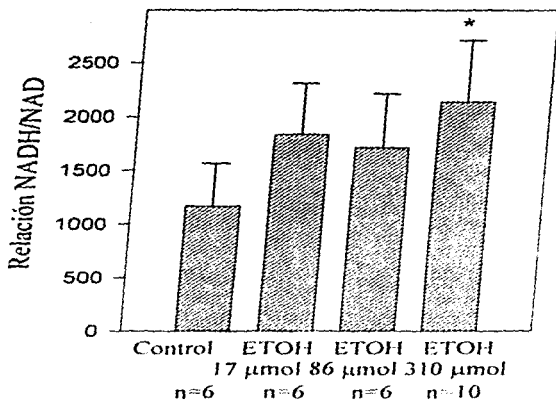


Figura 5. Relación NADH/NAD en Hepatoma Las ratas se sacrificaron a los 8 días de administrar el ETOH con los diferentes tratamientos 17,86 y 310 µmoles via I.P. cada 48, 96 y 144 hs. Se muestra la relación NADH/NAD teniendo como valores absolutos para el control 2.65 ± 0.93 nmoles / 10^6 células de NADH y 0.023 ± 0.009 nmoles / 10^6 células de NAD. Cada barra representa la $\bar{X} \pm ES$ de 3 a 5 experimentos realizados por duplicado.

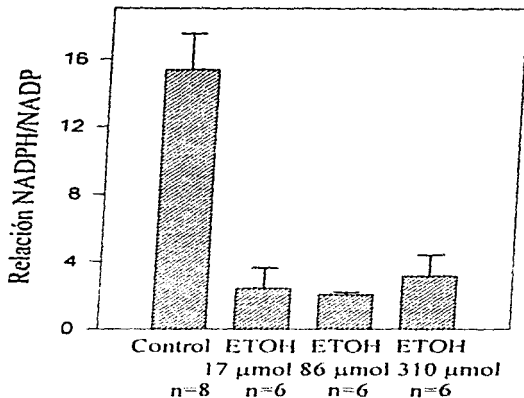


Figura 6. Relación NADPH/NADP en Hepatoma Las ratas se sacrificaron a los 8 días de administrar el ETOH con los diferentes tratamientos. 17,86 y 310 µmoles via I.P. cada 48, 96 y 144 hs. Se muestra la relación NADPH/NADP teniendo como valores absolutos para el control 0.235 ± 0.054 nmoles $\cdot 10^6$ células de NADPH y 0.016 ± 0.006 nmoles $\cdot 10^6$ células de NADP. Cada barra representa la $\bar{X} \pm ES$ de 3 a 5 experimentos realizados por duplicado.

Geles

La ADH existe tanto en hígado normal como en hepatoma y la actividad se incrementa por el tratamiento con etanol tanto en hígado como en hepatoma. Este incremento al menos en hígado normal se da por inducción de la actividad enzimática. Debido a que lo que interesaba era saber si la ADH que metabolizaba al etanol tanto en hígado como en hepatoma era de la misma naturaleza, se realizaron geles de acrilamida en gradiente del 5 al 7.8%, en donde se pudo apreciar (figura 7) que la actividad de la enzima aparece en bandas difusas, pero de migración similar, lo que sugiere se trata de la misma enzima para el hígado normal, para el hepatoma y para el hepatoma tratado con 310 μ moles de etanol.

La banda de actividad corresponde mejor con la banda de menor migración apreciada en una sección del mismo gel teñido con Coomassie

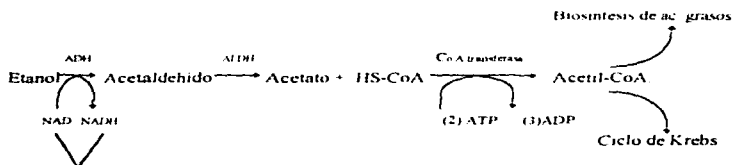


Figura 7. Actividad de ADH semipurificada en gel nativo. Se preparo un gel nativo en gradiente de poliacrilamida del 5 al 8%, la muestra se preparo como se reporto en metodos y se utilizaron 25 μ g de proteina por pozo. En la figura A se muestra la tincion para la actividad y en la figura B el gel tincido con azul de Coomassie, el orden de los carriles es el siguiente: 1) higado normal, 2) hepatoma y 3) hepatoma con tratamiento de 310 μ moles de etanol

DISCUSIÓN.

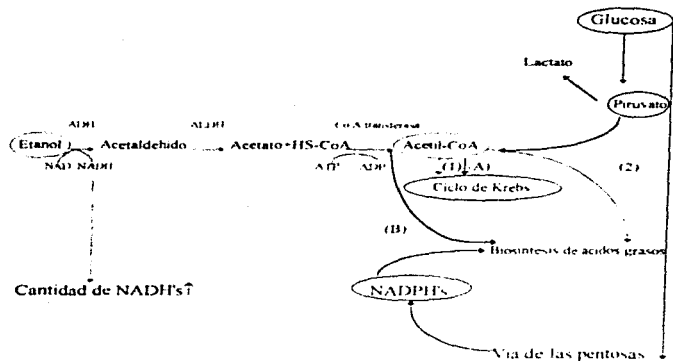
El que se haya detectado etanol en el líquido de ascitis en un 3% del volumen originalmente inyectado, aún después de 24 horas, nos sugiere que estuvo en contacto con las células, durante su difusión a través de los tejidos y los fluidos corporales. Por lo que se estudia el posible efecto de este agente sobre su metabolismo, lo que se discutirá más adelante.

El aumento en la actividad de la enzima ADH (Ahmed, 1995), aparentemente la misma isoforma tanto en hígado normal, como en hepatoma, sugiere que el etanol se incorpora al metabolismo del hepatoma por la siguiente vía:



Provocando un aumento en la relación NADH/NAD.

Los desajustes en las relaciones de equivalentes reductores NADPH/NADP respecto al de NADH/NAD podrían explicarse con el siguiente esquema:



Las flechas verdes indican el metabolismo del etanol y las moradas el de la glucosa y en azul se representa al metabolismo del NADP/NADPH.

El exceso en la producción de NADH's se debe al metabolismo del alcohol por la ADH dependiente de NAD (Bergmeyer, 1985). Al ser metabolizado el EtOH produce acetil-CoA (Lehninger, 1981) que puede ir a (1) ciclo de Krebs o (2) a síntesis de ac. grasos, compitiendo en el primer caso, con la glucosa como fuente de energía, ya que el acetil Co- A producido a partir del piruvato que proviene de la glicólisis, también entra a ciclo de Krebs (A) y a síntesis de ac. grasos (B).

Las posibilidades del acetato producido a partir del etanol para ingresar al ciclo de Krebs podrían ser reducidas, debido a que competiría con el piruvato proveniente de la glicólisis de la glucosa presente en el líquido de ascitis, aprox. 0.2 mM 10^6 células (Rodríguez, 1997). Quiero decir que el acetato si es transportado a la mitocondria sin gasto de energía, al igual que el piruvato, pero una vez en este compartimento requiere del gasto de 2 moléculas de ATP para su activación por la tiorcinasa a acetil CoA, mientras que el piruvato al ser descarboxilado por la piruvato dehidrogenasa, produce un NADH que tiene el potencial para la producción de 3 ATPs, lo que hace que en este punto su uso sea energéticamente desfavorable. Mas adelante cuando la concentración de NADH resulte limitante al flujo glicolítico en conexión con el ciclo de Krebs, por la inhibición de las

deshidrogenasas de este último, el etanol ahora si podría ser utilizado con fines metabólicos, y entonces la glucosa podría ser dirigida a otras vías biosintéticas como la vía de las pentosas, vía favorecida en células proliferantes.

Por otro lado, el acetil Co-A proveniente del metabolismo del etanol podría ser utilizado mayoritariamente para la síntesis de ac grasos, debido a que la producción de acetato proveniente del etanol ocurre principalmente en el citosol, la tioxinasa puede actuar sobre este acetato formando acetil Co-A pero al encontrarse disponible en el citosol estará más accesible a la síntesis de ácidos grasos, que el que pudiera provenir de la mitocondria. Por otro lado, el acetil Co-A producto del metabolismo de la glucosa, requiere ser sintetizado a partir de piruvato por la piruvato deshidrogenasa (la cual es mitocondrial) formando acetil Co-A mitocondrial, el cual para ir a síntesis de ac grasos necesita salir a citosol. Por lo anterior podría sugerirse que el acetil Co-A que más rápidamente llega a la acetil Co-A carboxilasa será el del acetato proveniente del etanol que se encuentre en el citosol.

La administración IP de etanol produce una elevación en la síntesis de ac grasos en el hígado normal (Yu y Cronholm, 1996), por lo que sería probable que el etanol cause el mismo efecto en las células de hepatoma AN30-D, dado que el origen de esta línea celular es hepático. Lo anterior sugeriría que la disminución en los niveles de NADPH's se debe a la utilización de éstos en la síntesis de ácidos grasos.

Como pudo apreciarse en los resultados no se observa un equilibrio de los equivalentes reductores, por lo que aparentemente no existe una transhidrogenación entre NADH's que se encuentran elevados por el metabolismo del etanol y NADPH's que se encuentran disminuidos por el aumento en la síntesis de ácidos grasos.

Por lo anteriormente comentado, no se puede establecer que el efecto del etanol sobre el metabolismo del hepatoma sea la única razón por la cual la densidad celular este disminuida. Otra efecto aditivo al que se podría atribuir este efecto del etanol en la densidad celular, es que pudiera ser tóxico si actuase como agente deshidratante.

PERSPECTIVAS

Se sabe que el etanol es metabolizado por las células tumorales, incorporándose al metabolismo por acción de la ADH dependiente de NAD y causando modificaciones en las relaciones NADH/NAD y NADPH/NADP

Este trabajo podría continuar, para responder diversas preguntas tales como:

- Si el acetyl Co-A del etanol se utiliza tanto en ciclo de Krebs como en la síntesis de ac grasos, lo que podría sugerir que entonces pueden adaptar sus requerimientos energéticos a la fuente de carbono que tengan presente en su entorno.
- Si la cantidad de ac grasos efectivamente aumenta de manera similar al hígado normal, intoxicado agudamente con etanol, o estos se traducen en componentes membranales de nuevas células.
- Si las concentraciones de etanol utilizadas no resultan tóxicas
- Si puede establecerse una terapéutica utilizando diferentes dosis de etanol.
- Si otras células cancerosas proliferativas, reaccionan del mismo modo que las de hepatoma al estar en contacto con etanol.

CONCLUSIONES.

- El etanol aplicado por vía intraperitoneal permanece en el líquido de ascitis a un 14% de su concentración original en este líquido después de 24 h.
- El etanol produce una ligera disminución en el desarrollo del hepatoma.
- Las células de hepatoma responden con un incremento de la ADH que resulta evidente con la dosis de 310 μ moles y que es superior al encontrado en hígado.
- La relación NADH/NAD está aumentada, posiblemente debido al incremento en la actividad de la ADH dependiente de NAD. La relación NADPH/NADP parece disminuida, debido probablemente a que el NADPH se está utilizando para la biosíntesis de ac. grasos.
- Nuestros datos sugieren que la transhidrogenación entre NADH/NAD y NADPH/NADP se encuentra muy disminuida o ausente en las células AS30D expuestas al etanol.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aithal, H. N., Toback, F. F. y Cryst, C. 1980 *Am J Physiol* 238:377.
- Ahmed, E. F. 1995 *Critical Reviews in Toxicology* 25(4):347.
- Angeletti, C. y de Alaniz, M. J. 1996 *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 46 (2):57
- Arany, I., Rady, P., y Kertai, P. B. 1981 *J Cancer*, 43:804
- Ardawi, M. S. y Newsholme, E. A. 1982 *Biochem J*, 208:743
- Beaty, P. W. y Reed, D. J. 1980 *Arch Biochem Biophys*, 204:80
- Beitner, R., Cohen, T. J., Nordenberg, J. y Haberman, S. 1979 *Biochim Biophys. Acta*, 586:266
- Bissel, M. J., Hattie, C., y Rubin, H. J. 1972 *Natl. Cancer Inst* 42:554.
- Borst, P. in *Functionelle und Morphologische Organization der Zelle*, Springer-Verlag, Berlin y New York 1963, pp 137
- Bruni, P., Farnararo, M., Vasta, V. y Alessyro, A. 1983 *FEBS Lett* 159:39
- Burk, D., Woods, M., y Hunter, J. 1967 *J. Natl Cancer Inst* 38:839
- Bustamante, E. y Pedersen, P. I. 1977 *Proc Natl Acad Sci* 74:3735
- Carroll, R. C., Ash, J. F., Vogt, P. K., y Singer, S. J. 1978 *Proc Natl Acad Sci* 75:5015.
- Chrambach, A. y Rodbard, D. 1971 *Science* 172:440
- Culvenor, G. J. y Weidemann, M. 1976 *J Biochem Biophys Acta* 437:354.
- Darfler, F. J. y Insel, P. A. 1983 *J Cell Physiol* 115:31
- Diehl, A. M. y cols. 1988 *Hepatology* 8:237
- Donnelly, M. y Scheffler, I. 1976 *J Cell Physiol* 89:39
- Eboli, M. L. y Galeotti, T. 1981 *Biochim Biophys Acta* 638:75
- Eigenbrodt, E. y Glossmann, H. 1980 *Trend Pharmacol Sci* 1:240.
- Eigenbrodt, E., Fister, P., Rubsamen, H. y Frus, R. 1983 *EMBO J* 2:1565.
- Eigenbrodt, E., Fister, P. y Remacher, M. *Regulation of Carbohydrate Metabolism, Vol II*, Beitner R., Ed USA 1981, 142-179
- Engeser, H. 1982 *Exp Cell Res* 139:396.
- Farber, E. 1984 *Can J Biochem Cell Biol* 62:486.

- Fister, P., Eigenbrodt, E., Presek, P., Reinacher, M. y Schoner, W. 1983 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 409
- Fister, P., Eigenbrodt, E. y Schoner, W. 1982 *FEBS Lett.* 139: 27.
- Fodge, D.W. y Rubin, H. 1975 *J. Cell. Physiol.* 86: 453
- Françoain, J. 1993 *Eur. J. Surg. Oncol.* 19: 561
- Goetz, I. 1975 *In Vitro* 11: 382
- Goodman L. y Gilman A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics. 5ta edición. Ed. Macmillan Publishing. U.S.A. 1970*
- Greenhouse, W. y Lehninger, A. 1976 *Cancer Res.* 36: 1392
- Gregory, S. y Bose, S. 1977 *Exp. Cell Res.* 110: 387
- Gregory, S., Kumari, H., Lakshmi, M. y Bose, S. K. 1976 *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 644.
- Guttman, I. y Wahlefeld, W. L.-D-Lactate en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U.) Vol III, 1era ed., pag. 1464. Ed. VCH, Alemania, 1974
- Guyton *Fisiología Humana*. 5ta ed. Ed. Interamericana México. 1983
- Hanafusa, H. *Comprehensive Virology*, Vol. 10., Plenum Press, New York, 1977: 401.
- Hans y Beutler Otto. Ethanol en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U.) Vol VI, 3era ed., pag. 598. Ed. VCH, Alemania, 1985
- Hepp, G., Prusse, E., Weiss, H. y Wiely, O. 1966 *Biochem. Z.* 344: 87
- Hornsby, P. y Gill, G. 1981 *J. Cell. Physiol.* 109: 11
- Hornsby, P. 1982 *J. Cell. Physiol.* 112: 207
- Hume, A., Radik, J., Ferber, E. y Weidemann, M. 1978 *Biochem. J.* 174: 703
- Hunter, T. y Sefton, B. 1980 *P.N.A.S.* 77: 3009
- Ibsen, K., Orlyo, R., Garratt, K., Hernyez, A.M., Giorlyo, S., y Nugaray, G. 1982 *Cancer Res.* 42: 888
- Kahn, A., Cottreau, D. y Meienhofer, M. 1980 *Biochem. Biophys. Acta.* 611: 114..
- Kaplan, P. y Ozzane, B. 1983 *Cell*, 33: 931
- Karlberg, I., Lindhal-Kriessling, K., Low, H. y Mattsson, A. 1981. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 65: 250
- Kennedy, K.A., Teicher, B.A., Rockwell, S. y Sartorelli, A. 1980 *Biochem. Pharmacol.*

- Klingerberg Martin NADPH en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, HU) Vol VII, 3era ed, pag 261 Ed VCH, Alemania 1985
- Klingerberg Martin NADPH en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, HU) Vol VII, 3era ed, pag 257 Ed VCH, Alemania 1985
- Kovacevic, Zy Morris, H.P. 1972 *Cancer Res* 32:326
- Krebs, H.A. en *Essays in Biochemistry* (Campbell, N y Dickens, F, Eds) Vol VIII, pag 1. Ed Academic Press, New York, 1972
- Krebs HA y R.L. Veech *The Energy Levels Metabolic Control in Mitochondria* Ed. Adriatica USA 1969
- Lamprecht Walther y Heinz Fritz Piruvate en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU) Vol VI, 3era ed., pag 574 Ed VCH, Alemania 1985
- Lazo, P y Sols, A. 1980 *FEBS Lett.* 120: 287
- Lazo, P y Sols, A. 1980 *Biochem J* 190:705
- Lehninger, L. A. *Principles of Biochemistry*, 2a ed Ed Worth USA, 1985
- Linder-Horowitz, M., Knox, W. y Morris, H. 1969 *Cancer Res* 29:195
- Lopez-Alarcon, L., Eboli, M.L., Deliberati, F., Palombini, G. y Galeotti 1979 *Arch Biochem Biophys*, 192: 391
- Lopez-Gomez F., Torres-Marquez M. y Moreno-Sanchez R. 1993 *Int J Biochem* 25: 373
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Ryall, R. 1951 *J Biol Chem* 193: 265.
- McKeehan, W. 1982 *Cell Biol Intern Rep.* 6:635
- Myel, G., Lively, M., Lombardi, D. y Amos, H. 1983 *J Cell Physiol* 114:235
- Mitchell, R., Glynn Res., Bodmin, Cornwall, England, 1966
- Nakano, E., Ciampi, N. y Young D. 1982 *Arch Biochem Biophys* 215:556.
- Ossowski, I. y Reich, E. 1980 *Cancer Res* 40: 2310
- Papamathakis, J. y Marciani, D. 1979 *Proc Natl Acad Sci* 76:2784
- Pedersen, P. 1978 *Prog Exp Tumor Rev* 22:190
- Presek, P., Glossman, H., Eigenbrodt, E., Schoner, W., Rubsam, H., Frits, R. y Bauer, H. 1980 *Cancer Res* 40:1733

- Regan,D.H., Lavietes, B.B.,Reagan, M.G., Demopoulos, H.B. y Morris, H.P. 1973
J. Natl. Cancer Inst 51:1013.
- Reitzer, L., Wice, B y Kennel, D 1979. J.Biol.Chem. 254: 2669
- Reitzer, L., Wice, B y Kennel, D 1980. J Biol. Chem , 255 5616.
- Renner,E., Plagemann, P y Bernlohr,R 1972. J. Biol.Chem. 247.5765.
- Rogers, P Brenton, D y Hopkinson, D 1980. Ann Hum. Genet., 43:213.
- Sabine, J 1983 TIBS, 8 234
- Sauer,L., Dauchy, R., Nagel,W y Morris,H 1980. J.,Biol.Chem ,255:3844.
- Schering, B , Eigenbrodt, E., Linder, D y Schoner, W , 1982. Biochim Biophys. Acta,
717 337.
- Schulte-Hermann, R , Ohde, G , Schuppler, J. y Timmermann-Trosiener, I. 1981. Cancer
Res 41 2556
- Scott,C , Heckman,C., y Snyder, F. 1979. Biochem Biophys. Acta 575:215.
- Scott,C , Heckman, C , Nettesheim,P y Snyder, F 1979. Cancer Res 39:207.
- Shna, S y cols 1990 Amer J of Radiol. 155 507
- Singh,M., Singh,V , August, J y Horecker, B 1978. J.Cell Physiol 97:285
- Siperstein, M y Fagan,V 1964. Cancer Res ,24 1108
- Skulavchev, V 1971. Curr Top Bioeng 4:127.
- Stanist,J , Wice, B y Kennel,D 1983. Cell Physiol ,115:320.
- Sumbilla, C , Zielke, C , Reed, W., Ozy, P y Zielke H 1981. Biochim.
Biophys Acta 674 301
- Van de Stadt, R., Nieuwenhuis, F. y K. Van Damm. 1971.BBA. 234: 173.
- VanVeele, C , Verbiest, H , Vlug, A., Rijkese, G y Staal, G 1987. Cancer
Res. 38: 4618
- Warburg,O 1956 Science, 123:309.
- Weber,G 1977. Engl J Med 296:486
- Weber,G. 1972.Cancer Res 13:47.
- Wenner, C. y Tomei, L. Phenotypic expression of malignant transformation and its
relationship en: *The Transform Cell*. pag 163. Ed. Academic Press, New York, 1981.
- Yu, B.Y., y Cronholm, T.1996 BBA.1344.165.

- Zielke, H., Ozy, P., Tildon, J., Sevdalian, D. y Comblath, M. 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 4110.
- Zielke, H., Sumbilla, C. y Ozy, P., 1981. J. Cell. Physiol., 107: 251.