



UNAM



IZTACALA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA**

“Efecto de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE’s) sobre los niveles de glutatión total (GT) extracelular e intracelular, durante la intoxicación aguda con etanol en hepatocitos aislados.”

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

**PRESENTA:
ALAIN DE JESÚS HERNÁNDEZ VÁZQUEZ**

**Directora de Tesis: M. en C. MATUZ MARES DEYAMIRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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	Dr. Beatriz Vázquez Cruz
VOCAL	M. en C. Deyamira Matuz Mares
SECRETARIO	M. en C. Maria Eugenia Garín Aguilar
SUPLENTE	M. en C. David Segura Cobos
SUPLENTE	M. en C. Josefina Vázquez Medrano

AGRADECIMIENTOS

A mi madre que con mucho esfuerzo, sacrificio, dedicación y amor me ha llevado hasta este momento en mi vida y nunca terminare de agradecerle todo cuanto ha hecho por mi.

A mi padre y mis hermanos por compartir mis vivencias y alegrías.

A Gilda por todos los momentos que hemos pasado en que sus consejos, confianza, alegrías y amor me han llenado y servido para ser una mejor persona.

A todos mis amigos: Andrés, Hugo, Eduardo, Martín, Jorge, Luis Enrique, David, Orlando, Susy, Dorian, Gilda, Damián, José Luis, Manuela, Norma, Araceli, Analilia, Paulo, Gaby, Augusto, Deyamira, Héctor, Enrique, Analia, Daniela.

A mi asesora M. en C. Deyamira Matuz Mares por haberme conducido en esta etapa de mi formación compartiendo sus conocimientos como maestra y amiga.

A la Dra. Martha Zentella por sus comentarios tan atinados, por su gran apoyo tanto en lo académico como en lo personal y por permitirme compartir su espacio de trabajo.

Al Dr. Enrique Piña por su apoyo y por todas sus enseñanzas.

Al M. en C. Héctor Vázquez Meza por todas sus enseñanzas y apoyo académico pero sobre todo por las alegrías compartidas.

Al M. V. Z. Enrique Moreno por su amistad y apoyo en esta etapa de mi vida.

Al Dr. Héctor Riveros y al M. en C. Adrián Sandoval por sus comentarios que enriquecieron mi trabajo académico.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
○ ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
○ RESUMEN	
○ Introducción	1
▪ Etanol	3
▪ Absorción	6
▪ Metabolismo del etanol	8
• Alcohol Deshidrogenasa	8
• Sistema Microsomal Oxidante de etanol	10
• Catalasa	11
• Oxidación no enzimática del etanol	12
• Aldehido Deshidrogenasa	13
▪ Especies del Oxígeno Reactivas y Radicales Libres	16
▪ Antioxidantes	18
• Antioxidantes enzimáticos	18
• SUPERÓXIDO DISMUTASA	19
• Catalasa	19
• Glutación peroxidasa	20
• Antioxidante no enzimáticos	21
• Vitamina C	21
• Ácido úrico	21
• Ergotioeína	22

. Flavonoides polifenólicos	22
. Glutación	22
▪ Glutación	23
▪ Síntesis de Glutación	27
▪ Hígado	29
. Hepatocito	31
▪ Anti-inflamatorios no esteroideos	32
. Aspirina	33
. Piroxicam	33
. Meloxicam	34
○ ANTECEDENTES	36
○ HIPÓTESIS	38
○ OBJETIVOS	39
○ MATERIALES Y MÉTODOS	40
▪ Animales	40
▪ Aislamiento de hepatocitos	40
▪ Viabilidad celular	40
▪ Tratamientos	40
▪ Determinación de glutación total	41
○ RESULTADOS	42
○ ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	53
○ CONCLUSIONES	57
○ BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcH	Acetaldehído
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADP	Adenosíndifosfato
AINE´S	Anti-flamatorios no esteroideos
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AOX	Antioxidantes
AO	Aldehído oxidasa
AC	Área centrolobular
ASA	Aspirina
AT	3-amino-1,2,4 triazole
ATP	Adenosíntrifosfato
BAC	Concentración de alcohol en sangre
COX	Ciclooxigenasa
ENR	Especies del nitrógeno reactivas
EOR	Especies del oxígeno reactivas
EP	Espacio periportal
γ -GCS	γ -glutamylcisteín sintetasa
γ -GGT	γ -glutamyltranspeptidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GSHs	Glutación sintetasa
GT	Glutación total
GSH Px	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
LDH	Deshidrogenasa láctica
LPO	lipoperoxidación
MAOS	Sistema microsomal oxidante del acetaldehído
MEL	Meloxicam

MEOS	Sistema microsomal oxidante del etanol
NAD ⁺	Nicotinamín adenín dinucleótido
NADH	Nicotinamín adenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamín adenín dinucleótido de fosfato
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido de fosfato reducido
NO	Óxido nítrico
PIR	Piroxicam
RL	Radicales libres
SOD	Superóxido dismutasa
SRATB	Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TAG's	Tríacilglicéroles

RESUMEN

Las células han desarrollado sistemas de protección que funcionan como atrapadores de RL, denominados antioxidantes. El glutatión es considerado como un antioxidante y como el principal tiol no proteico intracelular en plantas y animales (Meister, et al 1984), lo podemos encontrar como glutatión reducido (GSH), como glutatión oxidado (GSSG) y asociado a proteínas conformando al glutatión total (GT) (Sies, 1999). El glutatión está en todos los órganos, pero en donde se encuentra en gran cantidad es en el hígado, que actúan como el centro de su síntesis, almacenaje y distribución. Existe en concentraciones de 0.1 a 10 mM con amplia distribución en las células animales (Martensson, et al 1990). El glutatión GSH se encuentra involucrado en el mecanismo de protección cuando existe una intoxicación aguda con etanol, ya que esto produce un estado de estrés oxidativo y como consecuencia un mayor consumo de GSH en hígado (Videla, et al 1980). Se ha demostrado que en animales íntegros el contenido de (GT) en presencia de una administración aguda de etanol sufre una disminución, pero al aplicar piroxicam se revierte la disminución de GSH hepático (Zentella, et al 1994). En el presente estudio se analizó el efecto del etanol sobre el contenido de GT en hepatocitos aislados, así como el efecto de algunos anti-inflamatorios no esteroideos. En hepatocitos provenientes de ratas alimentadas e incubados con una dosis aguda de etanol (50 mM) se observa una disminución en los niveles de GT intracelular y extracelular ($p < 0.01$). Los hepatocitos que se incubaron en presencia de etanol y de manera simultánea con los diferentes anti-inflamatorios no esteroideos (aspirina, piroxicam, meloxicam), presentaron en cada uno de los casos diferencias al ser comparados con los hepatocitos que se incubaron únicamente con etanol 50 mM. Esto es de gran importancia para este estudio ya que el modelo *in vivo* puede ser reproducible *in vitro* y revertir el decaimiento causado por el etanol o su producto el acetaldehído sobre los niveles de GT. Al comparar este experimento con los experimentos en los que se incubó únicamente con el AINE, observamos que no hay diferencias estadísticas ya que los niveles de glutatión total se mantuvieron en el mismo porcentaje en comparación con el GT basal. Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que el uso de los AINE's en nuestro modelo experimental ayuda a contrarrestar el daño que causa el etanol en los niveles de glutatión total. Bajo las condiciones del modelo experimental empleado invariablemente encontramos una mayor cantidad de glutatión total en el medio extracelular, lo cual posiblemente sea un reflejo del papel que desempeña el hígado en la homeostasis orgánica del glutatión y su disponibilidad para los órganos y tejidos periféricos que lo requieren. Los resultados obtenidos también nos permiten incursionar en los mecanismos celulares que intervienen en dicha respuesta.

INTRODUCCIÓN

La ingesta de bebidas alcohólicas ha acompañado a la humanidad desde los primeros años de su existencia. Una vez que el hombre razonó sobre los procesos naturales por los que era posible imitar a la naturaleza comenzó a elaborar bebidas alcohólicas, hay indicios del vino en Mesopotamia hace 4.000 años a. C. y de la cerveza con los egipcios hace 2200 años a. C. (Kricka y Clark, 1979). También los fenicios y los chinos a partir de la fermentación de granos obtenían bebidas alcohólicas, o en el caso de los aztecas que obtenían de la savia del maguey el pulque (Mike, 1995), el consumo moderado del alcohol ha sido aceptado por diversas culturas y religiones (Rodríguez *et al*, 1993).

El consumo del alcohol, ha sido reconocido como un factor de integración social y favorecedor de la convivencia, consumido con moderación y en los contextos permitidos, reduce la tensión, desinhibe y provoca sensaciones de bienestar (Kricka y Clark, 1979). La influencia del alcohol en la sociedad ha tenido gran peso como factor problemático en la conformación y funcionamiento de la familia, el individuo y por ende de la sociedad. El consumo inmoderado de alcohol por el ser humano ha llegado a ser un problema prioritario en el campo de la salud pública ya que afecta a individuos cada vez mas jóvenes (Zentella, 1994). En nuestro país los resultados de la Encuesta Nacional de Adicciones realizada por el Consejo Nacional Contra las Adicciones (CONADIC), reportan un aumento del consumo de etanol en los varones, de 27% en 1998 aumento a 35% en 2002 y de 18% al 25% en las mujeres. Globalmente, de la población adulta el 90 % consumen etanol, el 40 - 50% de estos tienen problemas temporales relacionados a su consumo, mientras que el 10% de los hombres y 5% de las mujeres persisten en el consumo desarrollando alcoholismo.

El alcoholismo es una enfermedad crónica, progresiva y a menudo mortal; es un trastorno primario y no un síntoma de otras enfermedades o problemas emocionales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el alcoholismo

como la ingestión diaria de alcohol superior a 50 mg/dL en la mujer y 70 mg/dL en el hombre (una copa de licor o un combinado tiene aproximadamente 40 mg/dL de alcohol, $\frac{1}{4}$ de litro de vino 30 mg/dL y $\frac{1}{4}$ de litro de cerveza 15 mg/dL). El alcoholismo parece ser producido por la combinación de diversos factores fisiológicos, psicológicos y genéticos. Se caracteriza por una dependencia emocional y a veces orgánica del alcohol, que produce un daño cerebral progresivo y afecta diversos órganos y tejidos, por ejemplo; el páncreas, el hígado y puede llegar a ocasionar la muerte (citado en Zentella, 1994).

Etanol

El etanol, alcohol etílico o simplemente alcohol tiene un peso molecular de 46.07 g/mol, un punto de fusión de $-114.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, un punto de ebullición de $78.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, calor de vaporización de 854 J/g y una densidad relativa de 0.789 a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Merck Index, 1989). El etanol es el producto reducido en la fermentación alcohólica de la levadura y otros microorganismos que fermentan la glucosa a etanol y CO_2 , en lugar de formar lactato. La glucosa se convierte en piruvato durante la glucólisis y el piruvato se transforma en etanol y CO_2 (Lehninger et al, 2001) (Fig. 1).

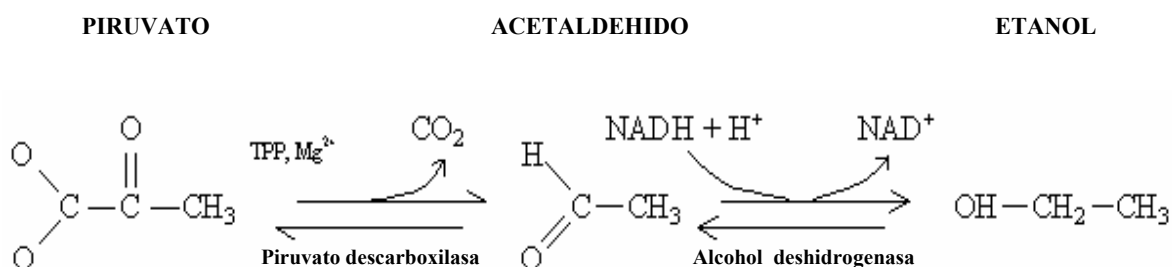


Figura 1. El piruvato producto de la glicólisis es transformado a etanol en la fermentación alcohólica, tomado de (Lehninger et al, 2001).

El etanol es un líquido volátil incoloro de un olor característico, posee una desigual distribución de sus cargas lo que le confiere una polaridad natural, es soluble en agua, cloroformo, y acetona entre otros disolventes, y es prácticamente insoluble en grasas y aceites. Es importante mencionar que algunas publicaciones han descrito erróneamente al etanol como una sustancia soluble en lípidos, posiblemente esto se deba a que es una molécula muy pequeña y es capaz de pasar libremente a través de las membranas biológicas de la misma manera que lo hace una sustancia liposoluble, además otras moléculas de bajo peso molecular como el agua también pueden pasar con facilidad a través de la doble capa de fosfolípidos sin tener que ser solubles en lípidos (Riveros et al, 1997).

En los mamíferos el etanol es un metabolito que normalmente está presente en muy bajas concentraciones de 0.1 a 1 mM, su presencia se debe a la actividad

fermentativa de la flora gastrointestinal y a su producción endógena en diferentes tejidos, especialmente el hígado (McManus *et al*, 1960; Barahona *et al*, 1986). Sin embargo, las cantidades de etanol no son suficientes para justificar la presencia de tantas isoenzimas capaces de oxidarlo a acetaldehído (Zentella *et al*, 1993). Hay que hacer notar que existen variaciones genéticas que influyen en el polimorfismo de las enzimas responsables del metabolismo del etanol, además de otros factores como la edad, sexo, estado de ayuno o alimentación, etc., que contribuyen a la absorción, la distribución y el metabolismo del alcohol (Riveros *et al*, 1997). Por lo tanto cada individuo responde de forma diferente al consumo de etanol. Además la oxidación del etanol libera 7 cal/g a estas calorías se les conoce como “calorías vacías”, ya que no van acompañadas de aminoácidos ni vitaminas, por lo que no sintetizan las moléculas estructurales de la célula (Laguna y Piña, 2002)

En general, la concentración de etanol en sangre permite predecir el grado de modificación conductual y cognitiva de un sujeto. Así y con carácter estimativo Bogen (1932) propuso una clasificación de los efectos del etanol, según diferentes concentraciones séricas. Esta clasificación se mantiene en la actualidad con escasas variaciones. Según esta clasificación, concentraciones de alcohol en sangre (BACs) de:

- Entre 2 y 6 mM no existe apenas alteración funcional perceptible, excepto si se recurre a procesos y tareas más sofisticados de laboratorio (ejemplo; tareas de atención dividida).
- Entre 6 y 12 mM de etanol en sangre producen una sensación de euforia así como un incremento de la interacción social.
- Entre 12 y 20 mM la euforia llega a producir desinhibición y una seria alteración del autocontrol y de la capacidad valorativa del sujeto.

- Entre 20 y 30 mM, concentraciones que pueden alcanzarse aún en episodios de consumo de etanol socialmente considerado como aceptable, se produce un importante descenso de la ejecución psicomotora y la articulación del habla se ve parcialmente comprometida.

- Entre 30 y 40 mM de etanol en sangre producen una confusión mental significativa que se traduce incluso en dificultades relativas para mantener el equilibrio postural (citado en Aragón *et al*, 2002).

Absorción

Después de que el etanol es ingerido, comienza a ser absorbido inmediatamente por el epitelio mucoso y en los alvéolos pulmonares como vapor, sin embargo, la cantidad que es absorbida por estas dos vías es prácticamente insignificante, por lo que se puede considerar que todo el alcohol ingerido va al estómago, donde es absorbido por difusión simple por el epitelio del estómago e intestinos como ocurre con el agua. En el estómago, es absorbido en pequeñas dimensiones en la corriente sanguínea por mucosas gástricas (aproximadamente del 20-al 30 %), mientras que la cantidad más grande es canalizada por el vaciamiento gástrico hacia el intestino delgado (Batt, 1989; Cooke y Birchall, 1969; Smith *et al*, 1992) (Fig. 2). Es en el intestino delgado (principalmente duodeno y yeyuno) en donde se lleva acabo la principal absorción del etanol, este rápidamente es canalizado hacia la vena porta y desde allí es llevado directamente al hígado para ser metabolizado (Watson, 1989) (Fig. 3). Su oxidación se realiza principalmente en este órgano, que contiene la mayor cantidad de enzimas que lo oxidan. Durante su metabolismo, éste es capaz de desplazar el 90% de otros sustratos utilizados por el hígado, lo que convierte al hepatocito en la principal célula que metaboliza al etanol (Lieber, 1991).

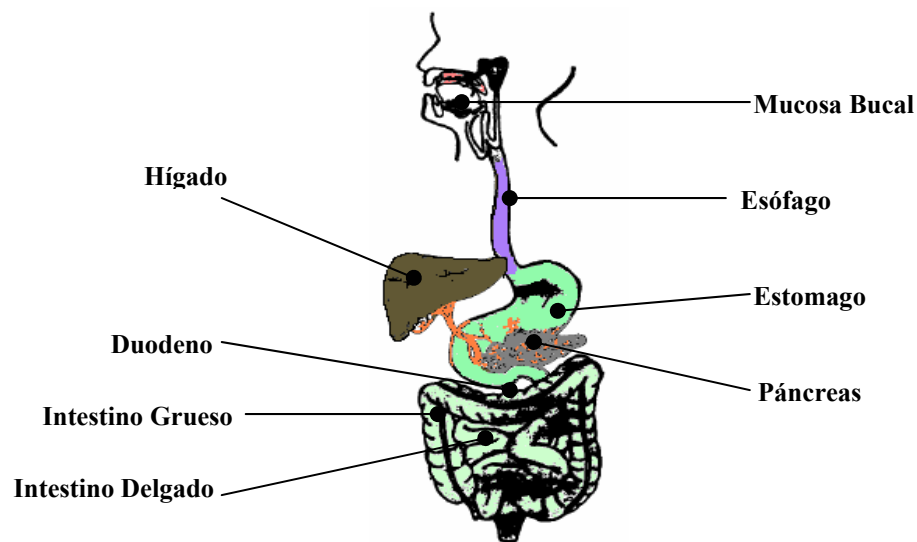


Figura 2. Órganos involucrados en la absorción y oxidación del etanol, cuando el alcohol es administrado por vía orogástrica, tomado de (Riveros *et al*, 1997).

De este modo la mujer, que tiene una menor proporción de fluidos corporales que el hombre (53% contra 61.8%), alcanza niveles más altos de etanol en sangre habiendo ingerido la misma cantidad de etanol (Batt, 1989; Watson, 1989).

La tasa de absorción de etanol, depende principalmente de la velocidad con la que pasa del estómago al intestino delgado, que a su vez depende de la velocidad del vaciamiento gástrico. En general la presencia de alimento sólido retarda el vaciamiento gástrico y la velocidad de absorción del etanol (Horowitz *et al*, 1989). En otros casos la concentración del etanol ingerido también influye en la absorción y retarda el vaciamiento del alimento (Roine *et al*, 1991). Este es solo un factor pero hay muchos mas factores que pueden modificar la velocidad de absorción como son: vaciamiento estomacal, alimento en el estómago, concentración de etanol, flujo sanguíneo en el sitio de absorción, propiedades irritantes del etanol, taza de ingestión, tipo de bebida, deficiencia proteica, temperatura corporal, ejercicio físico y ciclo menstrual (Agarwal y Goedde, 1989).

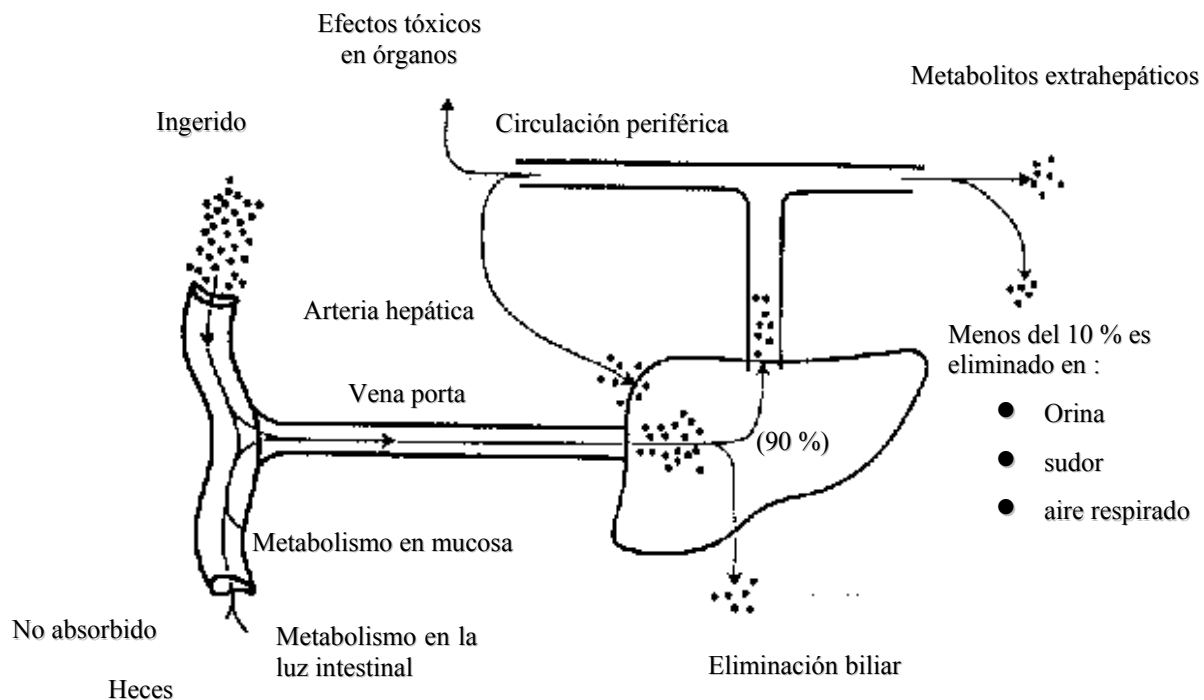


Figura 3. Metabolismo hepático y extrahepático del etanol, tomado de (Zentella *et al*, 1993).

Metabolismo del etanol

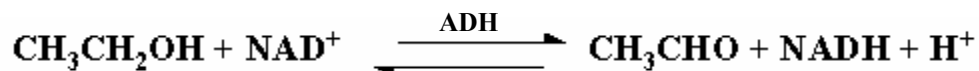
Las células eliminan al etanol casi exclusivamente por oxidación. Este proceso se da principalmente en el hígado, mediado por la alcohol deshidrogenasa (ADH) citosólica. Así el alcohol es metabolizado enzimáticamente por la ADH primero a acetaldehído (AcH) (Petersen *et al*, 1983). En cuanto a la oxidación del AcH, la enzima implicada es la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y mediante su acción se obtiene acetato, los últimos productos de este metabolismo son el dióxido de carbono (CO₂) y el agua (H₂O) (Escarabajal, 2000).

Por otra parte, una pequeña porción de ese etanol, un 10% o menos, puede ser metabolizado por rutas alternativas, como por ejemplo; el sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS) o la vía de la catalasa (Lieber, 1977; Zimatkin and Deitrich, 1997) (Fig. 4): El MEOS y la catalasa tienen valores para la constante de Michaelis (Km) mayores que la ADH por eso sólo llegan a ejercer una acción significativa a niveles elevados de etanol, cuando la ADH está inhibida o, en el caso de MEOS, cuando el consumo de etanol es crónico (Zimatkin y Deitrich, 1997). También se ha propuesto en este metabolismo un mecanismo que implica a los radicales libres (Winston y Cederbaum, 1983 (a, b)).

Alcohol Deshidrogenasa

La ADH hepática cataliza la oxidación de etanol a AcH y la reducción simultánea de NAD a NADH. La enzima está localizada en el citosol, tiene una constante de afinidad (Km) relativamente baja (Von Wartburg *et al*, 1983), y funciona a su capacidad máxima con cantidades relativamente pequeñas de alcohol en sangre. El paso limitante en esta etapa del metabolismo del etanol depende de la velocidad con la que el hígado regenera NAD desde el NADH. Para lograr esto, el piruvato es reducido a lactato por el NADH y el lactato pasa a la sangre (Eriksson, 1977) (Fig. 4). Esta enzima tiene un orden cinético de cero y su

velocidad de reacción no se incrementa por la presencia de etanol en cantidades grandes.



Varios estudios han demostrado que la actividad de la ADH hepática humana tiene una gran variedad interindividual (Li y Magnes, 1975). En este sentido las diferencias en el metabolismo reflejan principalmente el amplio intervalo de propiedades catalíticas de la ADH hepática humana y la de otros animales que se deben al amplio número de formas moleculares observadas en esta enzima, se puede decir que la ADH en función de sus características electroforéticas y catalíticas es una mezcla de un amplio número de isoenzimas (Smith *et al*, 1973; Jornvall *et al*, 1987). Teniendo en cuenta que la ADH es un multigen, es decir, un sistema alélico múltiple (Jornvall *et al*, 1991) que en seres humanos constituye una familia compleja, a partir de sus rasgos estructurales y cinéticos, y por la composición de sus isoenzimas puede ser dividida en cinco clases (Yin, 1994). Así la ADH está ampliamente distribuida en diferentes tejidos del cuerpo humano (Boleda *et al*, 1989) (Cuadro 1).

Cuadro 1

Actividad de Alcohol Deshidrogenasa en varios órganos de rata con 33 mM de etanol y 4 mM NAD ⁺ como sustrato, pH 7.5		
Órgano	Actividad	
	mU/g de tejido	Total (mU/órgano)
Ojos	5.87 ± 0.7	1.5 ± 0.2
Mucosa del oído	8.9 ± 1.3	2.0 ± 0.3
Mucosa nasal	15.3 ± 2.6	1.3 ± 0.2
Traquea	5.3 ± 0.7	1.2 ± 0.1
Pulmones	8.1 ± 1.4	13.5 ± 2
Mucosa bucal	3.8 ± 0.8	0.3 ± 0.1
Lengua	5.4 ± 0.5	4.0 ± 0.3
Esófago	16.1 ± 3.2	3.7 ± 0.7
Estómago	11.8 ± 1.7	19.6 ± 3
Intestino delgado	19.3 ± 4.3	58.0 ± 14
Colon	13.5 ± 1.3	30.0 ± 3
Recto	37.3 ± 7.0	28.5 ± 6
Hígado	260.0 ± 50	3500.0 ± 640
Glándula Suprarrenal	4.0 ± 0.5	0.8 ± 0.3
Riñón	16.0 ± 7.0	26.0 ± 13
Vejiga urinaria	10.0 ± 2	1.8 ± 0.5
Testículos	26.2 ± 9.0	60.0 ± 20
Pene	10.5 ± 4.1	40.0 ± 16
Epidídimo	17.5 ± 8.09	4.44 ± 1.16
Ovarios	7.0 ± 5.0	0.9 ± 0.7
Útero	17.4 ± 7.2	9.6 ± 4
Vagina	12.5 ± 4.6	3.0 ± 1
Piel	2.8 ± 0.3	88.0 ± 15

Datos reportados por Boleda *et al*, 1989.

Sistema Microsomal Oxidante de etanol

El Sistema Microsomal Oxidante del etanol (MEOS) se localiza en los microsomas del retículo endoplasmático que cuentan con la presencia del citocromo P-450 la reacción requiere la presencia de NADPH y la reducción de una molécula de oxígeno, formando H₂O₂ (Fig. 4). Este sistema enzimático es miembro de la familia de los citocromos microsomales P450, y la denominación actual más extendida para este sistema es P450 CYP2E1, que corresponde a la proteína purificada. Es un enzima que presenta una Km alta (8-10 mmol/l), si se compara con la ADH (Escarabajal, 2000).



La mayor actividad del MEOS es conferida por la exposición prolongada del etanol que conlleva a un aumento en el metabolismo de diferentes drogas, así como al aumento en la producción de metabolitos tóxicos generados a partir de ciertas drogas (Riveros *et al*, 1997).

Catalasa

La catalasa que se encuentra en los peroxisomas de las células hepáticas, actúa descomponiendo peróxidos de hidrógeno en el proceso de oxidación del etanol (Fig. 4), la principal limitante en la actividad de esta enzima es la presencia de peróxidos, por lo que su participación en la oxidación etílica es muy reducida (Lieber, 1994).



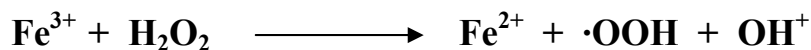
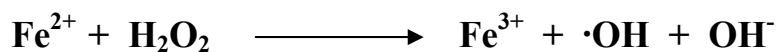
La catalasa es un enzima tetramérica con un grupo hemo en cada subunidad. El gen de la catalasa humana ha sido localizado en el cromosoma 11 (Goth y Pay, 1996). Se encuentra en todos los organismos aeróbicos y todo indica que su función es degradar rápidamente peróxido de hidrógeno. La catalasa es uno de los catalizadores más activos producidos por la naturaleza. Es única entre las enzimas que degradan H_2O_2 porque lo hace de una manera muy eficiente energéticamente por ello se ha propuesto como sistema regulador de la homeostasis de peróxido de hidrógeno en la célula (Escarabajal, 2000). Dependiendo de la concentración de peróxido, ejerce una función dual. A altas concentraciones de substrato, la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno rápidamente sirviéndose de una reacción catalítica en la cual el H_2O_2 actúa tanto como aceptor, como donador de moléculas de hidrógeno (Berkaloff *et al.*, 1988).

Las contribuciones de la catalasa al metabolismo hepático del etanol pudieran verse seriamente comprometidas (Lieber, 1997), ya que los niveles de peróxido de hidrógeno presentes en el organismo pudieran ser insuficientes para posibilitar el nivel de funcionamiento que algunos autores le atribuyen. No obstante, existen pruebas que indican que los niveles de peróxido de hidrógeno presentes en algunas mediciones *in vitro* pueden ser menores de los existentes *in vivo* lo que puede estar reduciendo la importancia percibida de la vía metabólica mediada por la catalasa. Así, la adición de ácidos grasos o albúmina (que elevan la cantidad de H_2O_2) a estas preparaciones, posibilita que este sistema sea el principal responsable de la oxidación del etanol en ausencia de la ADH (Escarabajal, 2000)

También se ha observado que a dosis superiores a 3 g/kg de etanol, la inhibición de la catalasa por el AT (3-amino-1,2,4-triazol), un inhibidor de peróxido de hidrógeno rico en hierro, produciendo una disminución en la velocidad de eliminación del etanol, lo que hace suponer la participación de esta enzima cuando las concentraciones de alcohol son elevadas (Thurman y Handler, 1989).

Oxidación no enzimática del etanol.

Aparte de los sistemas enzimáticos involucrados en la oxidación del etanol, existe un mecanismo no enzimático dependiente de la participación de hierro (Fe^{2+}) quelado y en presencia del H_2O_2 el cual se genera en la mitocondria y el retículo endoplásmico, esto da lugar a la formación de iones oxhidrilo (OH^-) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$) vía la reacción de Fenton que también puede ser iniciada por iones ferricos (Fe^{3+}) (Zentella y Saldaña, 1996).



La presencia de radicales hidroxilo depende de la presencia de quelatos de hierro, un sistema reductor, y la disponibilidad de peróxido de hidrógeno (Kathrym y Richard, 1989). Por lo que las reacciones que producen peróxidos de hidrógeno o ion superóxido promueven la oxidación no enzimática del etanol. Esta oxidación pudiera ser poco significativa, debido a que los complejos orgánicos de hierro son poco eficientes para oxidar el etanol, sin embargo la generación de RL a partir de la oxidación etílica explica el daño a los tejidos por etanol. Los ésteres etílicos son metabolitos no oxidativos del etanol que se pueden formar *in vivo* mediante una reacción catalizada por la enzima etil ester sintetasa (Mogelson y Lange, 1984). Los efectos fisiológicos de la formación de ésteres etílicos consisten en la afectación de la capacidad oxidativa de la mitocondria, aunque también se ha descrito su capacidad para desordenar las membranas celulares (Aragón *et al*, 2002).

Como se expuso con anterioridad el etanol, después de su ingestión, se absorbe rápidamente desde el tracto intestinal y es distribuido uniformemente en el agua del organismo. La vía para degradar el etanol es su oxidación en el hígado a AcH mediante la acción de la ADH. Posteriormente, el AcH es oxidado por la ALDH dependiente de NAD^+ a ácido acético. La ALDH es la segunda enzima mas importante en el metabolismo del etanol (Weiner, 1979).

Aldehido deshidrogenasa

Debido a sus efectos agudos y crónicos en humanos, el acetaldehído ha recibido una atención considerable. La ALDH cataliza la oxidación de AcH en el

hígado y en otros órganos ya que al contrario de la ADH, que está localizada principalmente en el hígado, la ALDH se localiza prácticamente en cualquier órgano del cuerpo (Escarabajal, 2000).

También, a diferencia de la ADH, que se encuentra exclusivamente en el citosol, la ALDH se encuentra en los microsomas y en la mitocondria así como en el citosol. Las formas multimoleculares de la enzima, poseen diferentes propiedades físicas y catalíticas (Deitrich *et al*, 1976).

La reacción catalizada por la ALDH es esencialmente irreversible en dirección de la formación de acetato por la elevada eficiencia catalítica de la ALDH y el alto grado de reoxidación de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ a NAD^+ en la mitocondria permite el metabolismo del etanol en un rango importante en el hígado (Escarabajal. 2000) (Fig. 4)

La aldehído oxidasa (AO) es una enzima pobremente estudiada, la cual cataliza la oxidación del acetaldehído hacia acetato en una reacción dependiente de oxígeno y que genera H_2O_2 . El Sistema Microsomal de Oxidación del Acetaldehído (MAOS) requiere la participación de un citocromo P-450 para llevar a cabo la oxidación del acetaldehído hacia acetato en una reacción acoplada a la oxidación de un fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida reducida ($\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$) y la reducción de una molécula de oxígeno para formar H_2O_2 , en una reacción análoga a la realizada por la MEOS sobre el etanol (Fig. 4).

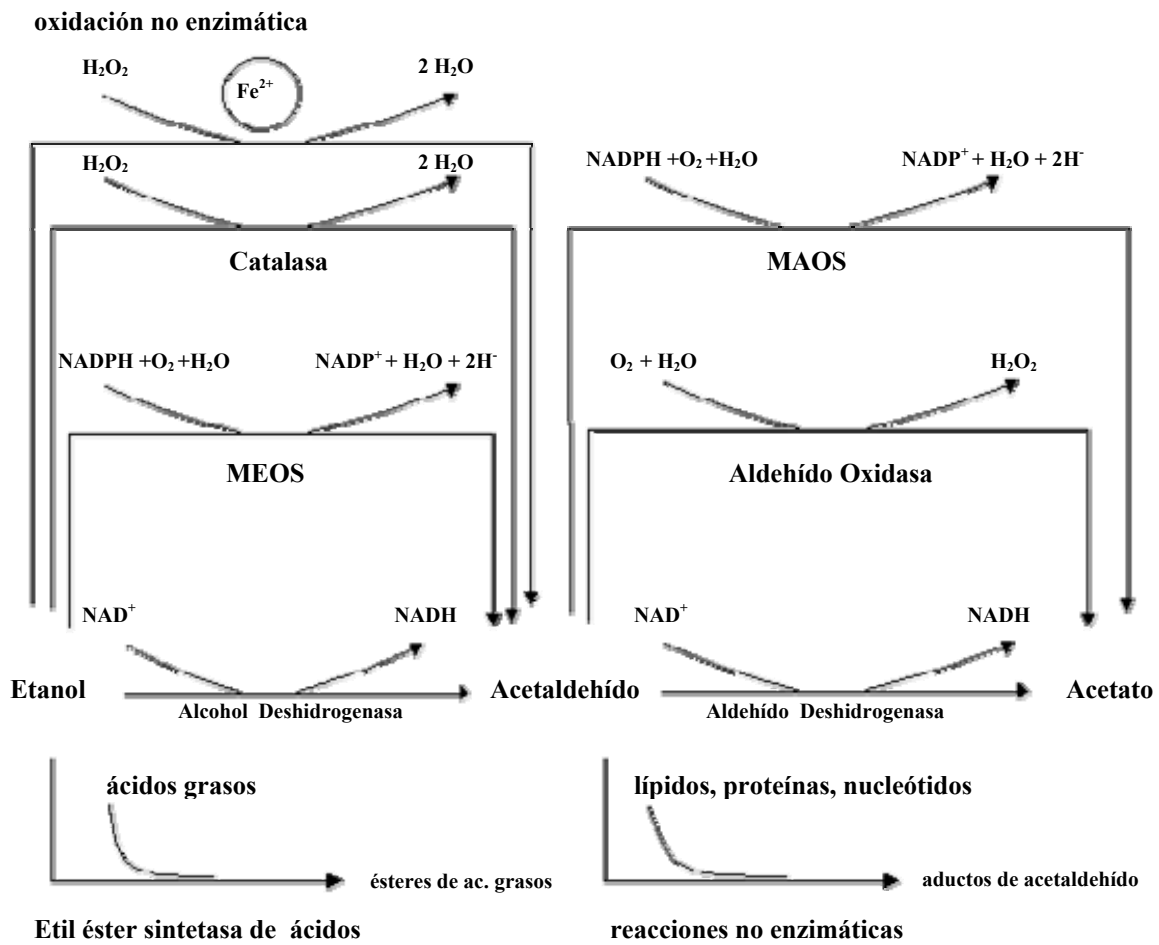


Figura 4. Principales vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del etanol y del acetaldehído, tomado de (Riveros *et al*, 1997).

Especies del Oxígeno Reactivas y Radicales Libres

El metabolismo del etanol genera gran cantidad de Especies del Oxígeno Reactivas (EOR), y entre ellas radicales libres (RL) que se identifican como átomos o moléculas capaces de existir independientemente, y que poseen uno o más electrones no apareados girando en órbitas externas (Zentella *et al*, 1994b).

Las EOR se generan en el organismo como subproductos de diversas reacciones y con múltiples funciones (Cuadro 2), la mitocondria constituye un gran generador de oxidantes, tiene un sistema transportador de electrones que consume aproximadamente el 85% del oxígeno usado por la célula, en contraste con otros sistemas productores de oxidantes como el citocromo P450, varias oxidasas citosólicas y la β -oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas (Chance *et al*, 1979; Shigenaga *et al*, 1990), las EOR se generan en menor grado en procesos como el metabolismo del ácido araquidónico, síntesis de hormonas en la corteza suprarrenal, ciclos enzimáticos, y por la acción de polimorfonucleares con múltiples funciones (Zentella y Saldaña, 1996).

Cuadro 2. Funciones de las Especies del Oxígeno Reactivas

Promotores de especies ferrilo.
Reducción de ribonucleótidos.
Reacciones de oxidación, carboxilación e hidroxilación.
Fagocitosis.
Actividad de peroxidasa, NADH y NADPH oxidasas.
Maduración y respuesta al daño en tejidos vegetales
Producción de eicosanoides.
Factor endotelial de relajación.

Las especies reactivas derivadas del oxígeno se producen normalmente en el cuerpo humano; se calcula que del oxígeno respirado del 1 a 3% es usado para formar radical superóxido (O_2^-), tanto en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria como en retículo endoplasmático. Parte de los radicales

O_2^- se producen durante las reacciones de varias moléculas directamente con el oxígeno, por ejemplo: la adrenalina, la dopamina, el tetrahidrofolato, los citocromos, etc (Shigenaga *et al*, 1990). Además, el O_2^- también es producido por las células del sistema inmune: los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) como parte del mecanismo para destruir organismos extraños, el radical $\cdot OH$ se produce por las radiaciones provenientes del medio, ya sean naturales o bien de otras fuentes creadas por el hombre (Zentella y Saldaña, 1996). Otro RL que produce el organismo es el óxido nítrico ($NO\cdot$), que es un segundo mensajero intracelular y participa en la regulación sanguínea.

Las EOR generadas por el metabolismo normal existen en concentraciones muy bajas, de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} M, no viajan muy lejos de los sitios en donde se forman, debido a que su vida media es de unos cuantos microsegundos (Zentella y Saldaña, 1996).

Las EOR se pueden agrupar en derivadas del oxígeno como los singuletes δ y σ del Oxígeno (O_2), el radical O_2^- , el radical $\cdot OH$, los del nitrógeno como peroxinitrato, óxido nítrico y de metales de transición (Ferreira, 1984). Las EOR reaccionan con polímeros estructurales de la célula como los polisacáridos, lípidos (ácidos grasos de la membrana), proteínas (grupos tioles), y ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas), alterando su estructura y función, por lo tanto cuando la abundancia de RL rebasa la capacidad antioxidante de la célula esta entra en un estado de estrés oxidativo (Zentella y Saldaña, 1996).

Entre los daños celulares ocasionados por los RL se encuentra la lipoperoxidación de la membrana celular, que involucra una serie de oxidaciones consecutivas que son iniciadas por radicales hidropéroxilo ($OH_2\cdot$), $\cdot OH$, o por el oxígeno singulete. La lipoperoxidación parece ser uno de los mecanismos más importantes relacionados con el daño celular, durante el consumo exagerado o crónico de etanol (Zentella *et al*, 1994b; Videla y Valenzuela, 1982).

Antioxidantes

Las EOR y los RL se producen constantemente en forma inevitable durante los procesos metabólicos, la célula ha desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes que reciben el nombre genérico de antioxidantes (AOX) (Yu, 1994; Alarcón, 2001), y pueden definirse como moléculas que previenen la formación descontrolada de RL o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

Muchos de los AOX son enzimas o nutrimentos esenciales, o incorporan nutrimentos esenciales en la estructura de sus moléculas (Machlin y Bendich, 1987), entendiendo como nutrimento esencial a aquel compuesto que debe ser ingerido porque el organismo es incapaz de sintetizarlo. Esta característica se puede tomar para clasificarlo en AOX enzimáticos y no enzimáticos (Larkins, 1999; Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). Otro criterio de clasificación se basa en el mecanismo mediante el cual los AOX ejercen su acción protectora, agrupándolos en aquellos que cumplen una función preventiva en la formación de los RL y en aquellos que interceptan o capturan los que ya se han producido. También es posible clasificarlos conforme a su localización, ya sea en intra o extracelulares (Larkins, 1999).

Para proveer protección, los AOX plasmáticos e intracelulares están integrados a las estructuras moleculares para lograr la supresión de las reacciones que generan RL (Yu, 1994). Estos últimos se distribuyen preferentemente en los organelos que, por la intensidad de su actividad y su función metabólica, generan una mayor producción de RL, localizados tanto en membranas como en el citosol (Cheeseman y Slater, 1993; Comporti y Benedetti, 1985).

Antioxidantes enzimáticos.

La función antioxidante desempeñada por enzimas puede presentar ventajas frente a los compuestos AOX en el sentido de que su actividad es regulada acorde con los requerimientos celulares: pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectores endógenos (Harris, 1992). El grupo de antioxidantes enzimáticos cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los RL. Posteriormente los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ producido en las diferentes vías metabólicas (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). Frente a una exposición prolongada de EOR puede ocurrir una disminución en las concentraciones del NADPH necesario en otros importantes procesos fisiológicos, a pesar de que algunos AOX enzimáticos no consumen cofactores (Miller *et al*, 1993).

Algunos ejemplos de AOX enzimáticos son:

Superóxido dismutasa (SOD).

Esta enzima es una metaloproteína presente en las células aerobias y fluidos extracelulares. Su función es catalizar la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, lo que no requiere de cosustrato. La SOD presenta tres isoformas, dependiendo del metal que contenga. Las isoformas dominantes son la SOD-Cu y SOD-Zn, localizadas preferentemente en el citosol. La isoforma SOD-Mn se encuentra en la matriz mitocondrial (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). La biosíntesis de esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa.

Catalasa.

Es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hem. De amplia distribución intracelular, se centra principalmente en peroxisomas y mitocondrias (Murray *et al*, 1994) para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno proveniente de la dismutación del superóxido en agua y oxígeno, esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa. En general las bajas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa (Yu, 1994).

Glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Es una selenoproteína que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. En presencia de glutatión reducido (GSH), como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente (Powers y Lennon, 1999). Al igual que otras selenoproteínas, el sitio activo de GSH-Px contiene selenio (Se) bajo la forma de residuos de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica conformada por 21 aminoácidos (Stadman, 1996). Se han descrito cuatro isoformas de GSH-Px que difieren tanto en su ubicación como en la especificidad del sustrato (Holben y Smith, 1999), tres de las cuales presentan estructura tetramérica (Arthur, 2000), La primera de ellas, GSH-Px celular o clásica, está prácticamente en todas las células, puede reducir el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres y convertirlos en agua y alcoholes. La segunda isoforma es la GSH-Px plasmática o extracelular, es una glicoproteína purificada, caracterizada a partir de plasma humano que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón. El tercer tipo es la GSH-Px fosfolípido hidroperóxido, cuya función biológica primaria es proteger contra la lipoperoxidación (LPO) reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Es la única isoforma cuya

estructura es monomérica; es decir, contiene un solo residuo de selenocisteína (Arthur, 2000). El último tipo se denomina GSH-Px gastrointestinal y representa la principal peroxidasa dependiente de glutatión en el tracto gastrointestinal. Es importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol y en la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos (Holben y Smith, 1999).

Antioxidantes no enzimáticos.

Los AOX no enzimáticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan RL y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. El mecanismo involucrado es la donación de un electrón a un RL con el fin de estabilizarlo (Larkins, 1999).

Los AOX no enzimáticos hidrófilos se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares, entre ellos está la vitamina C, glutatión, ácido úrico, ergotioneína y flavonoides polifenólicos (Chihuilaf *et al*, 2002).

Vitamina C.

Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con el radical superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos. También actúa sobre el radical tocoferoxilo regenerándolo a vitamina E. Este proceso transforma el ascorbato en el radical deshidroascorbato, el retorno a su forma nativa es por acción enzimática o por sustratos celulares tiólicos (Powers y Lennon, 1999). A pesar de sus propiedades como AO, el ascorbato puede desempeñarse como un potente prooxidante en presencia de excesivas concentraciones de iones Fe^{3+} y Cu^{2+} (Yu, 1994).

Ácido úrico.

Su función como AOX biológico tanto intra como extracelular, ha comenzado a reconocerse. Su mecanismo de acción aparentemente sería prevenir la oxidación de la Vitamina C y formar complejos con los metales Fe^{3+} y Cu^{2+} (Yu, 1994; Miller *et al*, 1993).

Ergotioeína.

Llega a las células de los mamíferos a través de la ingesta de vegetales. Es un poderos capturador de EOR producido por la acción de la mieloperoxidasa presente en neutrófilos. Puede reaccionar con peroxinitritos y sus derivados y capturar iones hidroxilo. Sus estados oxidados intermedios son rápidamente regenerados en presencia de ascorbato (Powers y Lennon, 1999).

Flavonoides polifenólicos.

Se designa con este nombre a un amplio grupo de compuesto fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas) que actúan como potentes quelantes de metales y capturadores *in vitro* de EOR y especies del nitrógeno reactivas (ENR). Pueden ser lipo o hidrosolubles y se localizan tanto intra como extracelularmente (Larkins, 1999).

Glutación.

Sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas del carbono (Yu, 1994), además, reduce el radical tocoferoxilo y deshidroascorbato reconvirtiendolos a su forma original (Powers y Lennon, 1999. Zentella y Saldaña, 1996).

Glutación

El glutación es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) esta formado por ácido glutámico, cisteina y glicina, la cisteina contiene un grupo sulfhídrico libre que funciona como amortiguador para mantener los residuos de cisteina de la hemoglobina y de otras proteínas de las células en su forma reducida (Akerboom y Sies, 1981; Sies, 1999), por lo tanto lo podemos encontrar como glutación reducido (GSH), como glutación oxidado (GSSG) y asociado a proteínas conformando al glutación total (GT) (Sies, 1999) (Fig. 6).

Dos estructura caracterizan a la molécula de glutación; en primer lugar un enlace peptídico γ -glutamil, que lo hace resistente a la acción de enzimas intracelulares con actividad de peptidasa normal y la segunda mitad donde el residuo de cisteinil lo dota como donador de electrones (Speisky *et al*, 1985; Sies, 1999).

El glutación existe en concentraciones de 0.1 a 10 mM con amplia distribución en las células de los eucariontes (Martensson *et al*, 1990), y es considerado como el principal tiol no proteico intracelular en plantas y animales (Meister y Anderson, 1984; Sies, 1999). El glutación no se distribuye de forma homogénea en las células, del 80-85% se localiza en el citosol, lugar exclusivo de su síntesis, y del 15-20% se ubica en las mitocondrias donde puede alcanzar una concentración similar a la que se encuentra en el citosol (Fernández-Checa *et al*, 1991). La poza de glutación mitocondrial proviene del citosol ya que existe un eficiente sistema acarreador que transloca el glutación citosólico a la matriz mitocondrial (Martensson *et al*, 1990; Meister, 1988),

El glutación es el AOX más importante con el que cuenta el hígado, ya que este es su principal sitio de síntesis, almacenamiento y exportación, su importancia radica en el papel que juega el hígado como responsable de la oxidación y eliminación del alcohol ingerido, xenobióticos y otros productos tóxicos

que inducen un estado de estrés oxidativo, por lo que el hígado requiere de un agente antioxidante que prevenga o reduzca este estrés, ya sea capturando, metabolizando o convirtiendo en agentes menos tóxicos a las EOR (García-Ruiz *et al.*, 1995; Lieber, 2003).

El papel del glutatión, en la detoxificación de metabolitos electrofílicos de xenobióticos ó de especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo redox ha sido bien definido, su forma reducida juega un papel muy importante al reaccionar con el peróxido de hidrógeno y con peróxidos orgánicos (Zentella *et al.*, 1995). Algunas funciones celulares relacionadas con el glutatión son: la síntesis de proteína y ADN, crecimiento y división celular, reacciones de reducción metabólica, síntesis de leucotrienos, regulación de enzimas -SH, resistencia a luz ultravioleta, protección de lente/córnea, conjugación de xenobióticos en hígado, protección celular/antioxidante (Sies, 1999).

El glutatión reacciona rápidamente con el radical hidroxilo, con el producto citotóxico de la reacción de Fenton, con peróxinitrito (N_2O_3), con productos citotóxicos formado en la reacción del óxido nítrico (NO) con el O_2 y el superóxido respectivamente (Briviba *et al.*, 1999). En reacciones catalizadas por varias isoformas de la GSH-Px el glutatión puede participar reduciendo a peróxidos de hidrógeno y peróxidos lipídicos (Urcini *et al.*, 1995) (Fig. 5). Cada una de estas reacciones conduce directamente o indirectamente a la formación de glutatión disulfuro (GSSG), una especie que es reducida intracelularmente por la glutatión reductasa dependiente de $NADPH^+ + H^+$ (Kehrer y Lund, 1994) (Fig. 5).

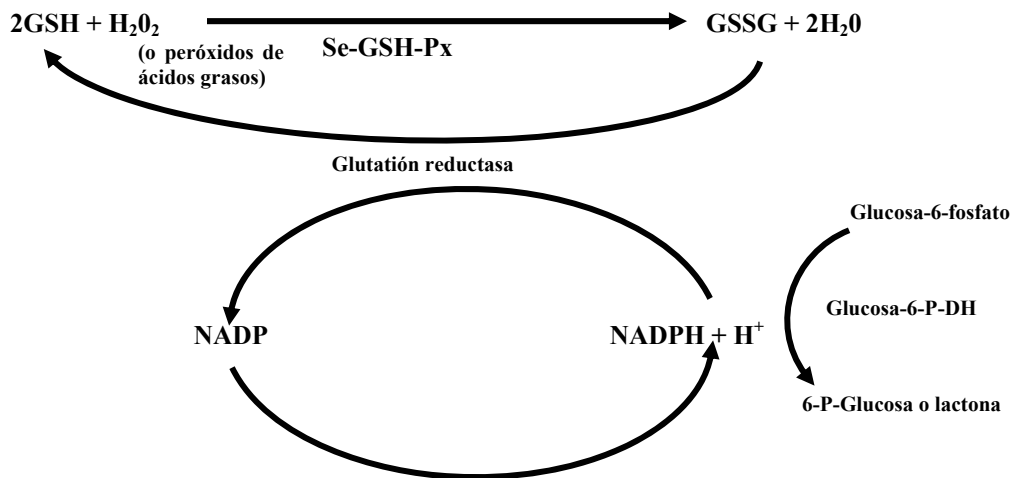


Figura 5. Reacciones en las que intervienen las enzimas glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la glutatión reductasa (GR).

Cuando hay niveles normales de estrés oxidativo la actividad de la glutatión reductasa y la disponibilidad de $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ son suficientes para mantener la relación GSH/GSSG (Akerboom *et al*, 1982). Bajo estas circunstancias no hay pérdida de glutatión por la oxidación. Sin embargo el aumento de estrés oxidativo y otros factores limitan la actividad de la glutatión reductasa, y entonces el glutatión oxidado puede acumularse. Esto tiene dos consecuencias: el estado redox del tiol cambiará activando la respuesta oxidante y transcripción de algunos elemento (Sen y Pecker, 1996), y el glutatión oxidado preferentemente puede ser secretado por la célula y es rápidamente degradado extracelularmente, la pérdida de glutatión oxidado de las células en condiciones de estrés oxidativo celular, incrementa sus requerimientos para la síntesis de glutatión.

Las condiciones nutricionales y los valores de GSH se encuentran estrechamente relacionados, al grado de que las condiciones de ayuno ocasionan una disminución significativa de sus niveles (Lu, 1999).

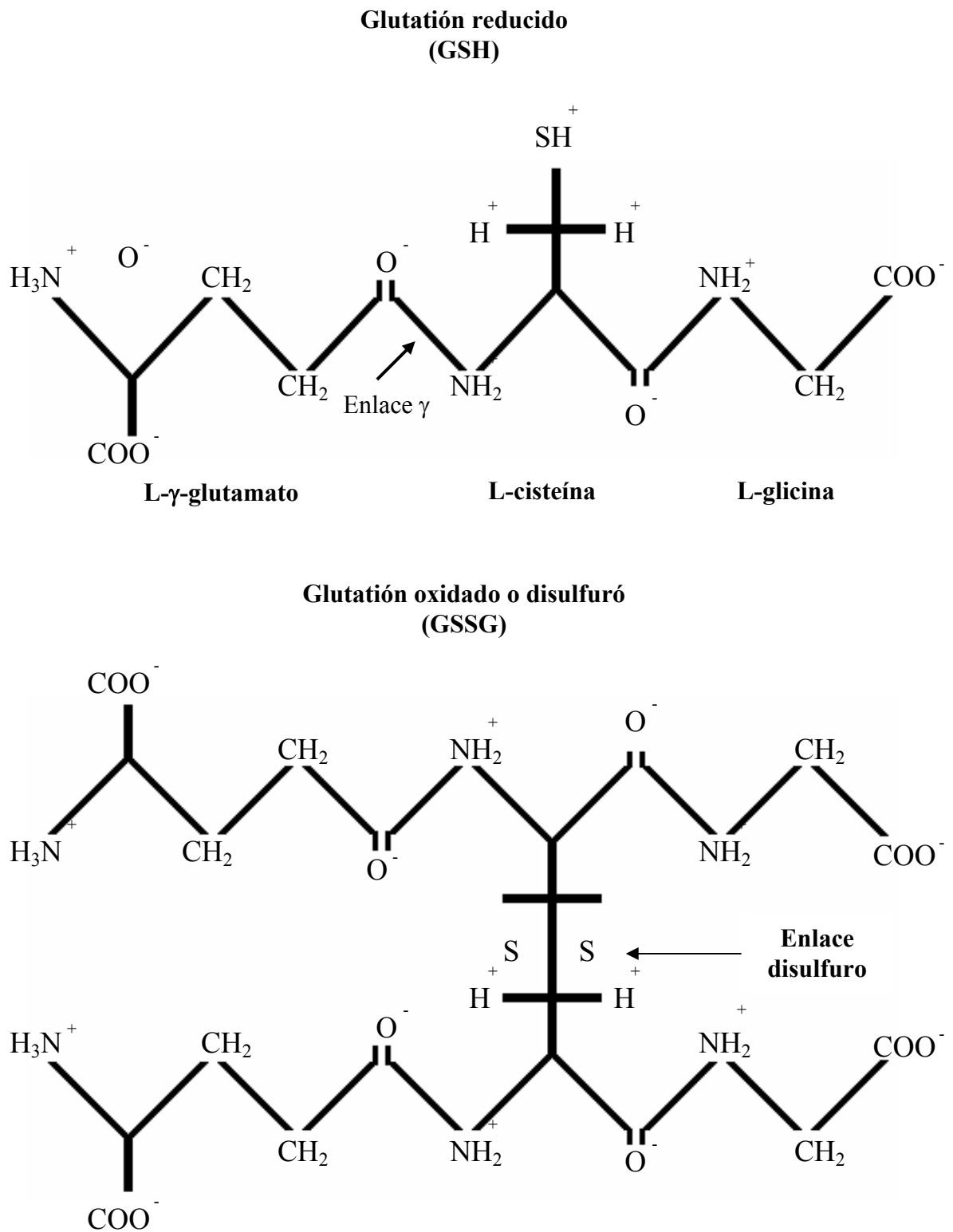


Figura 6. Estructura del glutathión reducido (GSH) y glutathión oxidado (GSSG).

Síntesis de Glutación

El hígado es uno de los órganos con más alto contenido de glutación y único en dos aspectos de síntesis. El primero es que el hepatocito es el único que tiene la capacidad de convertir metionina a cisteína a través de la transulfuración; El segundo es el balance que hay en la taza de exportación al plasma, la bilis y a la mitocondria por distintos sistemas transportadores, estos transportadores mantienen la poza mitocondrial ya que esta no lo puede sintetizar, este transportado puede ser perjudicado en ratas alimentadas con etanol y provocar una caída del glutación mitocondrial (Fernández-Checa *et al*, 1992).

El glutación es sintetizado a partir de aminoácidos precursores en el citosol de prácticamente todas las células (DeLeve y Kaplowitz, 1991; Meister, 1988). Los aminoácidos que constituyen a esta síntesis son L-glutamato, L-cisteina y L-glicina y se requiere de dos ATPs en la reacción (Lu, 1999) (Fig. 7).

El primer paso en la síntesis es limitado y catalizado por la γ -glutamilcisteín sintetasa (GCS), esta enzima se encarga de unir al L-glutamato con L-cisteina a través de un enlace γ que le confiere estabilidad celular y resistencia a la degradación por peptidas intracelulares, por lo que solamente la enzima γ -glutamiltranseptidasa (GGT) que se encuentra localizada en la superficie externa de la membrana celular, puede hidrolizar este enlace (DeLeve and Kaplowitz, 1991). La segunda enzima encargada de unir a la glicina al dipéptido γ -glutamilcisteína es la glutación sintetasa (Lu, 1999) (Fig. 7).

La GGT juega un papel muy importante en el metabolismo del glutación dado que al escindir el residuo γ -glutamilo del GSH (GSSG y de los conjugados de GSH), el γ -glutamil libre es inmediatamente transferido a otro aminoácido externo formándose un aminoácido γ -glutamil y un dipéptido cisteín-glicina (Fig. 7), el aminoácido γ -glutamil es transportado nuevamente al interior de la célula donde es hidrolizada la unión con el aminoácido por la enzima ciclotransferasa para formar

5-oxoprolina (que es la forma cíclica del glutamato), después la enzima 5-oxoprolinasa la convierte nuevamente a glutamato y nuevamente es empleado en la síntesis de GSH (Fig. 7) (Meister, 1988; Lu, 1999). El dipéptido cisteín-glicina es dividido por la cisteinil-glicina dipeptidasa, ambos aminoácidos son nuevamente incorporados al citosol celular, donde la cisteína en su mayoría es incorporada a la síntesis de GSH, otra parte es incorporada a la síntesis de proteínas, dependiendo de las necesidades celulares y otra parte es degradada a sulfato y taurina (Lu, 1999).

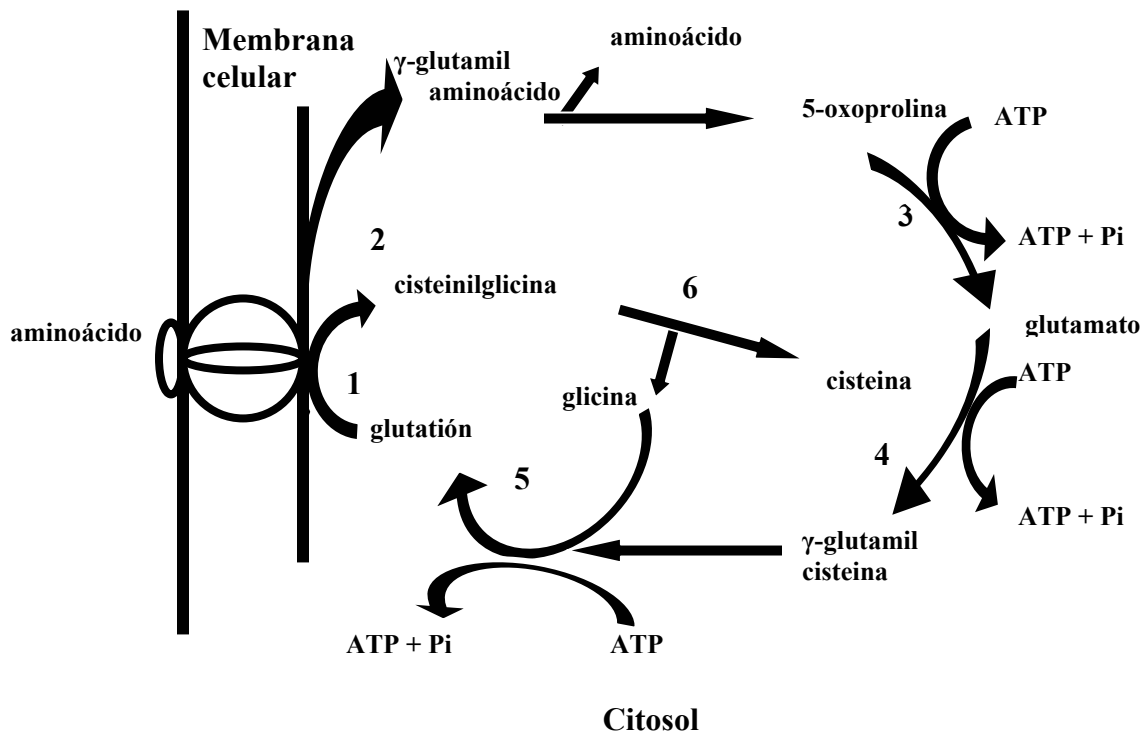


Figura 7. Ciclo de la síntesis del glutatión y las enzimas involucradas : 1) γ -glutamyltranspeptidasa, 2) ciclotransferasa, 3) oxoprolinasa, 4) γ -glutamylcistein sintetasa, 5) glutatión sintetasa, 6) cisteinglicinasa.

Hígado

El hígado es la glándula mas grande del organismo llegando a pesar en un adulto aproximadamente de 1.300 a 1,500 gramos. Está formado de dos lóbulos principales de los cuales el derecho es más grande que el izquierdo (Fig. 8). El color café rojizo de esta glándula se debe a la cápsula de tejido conectivo que lo cubre. Histológicamente está constituido por hepatocitos, células de Kupffer, células endoteliales, células estrelladas y células granulares, las cuales se disponen de una forma particular junto con el sistema arterial y venoso constituyendo el "acino hepático", que representa la unidad estructural y funcional de la fisiología hepática (Martínez, *et al.* 2001).

Al hígado llega la vena portal, la cual transporta los compuestos absorbidos en el intestino y en el estómago, incluyendo las substancias que podrían causar toxicidad. Al hígado también llega la arteria hepática, la cual transporta hasta un 25% del gasto cardiaco y se encarga de oxigenar todos los tejidos del hígado. Del hígado salen vasos linfáticos y dos ductos biliares (uno de cada lóbulo). Los dos ductos biliares se unen entre sí para luego unirse al ducto cístico que sale de la vesícula biliar, entonces forman un solo conducto que viaja hasta el duodeno del intestino delgado, donde descarga la bilis producida (Martínez, *et al.* 2001).

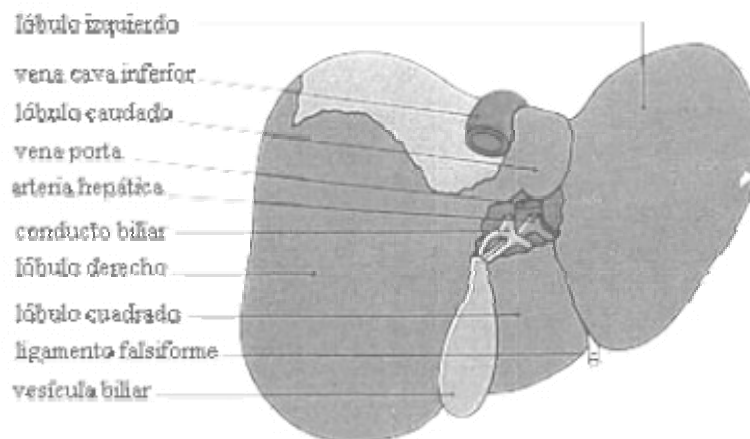


Figura 8. Diagrama del Hígado cara inferior y posterior

La unidad funcional del hígado está formada por tres vasos (la vena portal, la arteria hepática y el ducto biliar) y los hepatocitos que los rodean. Los vasos van del espacio periportal (EP) al área centrolobular (AC). En el EP existe una mayor concentración de oxígeno, por lo que las sustancias que se bioactivan por medio de oxigenación son más peligrosas en esta área. En el AC la concentración de oxígeno es menor y como la concentración de citocromo P-450 es alta, existen las condiciones para que se presenten reacciones de reducción catalizadas por esta enzima (Riveros *et al.*, 1997; Martínez, *et al.* 2001). Las sustancias que se bioactiven en estas condiciones pueden producir daño en esta región. Un ejemplo es el CCl₄ que es tóxico en esta área (Zentella *et al.*, 1997).

El hígado ejecuta un gran número de funciones y entre las más importantes están el almacenamiento y biotransformación de las sustancias que recibe por medio del torrente circulatorio y el sistema portal. Normalmente biotransforma y acumula sustancias útiles en el organismo tales como la glucosa, en forma de glucógeno, aminoácidos, grasas, vitamina A y vitamina B₁₂ (Martínez, *et al.* 2001; Lieber, 2003).

El hígado está muy propenso a sufrir daños por la exposición a tóxicos debido a que los dos sistemas circulatorios pueden llevar hasta al hígado sustancias tóxicas o que se vuelven tóxicas con las transformaciones que tienen lugar en esta glándula. Algunas de las reacciones que sufren los tóxicos en el hígado de hecho los convierten en sustancias menos tóxicas o no tóxicas y más fáciles de excretar, en este caso se dice que el hígado hizo una destoxificación (Martínez, *et al.* 2001; Lieber, 2003; Zentela *et al.*, 1997).

Para realizar sus funciones, el hígado cuenta con una gran cantidad de enzimas con funciones oxidativas y reductivas, entre las cuales se encuentran el sistema del citocromo de la proteína 450 (P-450), flavinmonooxigenasas, peroxidasas, hidroxilasas, esterasas y amidasas. Otras enzimas también presentes son las glucuroniltransferasas, las sulfotransferasas, metilasas, acetiltransferasas, tioltransferasas (Riveros *et al.*, 1997. Martines *et al.*, 2001).

Todas estas enzimas tienen gran importancia en las biotransformaciones de los tóxicos (Lieber, 2003).

Hepatocito.

Es una célula poligonal que posee uno o dos núcleos relativamente grande con un solo nucleólo. Presenta un gran número de finas mitocondrias granulosas de forma oval y con crestas laminares, los perfiles circulares de algunas crestas sugieren que también existen crestas tubulares. Los abundantes gránulos de glucógeno tienen una distribución regular, las superficies laterales de las células tienen un canal de modo que dos células, al alinear su superficie acanalada, forman un conducto diminuto: el canalículo biliar. Muchas células pareadas lateralmente constituyen un canalículo dirigido hacia la periferia del lobulillo. Las células hepáticas en la periferia disminuyen de tamaño hasta adquirir forma de células cuboideas pequeñas que forman los conductillos biliares de la periferia, los canalículos se caracterizan por la presencia de microvellosidades diminutas que sirve para aumentar la superficie de los mismos. La célula hepática tiene gran diversidad morfológica, debido a la presencia de una cantidad muy variable de lípidos, glucógeno y retículo endoplasmático granular (Martínez, *et al.* 2001).

Anti-inflamatorios no esteroideos.

Los AINE's son una serie de compuestos que no presentan una similitud química, pero si comparten acciones terapéuticas y efectos moleculares, tienen tres acciones principales, antipiréticos, anti-inflamatorios y analgésicos, también disminuyen las constricciones bronquiales, musculares y producen irritaciones gastrointestinales (Vane, 1971 y Saldaña *et al*, 1996). En los Estados Unidos los AINE's son los agentes terapéuticos más prescritos ya que representan el 4.5 % del total de prescripciones y los de uso más común son, aspirina, naproxen, ibuprofen, piroxicam, sulindac e indometacina (Bilodeau *et al*, 1995).

Los AINE's actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, las prostaciclina, y los tromboxanos (Vane, 1971). En general es aceptado que los AINE's inhiben la actividad de las cicloxigenasas, la COX-1 constitutiva y la COX-2 inducible (Frolich, 1997). Otros tienen acción dual e inhiben también la actividad de la lipoxigenasa y con ello impiden la formación de leucotrienos (Brogden *et al*, 1984).

Los efectos de los AINE's resultan también de sus propiedades fisicoquímicas que probablemente impiden la interacción de proteína-proteína en muchos tipos de membranas biológicas, ya que la mayoría son moléculas planas, sin carga, que pueden estar en ambientes lipídicos como las bicapas de las membranas plasmáticas (Abramson y Weissmann, 1989).

Se piensa que los AINE's tienen mecanismos de acción como secuestradores de RL (Zentella, 1994). Los compuestos químicos precursores del ácido acetil salicílico, además de interferir en la síntesis de prostaglandinas, han resultado ser atrapadores de RL del oxígeno. Un ejemplo de esto es el ácido benzoico, relacionado estructuralmente con el salicilato, que es un derivado descarboxilado e hidroxilado por el radical OH[·] (Sagone *et al*, 1987). Se ha demostrado que en animales íntegros el contenido de glutatión total (GT) en

presencia de una administración aguda de etanol sufre una disminución, pero al aplicar piroxicam se revierte la disminución de GSH hepático (Zentella *et al*, 1994a).

Esto sugiere que los AINE's podrían actuar de manera similar reaccionado rápidamente con los RL (Zentella, 2002), por ello es de gran importancia para este trabajo evaluar los efectos de una intoxicación aguda inducida con etanol, tanto en la reserva antioxidante como en la estructura proteica de hepatocitos aislados e incubados en presencia de etanol y AINE's.

ASPIRINA, C₉H₈O₄

La aspirina (ácido acetil salicílico) es un compuesto anti-inflamatorio no esteroideo. En 1971 Vane y colaboradores demostraron que concentraciones bajas de aspirina inhibían la producción enzimática de prostaglandinas, además de esta acción pueden ser analgésicos y antipiréticos, es el agente de este tipo más prescrito y un estándar en comparación con otros anti-inflamatorios y analgésicos.

La aspirina ingerida se absorbe principalmente como tal, pero cierta cantidad entra como ácido salicílico en la circulación sistémica a causa de la hidrólisis por esterasas en la mucosa gastrointestinal y en el hígado. La aspirina puede detectarse en el plasma solamente por corto tiempo debido a la hidrólisis plasmática, hepática y eritrocitaria; por ejemplo, 30 minutos después de una dosis de 0.65 g solamente el 27% del salicilato plasmático se encuentra en la forma acetilada. La vida media plasmática de la aspirina es de alrededor de 15 minutos pero puede modificarse dependiendo de la dosis, La del salicilato es de 2 a 3 horas en bajas dosis y en las dosis anti-inflamatorias usuales de cerca de 12 horas (Zentella, 2002).

PIROXICAM. $C_{15}H_{13}N_3O_4S$

Es un anti-inflamatorio no esteroide (AINE) que su acción aún no está plenamente aclarada, se ha demostrado que bloquea la síntesis de prostaglandinas por inhibición de la enzima ciclooxigenasa; inhibe la migración de polimorfonucleares y monocitos a las zonas inflamadas, disminuye la producción del factor reumatoide seropositivo (Abramson y Weissmann, 1989). Actúa disminuyendo la hipercontractilidad del miometrio y es eficaz en el tratamiento de la dismenorrea primaria. Se absorbe bien por la vía oral o rectal. La vida plasmática es de alrededor de 50 horas y las concentraciones plasmáticas se mantienen con una administración única al día; con dosis de 10 mg y 20 mg alcanza el máximo de 3 a 5 horas después de la administración. Por vía intramuscular (I. M) las concentraciones plasmáticas son más altas que por vía oral. Se metaboliza ampliamente, excretándose sin modificaciones por la orina y heces menos del 5% de la dosis diaria (Abramson y Weissmann, 1989; Zentella, 2002)

MELOXICAM. $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$

Meloxicam es una enolcarboxamida. El meloxicam es un inhibidor de COX-2 con una selectividad 75 veces superior para COX-2 comparado con COX-1 en enzimas humanas recombinantes. El acceso intracelular efectivo está determinado por sus singulares propiedades lipofílicas y anfifílicas. La baja hidrosolubilidad de meloxicam a un pH ácido y su comportamiento de protonación anfifílica son responsables de la cinética tisular que evita una elevada concentración de la sustancia en ciertos tejidos (Hecken *et al*, (2000).

El meloxicam tiene una vida media de alrededor de 20 horas. Es absorbido completamente después de la administración oral con una biodisponibilidad absoluta de 89-93%. La fijación de meloxicam a proteínas plasmáticas es superior al 99%, lo que explica el volumen relativamente pequeño de distribución. En

líquido sinovial alcanza aproximadamente 40-50% de las concentraciones plasmáticas totales acompañantes. Las concentraciones farmacológicas libres en líquido sinovial son similares a las concentraciones plasmáticas libres (Hecken *et al*, (2000).

ANTECEDENTES

Existen datos experimentales que indican que los mecanismos de daño tisular mediados por la presencia de los RL, contribuyen al establecimiento de enfermedades como son la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la diabetes, la porfiria, el cáncer y el daño hepático (Zentella, 1994b). Esta bien documentado que una intoxicación aguda de etanol causa un estado de estrés oxidativo en hígado (Zentella *et al*, 1997). El exceso de RL también aumenta la degradación peroxidativa de los lípidos (lipoperoxidación), que parece ser el mecanismo más importante relacionado con el daño celular durante el consumo exagerado o crónico de bebidas alcohólicas (Di Luzio, 1966).

Las evidencias experimentales permiten apuntar hacia la generación de RL como iniciadores de la degradación peroxidativa de los ácidos grasos insaturados estructurales de las membranas celulares. Numerosos trabajos han planteado el empleo de sustancias atrapadoras de RL o bien de sustancias capaces de aumentar las defensas antioxidantes de las células para contrarrestar el daño producido por RL (Zentella, 1994). Tanto el glutatión GSH como el GSSG se encuentran involucrados en el mecanismo de protección de los efectos del metabolismo del etanol, y como consecuencia un mayor consumo de GSH en hígado (Videla *et al*, 1980). El GT es la suma de GSH y GSSG se emplea como indicador de la reserva antioxidante tisular, que se abate en sangre conforme el daño hepático es más severo. (Zentella *et al*, 1995).

Zentella *et al*, 1993 en estudios con animales íntegros han encontrado que AINE's como aspirina, naproxen, nimesulide, dipirona y piroxicam pueden prevenir la lipoperoxidación hepática y, por lo tanto, el estrés oxidativo promovido por la intoxicación aguda de etanol; este mismo grupo en 1994 reportó que en ratas con una intoxicación aguda de etanol, incrementa el contenido de triacilgliceroles, malondialdehido, GSSG y disminuye el GSH, pero al administrar simultáneamente piroxicam, la oxidación del glutatión y los efectos anteriores en homogenados de

hígado se inhiben y, la concentración de etanol en sangre también disminuye (Zentella *et al*, 1992).

El acetaldehído proveniente del metabolismo del etanol, reacciona con el glutatión en forma no enzimática. Así mismo al administrar a un grupo de ratas por vía orogástrica acetaldehído (que es el principal metabolito del etanol), se induce una reducción de los niveles de GT en hígado (Videla *et al*, 1986).

Por otra parte al administrar tetracloruro de carbono (CCl₄), cuya acción hepatotóxica involucra severas alteraciones bioquímicas incluyendo la generación de RL y el aumento de la lipoperoxidación, pero en presencia de piroxicam los efectos son revertidos ya que los autores reportan que puede inhibir la producción de radicales O₂⁻ (Zentella *et al*, 1997). Así mismo Zentella y Saldaña, en 1996 señalan que el AINE piroxicam en hepatocitos aislados disminuye el contenido de RL producidos por el etanol.

De acuerdo con la información anterior en la que se destaca que el etanol aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno y en consecuencia cambios en los indicadores de estrés oxidativo, como triacilgliceroles (TAG's), sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (SRATB) *in vivo* e *in vitro* y glutatión (GSH) *in vivo*, estos cambios pueden ser revertidos por algunos AINE's ya mencionados, por ello es de interés estudiar el efecto que causa una intoxicación aguda de etanol y los AINE's aspirina, piroxicam, meloxicam en la poza hepática de glutatión en un modelo *in vitro* que nos permitirá incursionar en el mecanismo celular de respuesta del hepatocito.

También hay que resaltar que la mayoría de los autores reportan al glutatión reducido (GSH) y al glutatión total (GT) en una poza citosólica y otra mitocondrial o simplemente como glutatión hepático, en este trabajo se reporta al glutatión como GT intracelular y GT extracelular (Matuz, 2005), de esta forma se reflejan de una manera más dinámica los niveles de glutatión total.

HIPÓTESIS

Los AINE's contrarrestan la disminución del contenido de glutatión total extracelular e intracelular en hepatocitos aislados, durante una intoxicación aguda con etanol.

OBJETIVOS.

Objetivo General

Determinar el efecto de los AINE´s Aspirina, Piroxicam y Meloxicam sobre el contenido de glutatión total extracelular e intracelular en hepatocitos aislados, durante una intoxicación aguda con etanol.

Objetivos Particulares

- Determinar la concentración de glutatión total extracelular e intracelular en hepatocitos aislados, después de haber sido tratados con etanol.
- Determinar si los AINE´s, Aspirina, Piroxicam y Meloxicam pueden modificar los efectos producidos en la concentración de glutatión total extracelular e intracelular en hepatocitos aislados, después de haber sido tratados con etanol.
- Determinar la poza de glutatión total tanto intracelular como extracelular en cada una de las condiciones experimentales anteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 220 g de peso corporal. Se mantuvieron dos animales por jaula con cama de pino (Harlan Sani-Chips) estéril, las ratas estuvieron aisladas y la temperatura se mantuvo en un rango de 22 a 26 ° C durante 48 h con acceso libre al alimento (Harlan con 18% de proteína) consumieron agua *ad libitum*.

Aislamiento de hepatocitos: Pasadas las 48 h las ratas fueron anestesiadas con éter de etilo anhídrido. Posteriormente se aislaron los hepatocitos a partir del hígado perfundido *in situ* a través de la vena porta con una solución de Ringer-Krebs-bicarbonato, sin glucosa, con un pH de 7.4, conteniendo 0.1 % de Colágenasa Tipo IV (SIGMA). La suspensión celular se saturó con 95 % de O₂ y 5 % de CO.

Viabilidad celular: La viabilidad de los hepatocitos se determino por exclusión con azul de tripán, y por la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) la cual se determino de acuerdo al método de Bergmeyer et al, (1965).

Tratamientos: Posteriormente 5X10⁵ células (hepatocitos) se incubaron en matraces de plástico de fondo plano Nalgene a 37° C en 1 ml de solución Ringer-Krebs-bicarbonato, y etanol a diferentes concentraciones (25 mM, 50 mM y 100 mM), para así poder establecer la concentración adecuada para nuestro modelo experimental; establecido esto, los hepatocitos se incubaron en presencia o ausencia de los siguientes compuestos: (Cuadro 3).

Después de ser incubados, los hepatocitos se separaron del medio extracelular, se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf refrigerada mod. 5417R 1 minuto a 1,000 rpm a 4 ° C, se tomaron 500 µl del sobrenadante y se les adicionaron 500 µl de una solución (fría) de HClO₄ 4 M; al paquete celular (pastilla) se le agregaron 500 µl de una solución de HClO₄ 2 M (frío). Tanto los

sobrenadantes como a las pastillas se centrifugaron 5 minutos a 10,000 rpm a 4 ° C. Después se tomaron 500 µl de sobrenadante de ambas muestras los cuales se mantuvieron en hielo, e inmediatamente se realizó la determinación de glutatión total (GT) en el extracelular (sobrenadante) e intracelular (pastilla).

Cuadro 3. Tratamientos						
Hepatocitos (5x10 ⁵ células) en 1 ml	+	Ringer-Krebs-bicarbonato	+	-----	+	-----
				Etanol 50 mM		-----
				Glucosa 10 mM		-----
				Etanol 50 mM		ASA 1X10 ⁻⁶ M
				ASA 1X10 ⁻⁶ M		-----
				Etanol 50 mM		PIR 1X10 ⁻⁶ M
				PIR 1X10 ⁻⁶ M		-----
				Etanol 50 mM		MEL 1X10 ⁻⁶ M
				MEL 1X10 ⁻⁶ M		-----
Todos los tratamientos se ajustaron a un volumen final de 1 mL						

Determinación de glutatión total (GT). El glutatión total se cuantificó por el método de Akerboom y Sies, 1981. En una cubeta de cuarzo se colocó 1 ml de buffer de fosfatos 0.1 M a un pH 7, más 0.01 ml de la muestra, se agitó y se agregó 0.05 ml NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) diluido en una solución de bicarbonato (2 mg/0.5 ml NaHCO₃ al 0.5%), se agitó y se agregó 0.02 ml de DTNB (5, 5'-dithi-bis ácido 2-nitrobenzoico) diluido en una solución de bicarbonato (1.5 mg/ml NaHCO₃ al 0.5%), se agitó y se agregó 0.03 ml de la enzima glutatión reductasa (ROCHE) (10 µl/90 µl buffer), se agitó y se leyó a 412 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640, los cálculos se realizaron tomando como referencia una curva estándar de GSSG de SIGMA.

Los resultados se analizaron usando pruebas estadísticas no paramétricas, para lo cual se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), otra prueba empleada fue la t de Student (Jandel Scientific, 1994)

RESULTADOS

Efecto del etanol sobre el contenido de GT extracelular e intracelular en hepatocitos aislados.

Se realizó una curva dosis respuesta con hepatocitos aislados de ratas, los cuales se incubaron a 37 ° C en presencia de etanol a las siguientes concentraciones, 25 mM, 50mM y 100 mM. Esto se hizo con el fin de conocer como se comportan los niveles de glutatión total (GT), y así seleccionar la concentración que *in vitro* modifica de forma significativa los niveles de GT .

En la figura 9 podemos observar que conforme aumenta la concentración de etanol, disminuye el porcentaje de GT intracelular, este decaimiento es mas evidente y estadísticamente significativo a 50 mM y 100 mM de etanol. También observamos en la figura 10, que en el medio extracelular el etanol causo un decaimiento significativo a partir de la concentración 50 mM, esto concuerda con lo reportado por Matuz en el 2005.

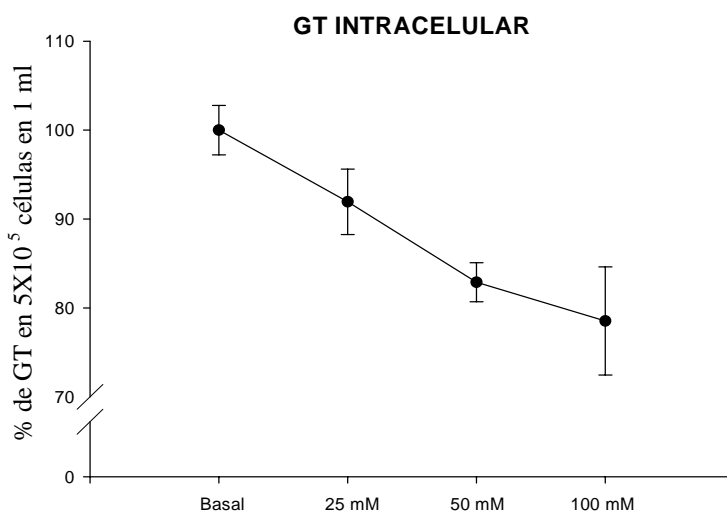


Figura 9. Porcentaje de GT intracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C con etanol. El 100% representa 406.92 nmolas de GT en 5X10⁵ células en 1 ml. Cada valor representa la media ± Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol 50 mM p= 0.008; Basal vs etanol 100 mM p= 0.03.

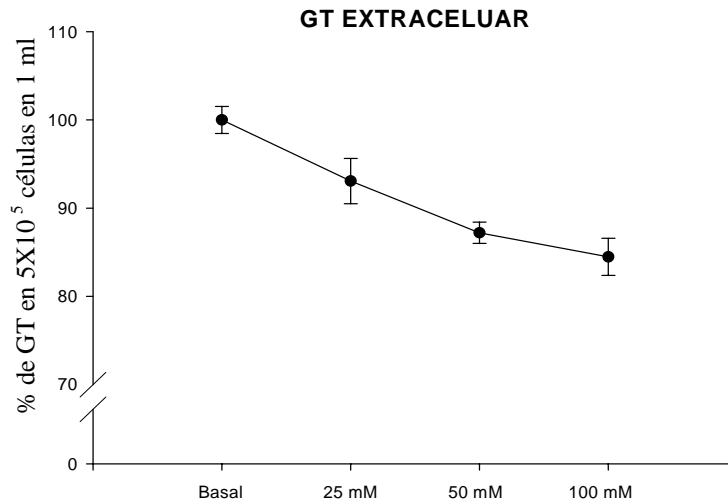


Figura 10. Porcentaje de GT extracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C con etanol. El 100% representa 1539.76 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol 50 mM $p < 0.002$; Basal vs etanol 100 mM $p < 0.004$.

También al comparar el contenido de GT que se encontró en el medio intracelular con el extracelular, se observa (figura 11) que hay un mayor porcentaje de GT en el medio extracelular 80 %, en comparación con el intracelular 20 %, esta relación se mantiene constante en cada uno de los tratamientos.

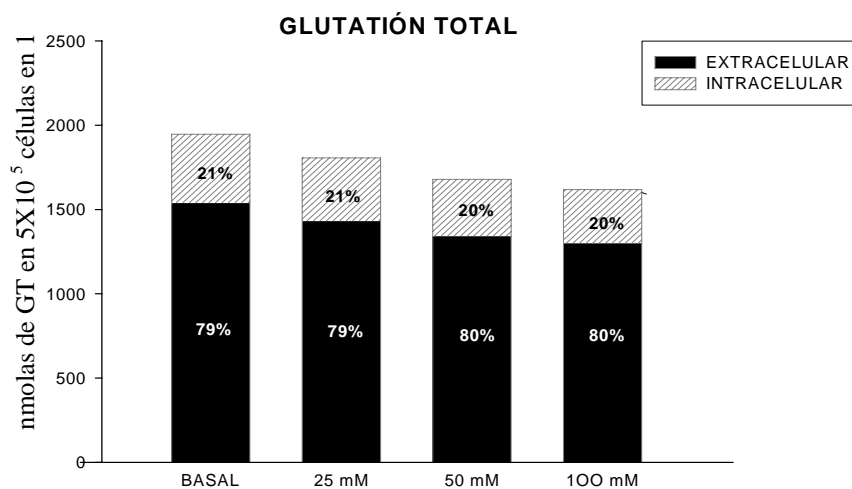


Figura 11. Contenido de GT extracelular e intracelular en porcentaje, en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C con etanol (25 mM, 50 mM, 100 mM). En todos los casos se observa un mayor porcentaje en el medio extracelular.

Efecto de la glucosa sobre el contenido de GT extracelular e intracelular en hepatocitos aislados.

Una vez establecida la concentración de etanol (50 mM), que modifica significativamente los niveles de GT, fue necesario evidenciar que era el etanol quien realmente causó este decaimiento y no las calorías vacías que aporta este. Así, se incubaron hepatocitos aislados de ratas en presencia de glucosa 10 mM que aporta las calorías que aporta el etanol 50 mM. En la figura 12, mostramos que no hay diferencias estadísticas entre el tratamiento con glucosa comparándolo en la condición basal, por lo tanto las calorías que aporta el etanol así como las de la glucosa no están involucradas en el decaimiento del GT, que se observa claramente ya que, por el contrario encontramos diferencias significativas en el porcentaje de GT contenido en el intracelular y extracelular cuando los hepatocitos se incubaron en presencia de etanol 50 mM (Figuras 12 y 13).

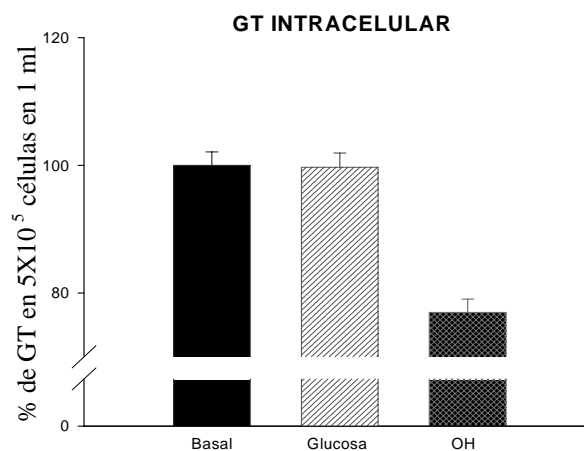


Figura 12. Porcentaje de GT intracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 362.65 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol 50 mM p= 0.0001; Glucosa vs etanol 100 mM p= 0.0001.

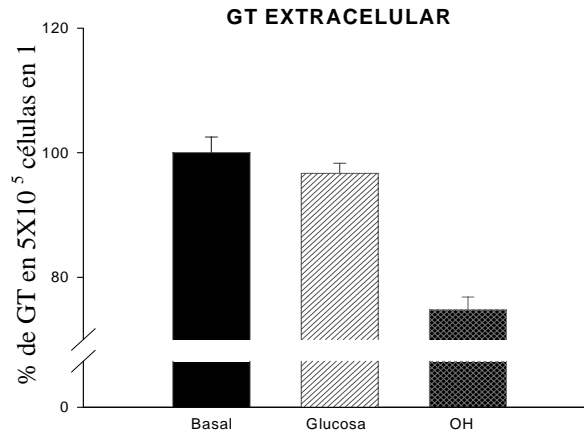


Figura 13. Porcentaje de GT extracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 1175.35 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol 50 mM p= 0.0001 Glucosa vs etanol 100 mM p= 0.0001.

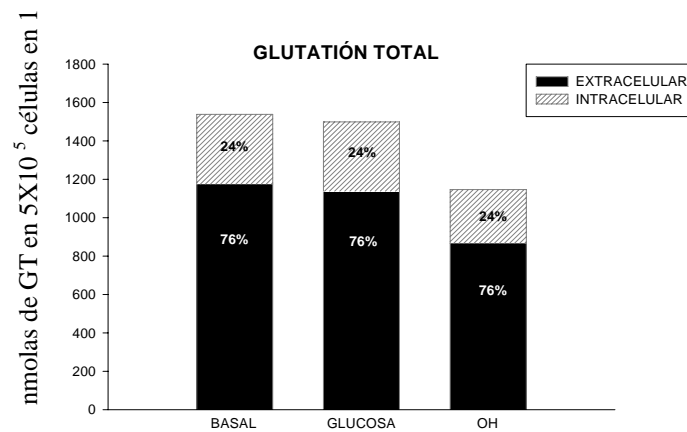


Figura 14. Contenido de GT extracelular e intracelular en porcentaje, en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. En todos los casos se observa un mayor porcentaje en el medio extracelular.

Al comparar el porcentaje del contenido de GT extracelular e intracelular se encontró que la proporción se mantiene, hay una mayor cantidad de GT en el medio extracelular 76 % en comparación con el medio intracelular 24 % (Figura 14).

Efecto de la aspirina (ASA) sobre la disminución en el contenido de GT causada por etanol.

Una vez establecida la concentración 50 mM de etanol para nuestro modelo experimental, se decidió emplear algunos de los AINE's más prescritos ya que en la literatura internacional se ha reportado que modifican los efectos que causa el etanol, tal como se analiza en la discusión.

En las figuras 15 y 16 se muestra que en hepatocitos aislados de ratas alimentadas, después de ser incubados en presencia de aspirina (ASA) y etanol simultáneamente a 37 ° C durante 1 h, no se presentan diferencias significativas en comparación con los valores basales, también encontramos que al adicionar el antiinflamatorio no esteroideo, por si solo no modifica la cantidad de GT tanto en el medio intracelular como en el extracelular. Sin embargo cabe señalar que todos los tratamientos en comparación con el tratamiento que se incubó con etanol, muestran diferencias significativas como se muestra en las figuras 15 y 16.

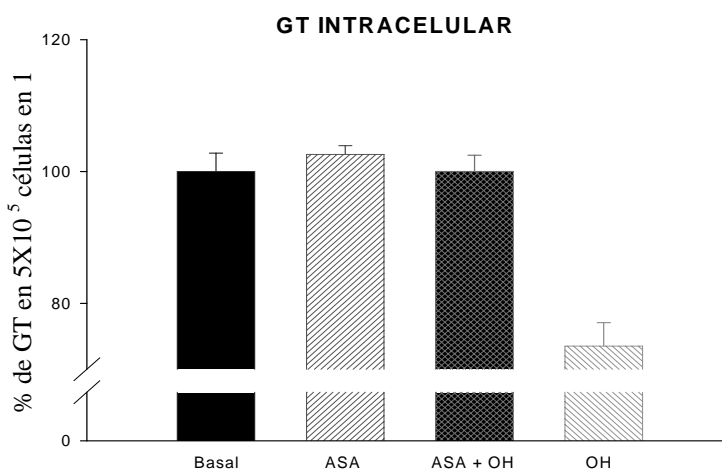


Figura 15. Porcentaje de GT intracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 342.84 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol p= 0.004; ASA vs etanol p= 0.001; ASA + etanol vs etanol p= 0.003.

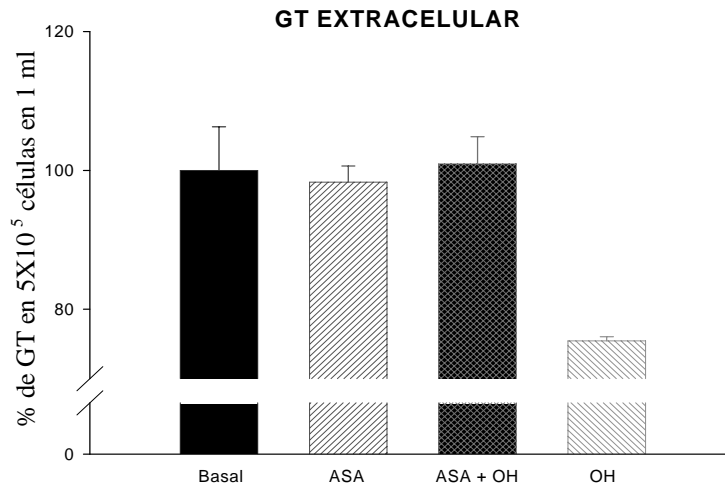


Figura 16. Porcentaje de GT extracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 1138.85 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol p= 0.002; ASA vs etanol p= 0.0007; ASA + etanol vs etanol p= 0.003.

La relación que hay en el contenido de GT en el intracelular 24 % y el extracelular 76 % se mantienen en todos los casos (Figura 17).

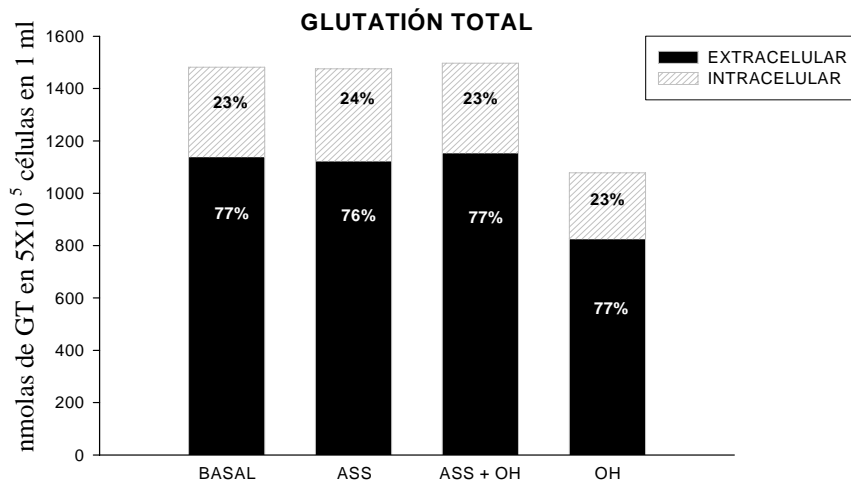


Figura 17. Contenido de GT extracelular e intracelular en porcentaje, en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. En todos los casos se observa un mayor porcentaje en el medio extracelular.

Efecto del piroxicam (PIR) sobre la disminución en el contenido de GT causada por etanol.

En los experimentos realizados con hepatocitos aislados que se incubaron en presencia de piroxicam y etanol simultáneamente no presentaron diferencias significativas en comparación con el tratamiento basal, de la misma forma ocurre cuando se incubó únicamente en presencia de piroxicam. Pero cuando se les comparo a estos tratamientos con el tratamiento que se incubó con etanol, se encontró que difieren significativamente, principalmente en el medio intracelular (Figura 18), ya que con piroxicam en el medio extracelular no presentó diferencias estadísticas significativas al compararlo con el tratamiento que se incubó con etanol (Figura 19).

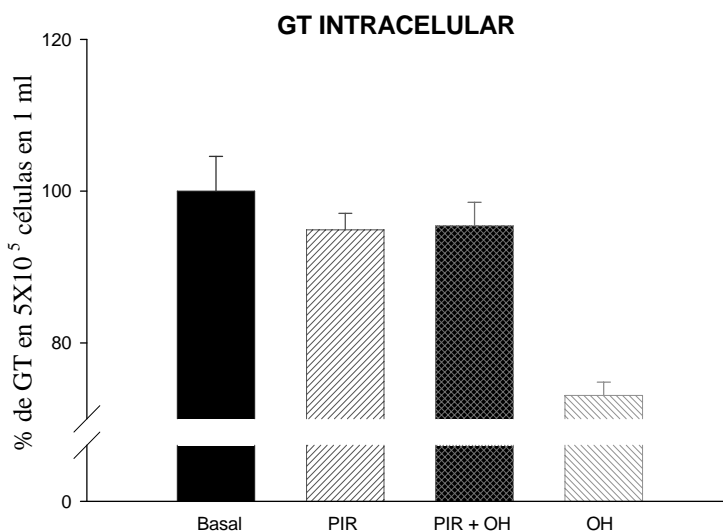


Figura 18. Porcentaje de GT intracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 391.78 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol p= 0.005; PIR vs etanol p= 0.001; PIR + etanol vs etanol p= 0.003.

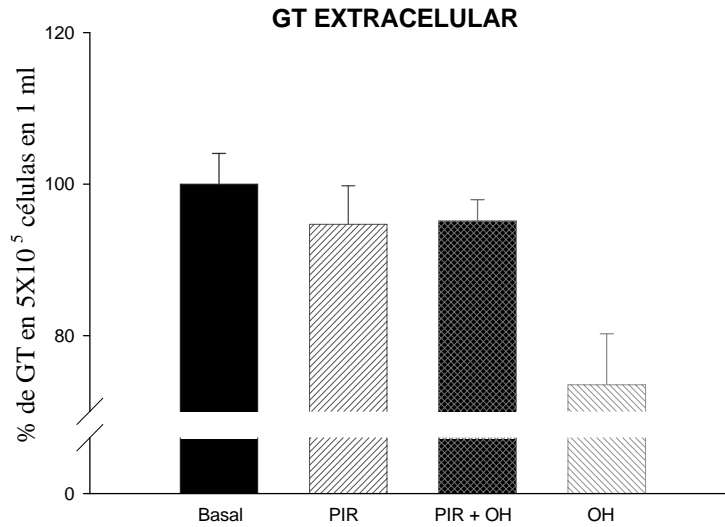


Figura 19. Porcentaje de GT extracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 1251.92 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol p= 0.02; PIR + etanol vs etanol p= 0.04.

En la figura 20 se muestra que el contenido de GT en el medio intracelular 24 % se mantiene constante al igual que en el medio extracelular 76 % siendo siempre mas abundante en este (Figura 20).

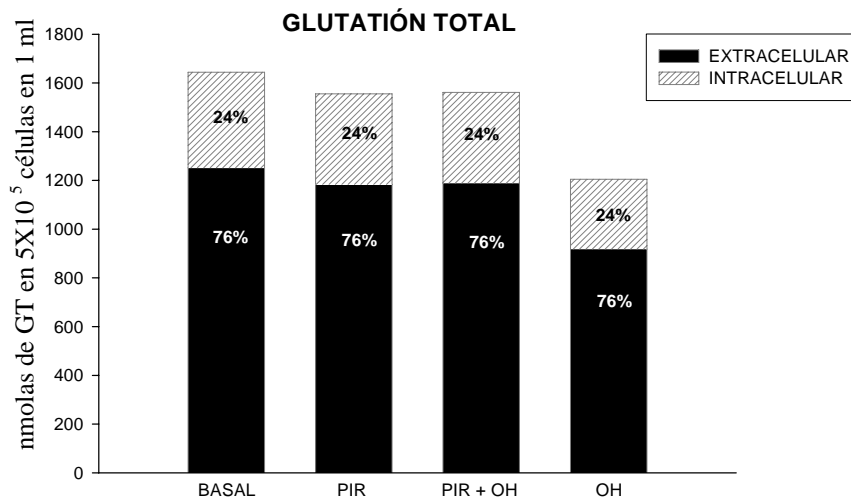


Figura 20. Contenido de GT extracelular e intracelular en porcentaje, en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. En todos los casos se observa un mayor porcentaje en el medio extracelular.

Efecto del meloxicam (MEL) sobre la disminución en el contenido de GT causada por etanol.

También se demostró que el anti-inflamatorio meloxicam que es un inhibidor selectivo de la COX-2 al ser incubado durante 1 h en presencia de etanol, revierte el decaimiento que causa el etanol en el contenido de GT, ya que al hacer el análisis estadístico no se observaron diferencias cuando lo comparamos con el contenido de GT basal, y esto mismo ocurre cuando incubamos hepatocitos solamente en presencia de meloxicam tanto en el medio intracelular como en el extracelular. Al comparar los tratamientos anteriores con el tratamiento que se incubó en presencia de etanol mostraron diferencias estadísticas significativas (Figuras 21 y 22).

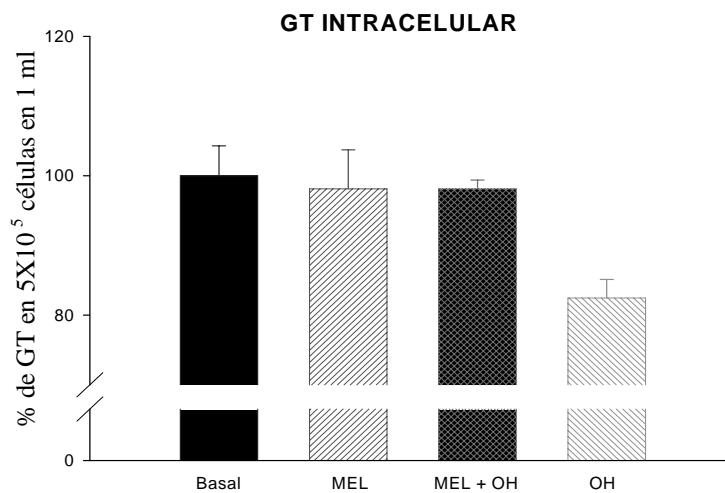


Figura 21. Porcentaje de GT intracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 355.66 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol p= 0.01; MEL vs etanol p= 0.04; MEL + etanol vs etanol p= 0.001.

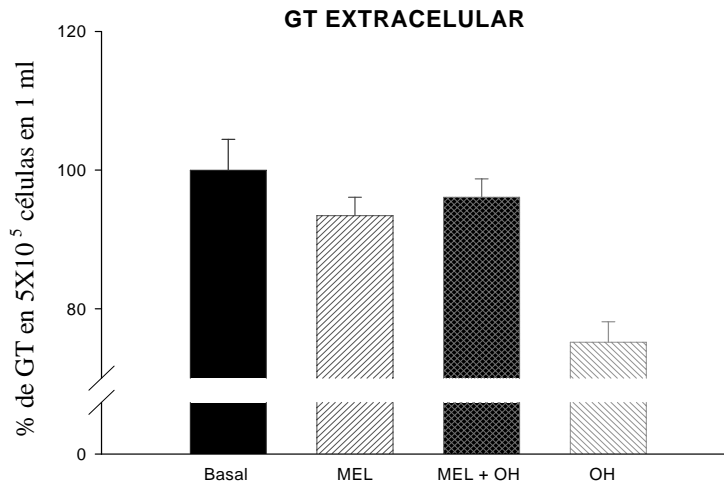


Figura 22. Porcentaje de GT extracelular en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. El 100% representa 1145.24 nmolas de GT en 5×10^5 células en 1 ml. Cada valor representa la media \pm Error Estándar (EE) n = 3. Análisis estadístico: Basal vs etanol p= 0.003; MEL vs etanol p= 0.003; MEL + etanol vs etanol p= 0.001.

Al comparar el porcentaje del contenido de GT en el medio intracelular 24 % con el medio extracelular encontramos que el porcentaje es mayor en el extracelular y que en cada uno de los tratamientos se mantiene constante la proporción del GT (Figura 23). También hay que enfatizar en que el hepatocito exporta glutatión al medio y esto se ve reflejado en la cantidad de GT extracelular que se encuentra.

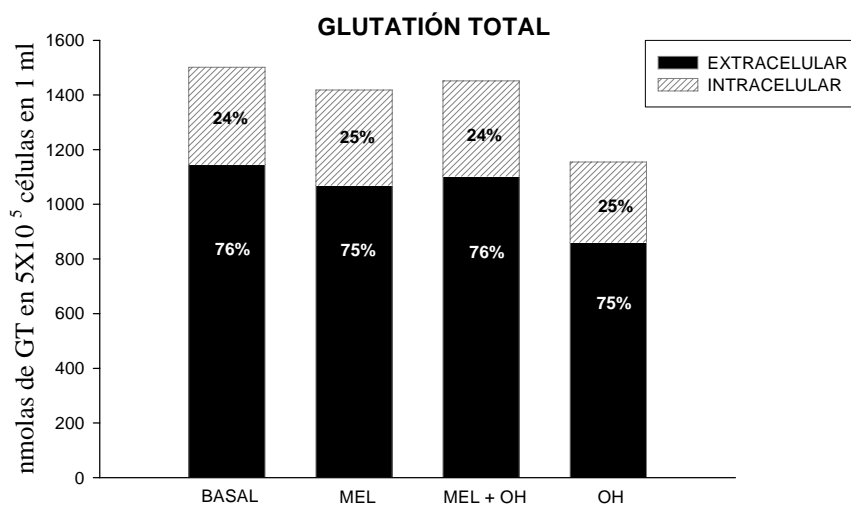


Figura 23. Contenido de GT extracelular e intracelular en porcentaje, en hepatocitos aislados (ratas alimentadas) incubados 1 h a 37 ° C. En todos los casos se observa un mayor porcentaje en el medio extracelular.

Determinación de viabilidad celular.

Una vez que se aislaron los hepatocitos de ratas alimentadas se determinó la viabilidad por medio de exclusión de Azul de Tripán. También determinamos la viabilidad mediante la actividad de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) y se observó después de aislar las células, después de ser incubado a 37 ° C durante 1 h en presencia y ausencia de etanol (Cuadro 4). Hay que tomar en cuenta que para determinar la actividad de la enzima se tomo como el 100 % de la actividad a hepatocitos que fueron lisados con Triton X-100 al 20 %. Es de gran importancia en nuestro modelo que las condiciones experimentales no modifiquen la viabilidad y en consecuencia el contenido de GT ya que se determinó GT intracelular y extracelular.

Cuadro 4. Determinación de viabilidad celular

Hepatocitos	% de viabilidad (azul de tripán)	% de actividad (LDH)
Aislados	85 %	5 %
Incubados 1 hora a 37 ° C	85 %	10 %
Incubados ^c / etanol 1 hora a 37 ° C	85 %	10 %

Exclusión de Azul de Tripán n = 13 y actividad de Lactato Deshidrogenasa n = 6 en hepatocitos aislados, de acuerdo a Bergmeyer et al, (1965).

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Numerosos trabajos han reportado los efectos que causa el etanol en el hígado. En este trabajo nos enfocamos a estudiar los efectos que causa el etanol sobre el contenido de glutatión total. Dado el papel que desempeña el hígado y sobre todo el GT, por la amplia gama de funciones que este tiol desempeña en la célula resulta de interés el contar con un modelo *in vitro* que permita caracterizar la capacidad del hepatocito para responder al etanol y a los AINE's y modificar la distribución del GT celular. La estructura de este modelo es de gran importancia, ya que los resultados pueden ser controversiales y dependientes de todas las variables que puedan ser modificadas como lo reporta Matuz en el 2005.

Algunas de las variables que se destacan al analizar los modelos experimentales que manejan en la literatura internacional son: para un modelo *in vivo* (tipo de animal, sexo, edad, peso, alimentación, tipo de alimentación, ayuno, temperatura y condiciones ambientales a las que está sometido el animal; para un modelo *in vitro* (tipo celular, aisladas o de cultivos celulares, número de células por volumen, tiempo de incubación, temperatura y medio de incubación; para un modelo de intoxicación (crónico, agudo, concentración de etanol, dosis, tiempo de administración o incubación, tipo de administración en animales: orogástrica, intravenosa, intraperitoneal). Como podemos observar son muchas las variables que debemos de considerar al plantear un modelo experimental de este tipo, a continuación compararemos algunos trabajos tratando de relacionarlos en algunas de estas variables.

En modelos experimentales en que los animales fueron intoxicados crónicamente con etanol por un lapso de 6 a 8 semanas, y posteriormente aislar hepatocitos de estos animales e incubarlos con etanol 50 mM durante 4 h, reportan que los niveles de GSH disminuyen en un 30 % en el citosol y hasta en un 63 % en la mitocondria (Fernández-Checa et al, 1987-1991). Por el contrario, Héту y colaboradores (1982) y Porta (1997) reportaron que en animal íntegro

después de ser intoxicado con etanol durante 3 semanas, el contenido de GSH hepático aumenta significativamente, de igual forma Bondy y Guo (1994) encontraron que en ratas con una intoxicación crónica de etanol los niveles de GSH aumentaron significativamente, pero con una intoxicación aguda estos niveles decrecen después de 2 y 18 h de ser intoxicadas, esto coincide con lo reportado en ratones por Macdonald (1977), posteriormente Bernhard que observó lo mismo en ratas después de 7 h de ser intoxicadas con una dosis de 5g/kg de etanol, lo mismo hicieron Zentella en 1994 y Choi en el 2001 que demostraron que en sus modelos ocurre un decaimiento de los niveles de glutatión. En la actualidad se ha demostrado que este decaimiento de los niveles de glutatión también ocurre en modelos *in vitro* (Viña *et al*, 1980; Fernández-Checa *et al*, 1987; Matuz, 2005).

También es necesario al analizar los resultados y compararlos con otros trabajos previamente reportados considerar la técnica que se usó para medir el contenido de glutatión, el manejo de la muestra tomando en cuenta los siguientes criterios: evitar la oxidación del glutatión durante la manipulación de la muestra, precipitar las proteínas lo mas rápido posible, una extracción completa de glutatión total, para estos tres criterios usamos ácido perclórico y mantuvimos la muestra a una temperatura de 4 ° C. En este trabajo tomamos todas estas precauciones y también consideramos que los niveles de glutatión son dependientes del ambiente y del estado físico del animal. Entonces considerando esto, incluimos en cada uno de nuestros lotes de animales a un grupo que consideramos como los valores de glutatión basal y con base en estos valores comparamos los resultados.

Al analizar los resultados obtenidos encontramos y corroboramos que al incubar hepatocitos aislados en presencia de etanol 50 mM los niveles de glutatión disminuyen significativamente como lo reportan otros autores (Viña *et al*, 1980; Fernández-Checa *et al*, 1987; Matuz, 2005). El glutatión se gasta atrapando las especies reactivas del oxígeno y los radicales libres que se forman en el metabolismo del etanol en el hepatocito (Zentella *et al*, 1994), esto lo hace a

través de su grupo sulfhídrido donando electrones, uniéndose a proteínas y conjugándose con productos de este metabolismo propiamente dicho.

Zentella y colaboradores reportan que en ratas wistar con una intoxicación aguda (5g/kg) de etanol, los niveles de glutatión disminuyen significativamente pero al aplicar simultáneamente piroxicam este efecto no se presenta (Zentella *et al*, 1994). Basados en este antecedente y en que las especies reactivas del oxígeno y radicales libres producidos en una intoxicación aguda de etanol causan un aumento en la peroxidación de lípidos y en las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico y que este efecto se ve revertido por Piroxicam en un modelo *in vitro* (Saldaña *et al*, 1996). Decidimos utilizar en nuestro modelo *in vitro* tres de los AINE´s más prescritos y automedicados: Aspirina (ASA) que es un inhibidor de la COX-1, Piroxicam que inhibe tanto a la COX-1 como a la COX-2 y Meloxicam que inhibe selectivamente a la COX-2. Hay que señalar que esto sucede a las concentraciones farmacológicas que se usaron (1×10^{-6} M).

Los hepatocitos que se incubaron en presencia de etanol y el anti-inflamatorio simultáneos, presentaron en cada uno de los casos diferencias significativas al ser comparados con el tratamiento que se incubó únicamente con etanol 50 mM. Esto es de gran importancia para este estudio ya que el modelo *in vivo* puede ser reproducible *in vitro* y revertir el decaimiento causado por el etanol o su producto el acetaldehído como lo reporta Viña en 1980 que al inhibir a la enzima alcohol deshidrogenasa no observó disminución de los niveles de glutatión. Al comparar este tratamiento con el tratamiento en el que se incubó únicamente con el AINE, observamos que no hay diferencias estadísticas ya que los niveles de glutatión total se mantuvieron en el mismo porcentaje en comparación con el GT basal.

Con base a los resultados obtenidos y analizados en el presente trabajo podemos concluir que el uso de los AINE´s en nuestro modelo experimental ayuda significativamente a contrarrestar el daño que causa el etanol en los niveles de

glutación total y nos permite incursionar en los mecanismo celulares que intervienen en dicha respuesta. También hay que señalar que meloxicam es tan efectivo como la Aspirina y Piroxicam al contrarrestar los efectos causados por el etanol y meloxicam no tiene efectos colaterales como los AINE's ácidos que actúan inhibiendo a la COX-1 en mayor porcentaje que a la COX-2.

Ya esta documentado que el etanol puede disminuir la poza de glutación total, o bien intermediarios que participan directamente en la síntesis de dicho tripéptido, un ejemplo es el acetaldehído que puede unirse al GSH y también a la cisteína que es un aminoácido esencial para la síntesis del glutación (Shaw et al, 1981), también inhibe la vía de la transulfuración mediante la cual el hepatocito convierte metionina y serina en cisteína, además el etanol estimula el catabolismo irreversible de la cisteína a taurina la cual a su vez contribuye a disminuir los niveles de glutación (Jung et al, 2003). En presencia de etanol las enzimas γ -glutamylcistein sintetasa y la glutación reductasa disminuyen su actividad. Con base en la información anterior y en los resultados obtenidos es muy probable que los AINE's participen en algunos de los mecanismo ya mencionados o reaccionando directamente con el acetaldehído y EOR.

También es de gran importancia hacer notar que en todos los tratamientos aplicados en el estudio se encontró en el medio extracelular tres veces más glutación total del que hay en el medio intracelular, lo cual posiblemente sea un reflejo del papel que desempeña el hígado en la homeostasis orgánica del glutación y su disponibilidad para los órganos y tejidos periféricos que lo requieren.

CONCLUSIONES

La intoxicación aguda de etanol (50 mM) ocasiona en hepatocitos aislados una disminución de los niveles de glutatión total extracelular e intracelular.

Los AINE's Aspirina, Piroxicam y Meloxicam revierten los efectos de la intoxicación aguda con etanol (50 mM) sobre los niveles de glutatión total extracelular e intracelular.

Bajo las condiciones del modelo experimental empleado invariablemente encontramos una mayor cantidad de glutatión total en el medio extracelular.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, S. B. and Weissmann, G. (1989). The mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. ***Arthritis and Rheumatism***. 32:1-9.
- Agarwal, D. F. and Goedde, HW. (1989). Enzymology of alcohol degradation. In: Goedde, H. W. Agarwal, D. F. Editors. ***Alcoholism: Biomedical and Genetic Aspects***. Pergamon Press. p. 3.
- Alarcón, N. M. (2001). Influencia de los lípidos de la dieta sobre la defensa antioxidante en el hepatocito aislado de rata. Tesis de Licenciatura. UNAM. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Campus-Iztacala. p. 7-30. México, D. F.
- Akerboom, T. P. M. and Sies, H. (1981). Enssay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione missed disulfides in biological samples. ***Methods in Enzymology***. USA. 77:373-382.
- Akerboom, T. P.; Bilzer, M. and Sies, H. (1982). The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused liver. ***Journal Biology Chemistry***. 257:4248-4252.
- Aragón, C.; Miguel, M.; Correa, M. and Sanchis-Segura, C. (2002). Alcohol y metabolismo humano. ***Monografía Alcohol (Adicciones)***. Editor: Antoni Gual. Vol. 14 Suplemento 1. p. 23-44.
- Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. ***Cellular and Molecular Life Sciences***. 57:1825-1835.
- Barahona, E.; Julkunen, R.; Tannenbaum, L. and Lieber, C. S. (1986). Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats. ***Gastroenterology***. 90:130.
- Batt, RD. (1989). Absorption, distribution, and elimination of alcohol. In: Crow KE, Batt RD, editors. ***Human Metabolism of Alcohol***. Vol. I: Phermacokinetics, Medicolegal Aspects, and General Interest. CRC Press. Boca Raton, FL. p. 3.
- Berkaloff, A.; Bourguet, J.; Favard, P. and Lacroix, J. (1988). Biología y fisiología celular: Cloroplastos, peroxisomas, división celular. Ed. Omega. Barcelona.

-
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E. and Hess, B. (1965) Lactic Dehydrogenase. ***Methods of Enzymatic Analysis***. 7: 737-743.
- Bilodeau, J. F.; Wan, M.; Chun, F. L. and Castonuy, A. (1995). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative pathways in A/J mice. ***Free Radical Biology & Medicine***. 18:47-54.
- Bogen, E. (1932). The human toxicology of alcohol. ***Chapter IV in Alcohol and Man***. Emerson, H. (Ed.). The Macmillan company. New York.
- Boleda, M. D.; Julia, P.; Moreno, A. Y. and Pares, X. (1989). Role of extrahepatic alcohol deshydrogenase in rat ethanol metabolism. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***. 273:1101-1105.
- Bondy, S. and Guo, S. (1994). Effect of ethanol treatment on indices of cumulative oxidative stress. ***European Journal of Pharmacology Enviromental Toxicology and Pharmacology***. 270:349-355
- Bosron, W. F.; Li, T. K.; Dafaldecke, W. P. and Vallee, B. L. (1979). Human liver π -alcohol dehydrogenase: kinetic and molecular properties. ***Biochemistry***. 18:1101-1105.
- Briviba, K.; Klotz, L. O. and Sies, H. (1999). Defenses against peroxyntirite. ***Methods and Enzymology***. 301:301-311.
- Brogden, R. N.; Heel, R. C.; Speight, T. M. and Avery, S. (1984). Piroxicam. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy. ***Drugs***. 28:292-323.
- Chance, B.; Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. ***Physiological Reviews***. 59:527-605.
- Chaudière, J. and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. ***Food and Chemical Toxicology***. 37:949-062.
- Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. Editors. ***Free Radicals Biology and Medicine***. London (UK). Churchill Livingstone. p.481-493.
- Chihuailaf, R. H.; Contreras, P. A. and Wittwer, F. G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. ***Veterinaria México***. 33(3):265-283.
-

- Choi, D.W., Kim, s.Y., Kim, S.K. and Kim, Y.C. (2000) Factors involved in hepatic glutathione depletion induced by acute ethanol administration. ***Journal Toxicology Enviromental. Health.*** 60: 459-469.
- Comporti, M. and Benedetti, A. (1985). Biology of disease lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. ***Laboratory Investigation.*** 53:599-623.
- Cooke, AR. and Birchall, A. (1969). Absorption of ethanol from the stomach. ***Gastroenterology.*** 57:269.
- Deitrich, R. A. (1976). Biochemical aspects of alcoholism. ***Psychoneuroendocrinology.*** 1:325-246.
- DeLeve, L. and Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. ***Pharmacological Therapeutic.*** 52:287-305.
- Di Luzio, N. R. (1966). A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. ***Laboratory Investigation.*** 15:50-62.
- Eriksson, C. J. P. (1977). The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation-II. Regulation of the hepatic acetaldehyde level. ***Biochemical Pharmacology.*** 26:249-252.
- Escarabajal, M. D. (2000). Mecanismos implicados en las conductas inducidas por el alcohol: El papel de las enzimas cerebrales responsables del metabolismo del acetaldehído. Tesis de Doctorado. Universidad de Jaén. Facultad de Psicología Básica, Clínica y Psicobiología. España, Andalucía.
- Fagan, J. M.; Slecicka, B. G. and Sohar, I. (1999). Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. ***The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*** 31:751-757.
- Fernández-Checa, J.; Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1987). Effect of Chronic Ethanol Feeding on Rat Hepatocytic Glutathione: Compartmentation, Efflux, and Response to Incubation with Ethanol. ***The Journal of Clinical Investigation.*** 80:57-62.
- Fernández-Checa, J.; García-Ruiz, C.; Ookhlens, M. and Kaplowitz, N. (1991). Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondrial from ethanol-fed rats. ***The Journal of Clinical Investigation.*** 87:397-405.

-
- Fernández-Checa, J.; Lu, S. C.; Ookhtens, M.; DeLeve, L.; Runnegar, M.; Yoshida, H.; Saoko, H.; Kannan, R.; García-Ruiz, C.; Kuhlenkamp, J. F. and Kaplowitz, N. (1992). The Regulation of Hepatic Glutathione. In Hepatic Anion Transport and Bile Secretion. ***Physiology and Pathophysiology***. (Tavoloni, N. and Berk, P. D. eds): New York. p. 363-395.
- Ferreira, R. (1984). Que son los radicales libres (RL). ***Antioxidantes y calidad de vida***. México. 6-89.
- Frolich, J. C. (1997). A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. ***Trends in Pharmacological Sciences***. 18:30-34.
- García-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Kaplowitz, N. and Fernández-Checa, J.C. (1995). Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. ***Molecular Pharmacology***. 48: 825-834.
- Goth, L. and Pay, A. (1996). Genetic heterogeneity in acatalasemia. ***Electrophoresis***. 17:1302-1303.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3 Edition. Oxford University Press. Oxford; New York.
- Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. ***FASEB Journal***. 6:2675-2683.
- Hecken, A. Schwartz, J. Depré, M. Lapeleire, I. Dallob, A. Tanaka, W. Wynants, K. Buntinx, A. Arnout, J. Wong P. Ebel, D. Gertz B. Schepper, P. (2000). Comparative inhibitory activity of Rofecobib, Meloxicam, Diclofenac, Ibuprofen, and Naproxen on COX-2 versus COX-1 in Healthy Volunteers. ***Journal of Clinical Pharmacology***. 40: 1109-1120.
- Hétu, C.; Yelle, L and Joly, LG. (1982). Influence of ethanol on hepatic glutathione content and on the activity of glutathione s-transferases and epoxide hydase in the rat. ***Drug Metabolism and Disposition***. 10(3):246-250.
- Holben, D. H. Smith, A. M. (1999). The diverse role of selenium within selenoproteins. ***Journal of the American Dietetic Association***. 99:836-845.
-

-
- Horowitz, M.; Maddox, A.; Bochner, M.; Wishart, J.; Bratasiuk, R.; Collins, P. and Shearman, D. (1989). Relationships between gastric emptying of solid and caloric liquid meals and alcohol absorption. ***American Journal of Physiology***. 257:G291.
- Jornvall, H.; Höög, J.; Von Bahr-Lindström, H.; Johansson, J.; Kaiser, R. and Persson, B. (1987). The biochemistry of alcohol and alcoholism. ***Biochemical Society Transactions***. 625th meeting. London. Vol. 16. 223-227.
- Jornvall, H.; Petersson, B.; Krook, M. and Hempel, J. (1991). Alcohol and aldehyde dehydrogenases. In T. N. Palmer. (Ed). ***The Molecular Pathology of Alcoholism***. Oxford University Press. 130-156.
- Jung, Y. S., Kwak, H. E., Choi, K. H. and Kim, Y. C. (2003). Effect of acute ethanol administration on S-amino acid metabolism: increased utilization of cysteine for synthesis of taurine rather than glutathione. ***Adv. Exp. Med. Biol.***526: 245-252
- Kathryn, E. C. and Richard, D. B. (1989). Human metabolism of alcohol. *CRC*.
- Kehrer, J. P. and Lund, L. G. (1994). Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radicals Biology & Medicine*. 17:65-75.
- Kricka, I. J. and Clark, P. M. S. (1979). Biochemistry of alcohol and alcoholism.(Ellis Horwood series in Chemical Science).Halsted Press. p. 1-69.
- Laguna J. and Piña, E. (2002) Bioquímica. 5ª (Ed). Manual Moderno. México
- Lehninger, A.L.; Nelson, D. L and Cox, M. M. (2001) Principios de bioquímica. 3ª (Ed). Omega. España.
- Larkins, N. J. (1999). Free radical biology and pathology. *Journal of Equine Veterinary Science*. 19:84-89.
- Li, T. K. and Magnes, L. J. (1975). Identification of a distinctive form of alcohol dehydrogenase in human livers with high activity. ***Biochemical Biophysics and Research Communications***. 63:202-208.
- Lieber, C. S. (1977). Metabolism of ethanol. En. C. S. Lieber. (ed). ***Metabolic aspects of alcoholism***. Lancaster. MTP Press. 1-30
- Lieber, C. S. (1991). Hepatic, metabolic and toxic effects ethanol: update, ***Alcoholism Clinical & Experimental Research***. 15:573-592
-

- Lieber, C. S. (1994). Hepatic and Metabolic Effects of Ethanol: Patogenesis and Prevention. *Annals of medicine*. 26:325-330
- Lieber, C. S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta*. 257:59-4.
- Lieber, C.S. (2003) Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Research and Health*. 27: 220-231.
- Lu, S. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal*. 13: 1169-1183.
- MacDonald, C.; Dow, J. and Moore, M. (1977). A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury: *Biochemical Pharmacology*. 26:1529-1531.
- Machlin, L. J. and Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*. 1:441-445.
- Martensson, J.; Lai, C. K. and Meister, A. (1990). High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. USA. 87:7185-7189.
- Martínez, C. S.; Martínez, C. M. J. and Esquivel, H. R., (2001) Hígado y sistema endocrino. Su aparición en el metabolismo. 1^{era} edición. (Ed). UNAM FES-Iztacala. México.
- Matuz Mares, D. (2005). Análisis del contenido de glutatión total en el hígado de rata en respuesta a la intoxicación aguda con etanol: Papel de los agonistas adrenergicos. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM.
- McManus, IR.; Contag, AO. and Olson, ER. (1960). Characterization of endogenous ethanol in the mammal. *Science*. 131:102.
- Meister, A. (1988). Glutathione. In *The Liver: Biology and Pathobiology*. (Aria, I. M. Jakoby, W. B. Popper, H. Schachter, D. and Shafritz, D. A. eds). Raven Press. New York. p. 401-417.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1984). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. 52:711-760.

- Merck Index (1989). Encyclopedia of chemical, drugs and biological. 11 ed. Edit. Budavari, S. Mer & Co. Ratway. U. S. A. New Jersey.
- Mike, G. M. (1995). Metabolismo del alcohol en presencia del daño hepático. Tesis de Licenciatura en Nutrición y Ciencias de los Alimentos. Universidad Iberoamericana. México, D. F. IX-XI.
- Miller, J. K.; Brzezinska-Slebodzinska, E. and Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. ***Journal of Dairy Science***. 76:2812-2823.
- Mogelson, S. and Lange L. G. (1984). Nonoxidative ethanol metabolism in rabbit myocardium: purification to homogeneity of fatty acyl ethyl ester synthase. ***Biochemistry***. 23(18):4075-4081
- Murray, R. K.; Granner, D. G.; Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. (1994). Bioquímica de Harper. 13ª edición. El Manual Moderno. México, D.F.
- Petersen, D. R.; Erwin, V. G. and Deitrich, R. A. (1983). Brain acetaldehyde metabolism during ethanol consumption. ***Research Monographs***. 9:93-99.
- Porta, E. (1997). Dietary Modulation of Oxidative Stress in Alcoholic Liver Disease in Rats. Symposium: Nutritional Factors and Oxidative Stress in Experimental Alcoholic Liver Disease. American Society for Nutritional Sciences. 912S-914S.
- Powers, S. K. and Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. ***Proceeding of the National Academy of Sciences***. 58:1025-1033.
- Riveros, R. H.; Julian, S. A. and Piña, E. (1997). Enzymology of Ethanol and Acetaldehyde Metabolism in Mammals. ***Archives of Medical Research***. 28:453-471.
- Rodríguez Lizarraga L., Díaz Belmont A., Zentella de Piña M. (1993). Frecuencia de Hepatopatía y su relación con el patrón de consumo. ***Revista Medica del Hospital General***. México
- Roine, R. P.; Gentry, T.; Lim, Jr. RT.; Baraona, E. and Lieber, CS. (1991). Effect of concentration of ingested ethanol on blood alcohol levels. ***Alcoholism Clinical and Experimental Research***. 15:734.

-
- Sagone, A. L. and Husney, R. M. (1987). Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that this drugs act as free radical-scavengers in biological systems. ***Journal Immunology***. 138:2177-2183.
- Saldaña-Balmori, Y.; Zentella de Piña, M.; Guinzberg, R.; Rocha-Hernández, A. and Piña, E. (1996) Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. ***European Journal of Pharmacology***. 317:225-229
- Schimmel, R. J.; Elliott, M. E. and Dehmel, V. C. 1987. Interactions between adenosin and alfa 1-adrenergic agonists of regulation of respiration in hamster brown adipocytes. ***Molecular Pharmacology***. 32:26-33.
- Sen, C K. and Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription ***FASEB Journal***. 10:709-720.
- Shaw, S., Jayatilleke, E., Ross, W. A., Gordon, E. R. and Lieber, C. S. (1981). Ethanol induced lipoperoxidation. Potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine. ***Journal of Laboratory and Clinical Medicine***. 98: 417-425.
- Shelly, C. Lu. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. ***FASEB Journal***. 13: 1169 - 1183.
- Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. and Ames, B. N. (1990). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. ***Proceeding of the National. Academy of Sciences***. USA. 91:10771-10778.
- Sies, H.(1985). Oxidative stress. ***Academic Press***. USA. 1-7 pp.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. ***Free Radical Biology & Medicine***. USA. 27:916-921.
- Smith, M.; Hpkinson, D. A. and Harris, H. (1973). Studies o the subunit structureand molecular size of the human alcohol dehydrogenase isozymes determined by the different loci ADH₁, ADH₂, ADH₃. ***Annals of Human Genetics***. 36:401-414.
- Smith, T.; DeMaster EG.; Fume, JK.; Springfield, J. and Levitt, MD. (1992). First pass gastric mucosal metabolism of ethanol is negligible in the rat. ***The Journal of Clinical Investigation***. 89:1801.
-

-
- Speisky, H.; MacDonald, A.; Giles, G.; Orrego, H. and Israel, Y. (1985). Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies. ***Journal of Biochemical and Molecular Toxicology***. USA: 225:565-572.
- Stadman, T. C. (1996). Selenocysteines. ***Annual Review Biochemistry***. 65:83-100.
- Thurman, R. G. Handler, J. A. (1989). New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. ***Drug Metabolism Reviews***. 20:679-688.
- Uchida, T.; Kao, H.; Quispe-Sjogren and Peters, R. L. (1983). Alcoholic foamy degeneration a pattern of acute alcoholic injury of the liver. ***Gastroenterology***. 84:683-692.
- Urcini, F.; Maiorino, M.; Brigelius-Flohé, R.; Aumann, K.; D. Roveri, A.; Schomburg, D. and Flohé, L. (1995). The diversity of glutathione peroxidases. ***Methods in Enzymology***. 252B:38-53.
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. ***Nature***. 231:232-235.
- Videla, L. A.; Fernández, V.; Ugarte, G. and Valenzuela, A. (1980). Effect of action for aspirin-like drugs. ***Nature***. 231:232-235.
- Videla, L. A. and Valenzuela, A. (1982). Alcohol ingestión, liver glutathione an lipoperoxidation: metabolic interrelation and pathological implications. ***Life Sciences***. 31:2395-2407.
- Viña, J.; Estrela, C.; Guerry, C. and Romero, F. (1980). Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. ***Biochemical Journal***. 188:549-552.
- Von Wartburg, J. P.; Bülher, R.; Maring, J. A. and Pestalozzi, D. (1983). The polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenase and their significance for acetaldehyde toxicity. ***Pharmacology Biochemistry and Behavior***. 18(1):123-125.
- Watson, PR. (1989). Total body water and blood alcohol levels: updating the fundamentals. In: Crow K. E.; Batt, R. D. editors. ***Human Metabolism of Alcohol***. Vol. I: Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects, and General Interest. CRC Press. Boca Raton, FL. P. 41.
-

- Weiner, H. (1979). Aldehyde dehydrogenase. Mechanism of action and possible physiological roles. ***Biochemistry and Pharmacology of Etoh***. New York. Plenum Press.
- Winston, G. W. and Cederbaum, A. I. (1983a). Evidence for two ethanol oxidizing pathways in reconstituted mixed-function oxidase systems. ***Pharmacology Biochemistry and Behavior***. 18:Suppl 1. 89-94.
- Winston, G. W. and Cederbaum, A. I. (1983b). NADPH-dependent production of oxy redicals by purified components of the rat liver mixed function oxidase system. II. Role in microsomal oxidation of ethanol. ***Journal of Biological Chemistry***. 258:3. 1514-1519.
- Yin, S. J. (1994). Alcohol dehydrogenase: enzymology and metabolism. ***Alcohol and Alcoholism***. Suppl. INC. 2:133-119.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. ***Physiological Reviews***. 74:139-162.
- Zentella de Piña, M.; Hernández-Tobías, A.; Saldaña-Balmori, Y.; Díaz-Belmont, A. and Piña, E. (1992). Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory. ***Federation of European Biochemical Societies***. 298:123-125.
- Zentella de Piña, M.; Díaz Belmont, A.; Rodríguez, L. and Escoto, J. (1993). "Importancia del polimorfismo en el metabolismo del etanol". ***Revista Medica del Hospital General de México***, S. S. 56(3):113-124.
- Zentella de Piña, M.; Saldaña Balmori, Y.; Hernández-Tobías. A. and Piña, E. (1993 (a)). Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. ***Alcoholism: Clinical & Experimental Research***. 17:1228-1232.
- Zentella de Piña, M. (1994) Daño celular por alcoholismo: papel de un anti-inflamatorio. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). UNAM.
- Zentella de Piña, M.; Corona, S.; Rocha-Hernández, A. E.; Saldaña-Balmori, Y.; Cabrera, G. and Piña, E. (1994a). Restoration by Piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute etanol intoxication. ***Life Sciences***. 54:1433-1439.

- Zentella de Piña, M.; Corona García, S. and Balmori, Y. (1994b). Toxicidad del Oxígeno: Papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. ***Boletín de Educación Bioquímica***. Facultad de Medicina. UNAM. México, D.F. 87-93.
- Zentella de Piña, M.; Díaz Belmont, A.; Rodríguez, L.; Rocha Hernández, A. and Corona García S. (1995). Glutación Sanguíneo en el paciente alcohólico con hepatopatía. ***Revista Medica del Hospital General de México***. 58:52-58.
- Zentella de Piña, M and Saldaña Balmori, Y. (1996). Papel Fisiológico de los Radicales Libres. ***Boletín Educación Bioquímica***. Facultad de Medicina. UNAM. México, D.F.15:152-161.
- Zentella de Piña, M.; Castell-Rodriguez, A.; Saldaña-Balmori, Y.; Rocha-Hernández., A.; Ramírez-González, M. D.; Carabez-Trejo, A. and Piña-Garza, E. (1997). Effect of piroxicam on carbon tetrachloride-induced liver injury. ***Proceeding of the Western Pharmacology Society***. 40:91-3.
- Zentella, de Piña, M. (2002). Los anti-inflamatorios no esteroideos modifican la respuesta lipolítica a la epinefrina en los adipositos aislados de la rata. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM.
- Zimatkin, S. M. and Deitrich, R. A. (1997). Ethanol metabolism in the brain. ***Addiction biology***. 2:387-399.