



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DEL RESVERATROL EN HÍGADO DE RATAS
ADMINISTRADAS CON ETANOL”**

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN TECNOLOGÍA E INOCUIDAD DE LOS
ALIMENTOS**

PRESENTA:

JUAN ANTONIO GARCIA ARELLANO

DIRECTORA DE TESINA:

D.C. ADDÍ RHODE NAVARRO CRUZ

CODIRECTORA:

D.C. PATRICIA AGUILAR ALONSO

JUNIO, 2020

Índice

Índice	I
Índice de abreviaturas.....	III
Índice de cuadros.....	IV
Índice de figuras.....	V
Agradecimientos	VI
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES.....	3
3.1 Consumo de Alcohol a nivel mundial	3
3.2 Consumo de Alcohol a nivel nacional	4
3.3 El consumo de alcohol como problema de salud publica.....	5
3.4 Factores de riesgo que conllevan a la enfermedad hepática alcohólica.....	5
3.5 Funciones metabólicas del hígado.....	7
3.5.1 Metabolismo del etanol e inicio del daño hepático por el estrés oxidativo	8
3.5.2 Efectos del alcohol en la ingestión y absorción de los nutrimentos	10
3.6 Estado redox celular a nivel hepático.....	12
3.7 Estrés oxidativo	13
3.7.1 Cambios bioquímicos inducidos por estrés oxidativo	14
3.8 Radicales Libres	14
3.8.1 Óxido Nítrico (NO).....	15
3.8.2 Óxido Nítrico en enfermedades del Hígado	16
3.8.3 Peroxidación lipídica.....	17
3.9 Antioxidantes.....	18
3.9.1 Catalasa	19
3.9.2 Superóxido Dismutasa (SOD)	20
3.9.3 Antioxidante exógeno: el resveratrol.....	21
IV. JUSTIFICACIÓN	23
V. OBJETIVOS.....	24
5.1 Objetivo General	24
5.2 Objetivo específico	24
VI. METODOLOGÍA.....	25

1. Diagrama general de trabajo	25
2. Recursos materiales	26
2.1 Material	26
3. Cuadro de métodos	26
4. Administración de animales	27
4.1 Cuantificación de nitritos	27
4.2 Cuantificación de proteínas totales	28
VII. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	29
7.1 Efecto antioxidante del resveratrol en las concentraciones de nitritos en el estrés oxidativo inducido por etanol en hígado de rata de la cepa Wistar.	29
VIII. CONCLUSIONES	36
IX. RECOMENDACIONES	37
X. BIBLIOGRAFÍA	38

Índice de abreviaturas

ADH: Alcohol Deshidrogenasa	NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
ADN: Ácido desoxirribonucleico	NADPH: Nicotinamida adenina-dinucleótido-Fosfato
ARN: Ácido Ribonucleico	NO: Óxido Nítrico
ATOX1: Proteína de transporte de cobre	NOS: Óxido Nítrico sintetasa
ATP: Adenosín Trifosfato	OH: Hidroxilo
ATP7A: Proteína de merkes	OMS: Organización Mundial de la Salud
CAT: Catalasa	O ⁻ : Anión Superóxido
Cu ²⁺ : Catión de cobre	O ₂ : Oxígeno
CYP2E1: Citocromo P450	PH: Potencial de hidrógeno
ENCODACT: Encuesta nacional de consumo de drogas, alcohol y tabaco	PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados
ERO's: Especies reactivas de oxígeno	R: Radical
ERN: Especies reactivas de nitrógeno	ROO [·] : Radical peróxido
GSH: Glutation	ROS: Especies de Oxigeno Reactivo
HOCL: Ácido Hipocloroso	ROOH: Hidroperóxido lipídico
H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrógeno	SOD: Superóxido dismutasa
MCP-1: Proteína quimio táctica de monocitos	Zn ²⁺ : Catión de Zinc
MDA: Malondialdehído	4-HDA: 4-hidroxi-alquenales
Mn ³⁺ : Catión de magnesio	4-HNE: 4 hidroxi-nonenal
NAD ⁺ : Nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada	

Índice de cuadros

Cuadro 1. Principales moléculas reactivas que generan daño hepático a nivel celular (Galicia y Gutiérrez, 2014)15

Cuadro 2. Principales isoformas de superóxido dismutasa, composición y localización. (Fukai y Ushio-Fukai, 2011)20

Índice de figuras

Figura 1. Consumo total de alcohol puro per cápita en litros (Imagen tomada y modificada por Roswall y Weiderpass, 2015)	3
Figura 2. Consumo de alcohol per cápita a nivel nacional. (Imagen tomada de la encuesta nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017)	4
Figura 3. Generación de radicales libres por el metabolismo del etanol. (Seitz y Stickel., 2006)	13
Figura 4. Mecanismo de acción sobre los radicales libres de la catalasa. (Nandi y col.,2019)	19
Figura 5. Mecanismo de acción antioxidante de un polifenol mediado a través de la expresión génica. (Goszcz y col.,2017)	21
Figura 6. Acción del resveratrol sobre radicales libres actuando como segundo mensajero promoviendo la actividad enzimática antioxidante. (Alarcón y Villegas., 2007)	22
Figura 7. Efecto del resveratrol como antioxidante sobre los niveles nitritos.....	29
Figura 8. Efecto del resveratrol como antioxidante sobre los niveles nitritos.....	30

Agradecimientos

A la Doctora Addi Rhode Navarro Cruz, por haberme apoyado en todo momento a lo largo del proceso de elaboración de este proyecto.

A mi Codirectora de Tesina la Doctora Patricia Aguilar Alonso, por toda su dedicación, compromiso, paciencia y conocimientos compartidos conmigo durante toda la especialidad.

A mi madre, porque es la persona que siempre está apoyándome en todo momento y motivándome para salir adelante y cumplir todos los proyectos que me planteo a futuro.

I. RESUMEN

El consumo de etanol se ha incrementado con mayor frecuencia en diversas sociedades como parte importante de las reuniones sociales, sin embargo, debido a la periodicidad y la cantidad de consumo de esta sustancia, se están presentando problemas serios de salud. El metabolismo del etanol aumenta la producción significativa de especies reactivas de oxígeno induciendo estrés oxidativo a nivel celular, este proceso es considerado como un mecanismo patológico que contribuye al inicio y progresión de lesiones en diversos órganos, principalmente el hígado, que a su vez conduce a una amplia variedad de enfermedades hepáticas graves, que van desde una esteatosis hasta carcinoma hepatocelular.

Debido a esto, la administración de distintos antioxidantes de origen natural como el resveratrol son una estrategia preventiva que permitirá contrarrestar los efectos del estrés oxidativo. El resveratrol es un polifenol natural y una fitoalexina que se encuentra en una gran variedad de fuentes alimenticias como las uvas, ciruelas, cacahuates, vinos tintos y en menor cantidad en vinos blancos.

En la presente investigación se analizó el efecto antioxidante del resveratrol cuando se administran determinadas concentraciones de etanol, que van desde un 2.5% hasta 50% a través de las concentraciones de nitritos como una medida indirecta de la producción de óxido nítrico. Se observó, que los niveles de este gas aumentan desde una concentración del 5% y que a partir del 30% de etanol, el resveratrol tiene un efecto adverso, aumentando los niveles de nitritos en hepatocitos.

II. INTRODUCCIÓN

El consumo de alcohol se ha incrementado con mayor frecuencia en diversas sociedades como parte importante de las reuniones sociales, sin embargo, debido a la periodicidad y la cantidad de consumo de esta sustancia, se están presentando problemas serios de salud tanto física como mental; se generan daños a nivel sistémico, los cuales pueden ser irreversibles afectando notablemente la calidad de vida de la población. El hígado es susceptible a la toxicidad inducida por altas concentraciones de etanol, ya que es uno de los órganos que participa activamente en la detoxificación de esta sustancia presente en sangre portal. El estrés oxidativo que se lleva a cabo en los hepatocitos, representa uno de los principales mecanismos de daño y favorece la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que conducen al deterioro hepático y a la muerte celular.

Existen sustancias químicas como el resveratrol, obtenidas a través de distintas fuentes alimenticias, que permiten prevenir y retrasar el estrés oxidativo generado por los radicales libres. El resveratrol es un polifenol de origen natural presente principalmente en alimentos como uvas, moras, cacahuates y vino tinto. Este componente posee una gran variedad de funciones biológicas para el organismo, entre las cuales se destacan la actividad antioxidante ya que interviene contra la peroxidación de lipoproteínas y liposomas, actúa como agente regulador de la homeostasis lipídica y además es un importante inhibidor de enzimas que generan estrés y muerte celular acelerada.

El principal objetivo de este trabajo es examinar el posible daño hepático que pueda generarse a causa del consumo de etanol y a su vez, analizar el efecto hepatoprotector que tiene el resveratrol para poder contrarrestar el daño generado a causa del estrés oxidativo, por los radicales a causa del metabolismo de dicha sustancia.

III. ANTECEDENTES

3.1 Consumo de Alcohol a nivel mundial

El consumo de etanol representa el 3.8% de la mortalidad a nivel mundial y promueve la pérdida o el ajuste de años por discapacidad debido a la muerte prematura llegando a ser de 4.6%. Existen diversos efectos nocivos del alcohol que afectan la salud notablemente como la enfermedad hepática alcohólica (ALD) que conlleva a un amplio grupo de anomalías hepáticas que incluyen esteatosis simple, hepatitis alcohólica (AH) o esteatohepatitis, fibrosis progresiva y en última instancia la cirrosis alcohólica y/o carcinoma hepatocelular. La cirrosis conduce a alteraciones sistémicas y metabólicas que comprometen las funciones renal, pulmonar, cardiaca y genera complicaciones como ascitis, encefalopatía, ictericia y sarcopenia, generando que incremento de la morbilidad y mortalidad de los individuos comprometiendo su calidad de vida considerablemente (Roswall y Weiderpass, 2015).

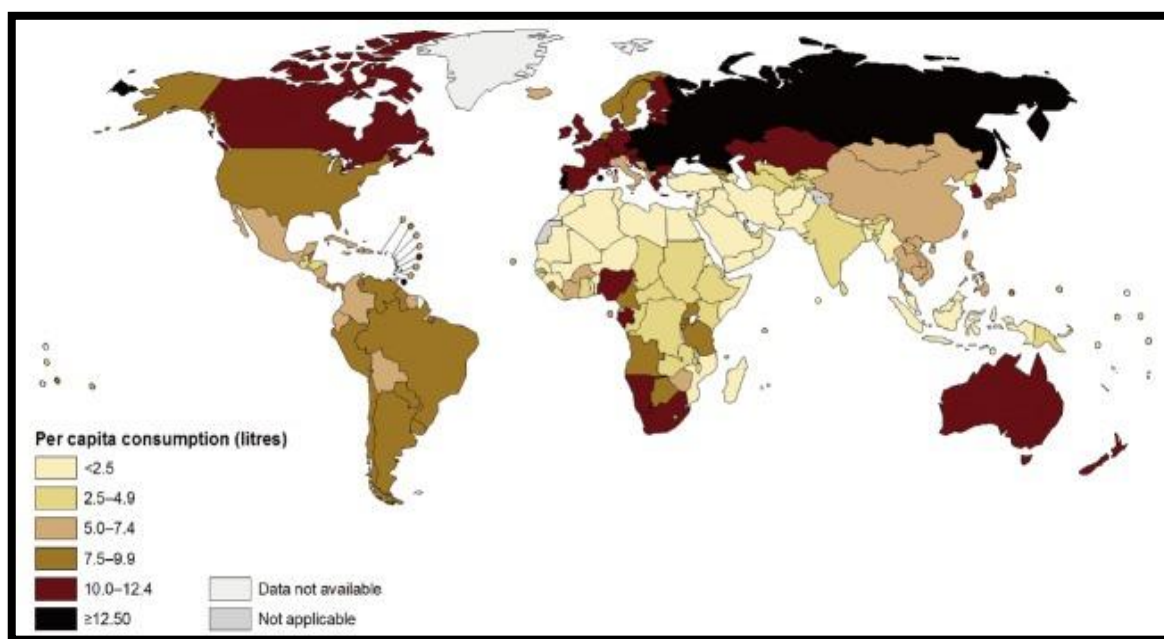


Figura 1: Consumo total de alcohol puro per cápita en litros (Imagen tomada y modificada por Roswall y Weiderpass, 2015).

Existe una gran variación de consumo de alcohol entre las diferentes partes del mundo como lo muestra el Sistema de Información Global de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Figura 1).

En la región de Europa del Este, es el sitio donde se lleva a cabo una mayor ingesta (12,2 L de alcohol puro por año per cápita) y en la región del Mediterráneo Oriental (0.7 L de alcohol puro/ año per cápita) representa el sitio donde la ingesta es más baja (Roswall y Weiderpass, 2015).

3.2 Consumo de Alcohol a nivel nacional

De acuerdo con el consumo per cápita, en México la población bebe anualmente un promedio de 4.9 litros de alcohol puro. Los hombres consumen 7.9 litros, mientras que las mujeres toman 2.1 litros. En cuanto al rango de edad, el grupo de 18 a 29 años es el que representa el consumo per cápita más elevado (7.6 litros), seguido de la población de 15 a 17 años con 5.9 litros.

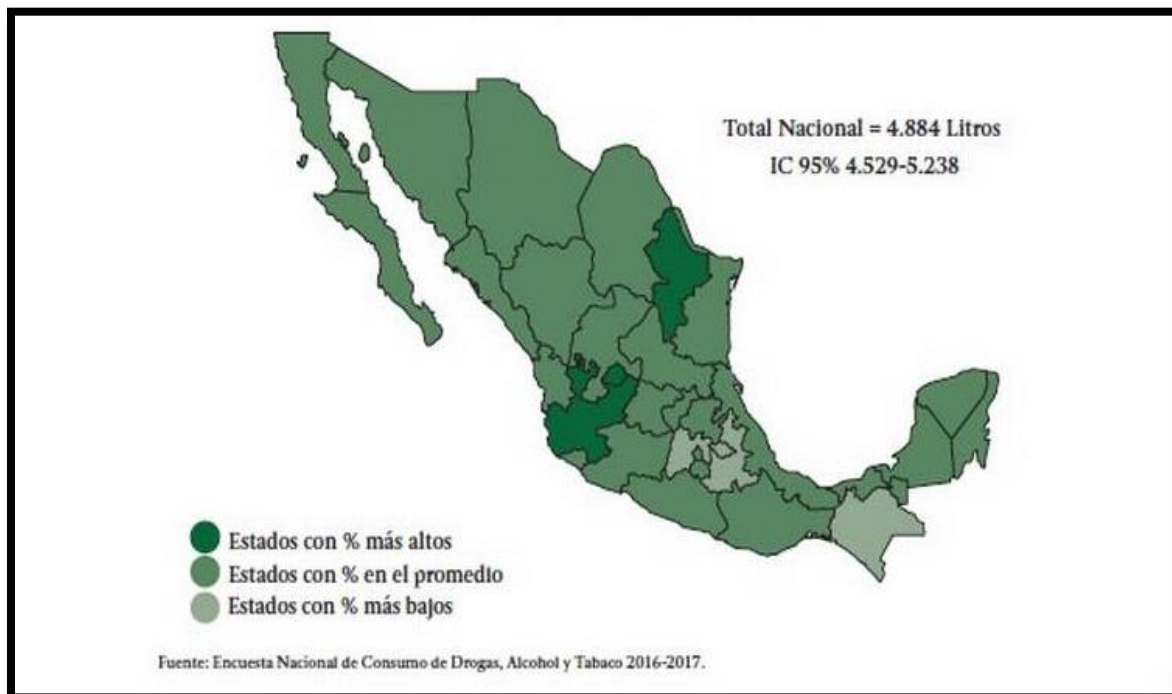


Figura 2. Consumo de alcohol per cápita a nivel nacional. (Imagen tomada de la encuesta nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017).

En el reporte que realizó la encuesta nacional de consumo de drogas alcohol y tabaco de 2016-2017 (Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017.) reporta que los estados de Aguascalientes, Jalisco y Nuevo León anualmente tienen el mayor consumo per cápita con un promedio de 7.7 litros (Figura 2) mientras que los estados de Chiapas, Puebla, Tlaxcala y Estado de México presentan el consumo más bajo, con un promedio de 2.6 litros. (Villatoro y col., 2017).

3.3 El consumo de alcohol como problema de salud pública

De acuerdo con la OMS, el consumo excesivo de alcohol es un problema de salud a nivel mundial y representa el tercer factor de riesgo más grande de enfermedades y discapacidades en el mundo. Alrededor de 320,000 jóvenes de entre 15 a 29 años mueren por causas relacionadas con el alcohol, lo que representa un 9% de la mortalidad de este grupo etario. En México, el consumo de alcohol es la cuarta causa de muerte de la población en el país (8.4%). (Ahumada y col., 2017).

En la mayoría de los casos se presentan problemas psicosociales generalizados como violencia, abandono, maltrato, delincuencia, homicidio, problemas laborales y económicos. Por si fuera poco, los problemas de salud son las principales consecuencias del consumo excesivo de esta sustancia, ya que es la causa de 60 tipos de enfermedades tanto agudas como crónicas entre las cuales se destacan trastornos endocrinos, neurológicos, problemas cardiovasculares, trastornos digestivos, metabolitos, enfermedades hepáticas entre otros (Ahumada y col., 2017).

3.4 Factores de riesgo que conllevan a la enfermedad hepática alcohólica

La enfermedad hepática por consumo elevado de alcohol representa una amplia variedad de complicaciones clínicas que van desde esteatosis hepática, hasta formas más graves incluyendo hepatitis, cirrosis y cáncer de hígado (Lazarte y col., 2016).

Estas patologías se presentan simultáneamente en un mismo paciente dependiendo de una serie de factores que promueven el desarrollo de estas complicaciones. Dentro de los principales factores de riesgo más determinantes que favorecen la aparición de enfermedades hepáticas son:

Cantidad de alcohol ingerida: Es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad. El riesgo de progresar a cirrosis se va incrementando con la ingestión de 60-80g de alcohol al día (equivalente a 6 cervezas diarias de 4.5% de alcohol) por diez años o más, en el caso de los hombres y 20 g al día en mujeres (equivalente a 3 cervezas diarias de 4.5% de alcohol). Sin embargo, aunque una persona ingiera esas cantidades de alcohol, solo un pequeño porcentaje de entre 6% a 40% desarrolla esta patología, ya que existen otros factores que tienen un rol determinante para su desarrollo (Lazarte y col., 2016).

Tipo de bebida alcohólica: El tipo de bebida que es consumida puede aumentar el riesgo de daño hepático, el producto que está más asociado a generar daño, es la cerveza o licores destilados como el brandy o el whisky. (Lazarte y col., 2016).

Patrón de consumo: El hecho de beber fuera de las horas de comida o en ayuno, incrementa el riesgo comparado con el consumo de alcohol durante la comida aunado a un consumo compulsivo de alcohol es decir, ingesta de grandes cantidades de esta sustancia en un periodo de tiempo corto (Lazarte y col., 2016).

Factores genéticos: Existe una compleja interacción entre el medio ambiente, factores psicológicos y los genes de los individuos. Variaciones genéticas (polimorfismos) que codifican las enzimas antioxidantes, las citoquinas, mediadores inflamatorios, enzimas que interfieren en el metabolismo del alcohol, tienen un rol importante como factor de riesgo (Lazarte y col., 2016).

Género: Las mujeres presentan mayor predisposición a desarrollar daño hepático de forma más prematura a causa del consumo de alcohol, debido a que se necesitan menores concentraciones y un menor periodo de tiempo en comparación con la de un hombre, ya que los niveles enzimáticos de alcohol deshidrogenasa son más elevados en varones y la capacidad de metabolizar y eliminar esta sustancia es más eficiente. (Lazarte y col., 2016).

3.5 Funciones metabólicas del hígado

El hígado es un gran depósito de células con capacidad de reacción química y un metabolismo altamente eficiente. Estas células comparten sustratos metabólicos que permiten procesar y sintetizar numerosas sustancias transportadas a otras regiones del organismo cumpliendo miles de funciones metabólicas diferentes. Un ejemplo de ello es la síntesis de glucosa a partir del glucógeno, una de las principales reservas energéticas que posee el cuerpo humano. El hígado extrae el exceso de glucosa de la sangre, para almacenarlo o utilizarlo cuando la glucemia empieza a descender de forma peligrosa debido a diversos factores. La glucemia de una persona con una función hepática insuficiente se duplica o triplica, si ingiere una comida rica en hidratos de carbono con respecto a la de otra con una función hepática normal (Hall, 2016).

En el metabolismo lipídico, el hígado realiza funciones específicas como:

- Oxidación de los ácidos grasos para proveer energía destinada a otras funciones corporales.
- Síntesis de grandes cantidades de colesterol, fosfolípidos y casi todas las lipoproteínas.
- Síntesis de grasa a partir de las proteínas y de los hidratos de carbono.

De esta forma el hígado se responsabiliza de una parte esencial del metabolismo de los lípidos. Cerca del 80% del colesterol sintetizado en el hígado se convierte en sales biliares para ser un componente primordial de la bilis; el resto se transporta con las lipoproteínas por la sangre hacia las células de los tejidos. Los fosfolípidos también se sintetizan en el hígado y se transportan sobre todo con las lipoproteínas. Las células utilizan el colesterol y los fosfolípidos para formar las membranas, las estructuras intracelulares y numerosas sustancias químicas esenciales para el funcionamiento celular. Casi toda la síntesis de lípidos del organismo a partir de los hidratos de carbono y de las proteínas tiene lugar, asimismo, en el hígado. Una vez que se sintetiza la grasa en el hígado, es transportada por las lipoproteínas hacia el tejido adiposo para su almacenamiento (Hall, 2016).

En el metabolismo de las proteínas las funciones principales del hígado son:

1. Desaminación de los aminoácidos.
2. Formación de urea para eliminar el amoníaco de los líquidos corporales.
3. Formación de proteínas del plasma.
4. Conversión de los distintos aminoácidos y síntesis de otros compuestos a partir de dichos componentes.

El hígado puede formar las proteínas del plasma con un ritmo máximo de 15 a 50 g/día. Debido a eso, aún si se eliminaran hasta la mitad de las proteínas plasmáticas del organismo, se podrían reponer antes de 1 a 2 semanas. Cuando ocurre una enfermedad crónica del hígado (por ejemplo, cirrosis), las proteínas del plasma, del tipo de la albúmina, descienden hasta valores muy bajos y determinan edema generalizado y ascitis (Hall, 2016).

Otra de las funciones que cumple el hígado es eliminar o depurar los fármacos, las hormonas y otras sustancias tóxicas, entre ellas el etanol. El medio químico activo del hígado tiene una gran capacidad para detoxificar o eliminar muchos medicamentos hacia la bilis, como sulfamidas, penicilina, ampicilina o eritromicina. De manera análoga, algunas hormonas secretadas por las glándulas endocrinas se modifican químicamente o se eliminan por el hígado como la tiroxina, hormonas esteroideas como los estrógenos, el cortisol y la aldosterona. En general, las lesiones hepáticas determinan una acumulación excesiva de una o más de estas hormonas en los líquidos corporales y, por tanto, una posible hiperactividad de los sistemas hormonales (Hall, 2016).

3.5.1 Metabolismo del etanol e inicio del daño hepático por el estrés oxidativo

El alcohol se absorbe rápidamente en el estómago, el intestino delgado y alrededor del 90% es metabolizado en el hígado, mientras que el resto es eliminado por los riñones o a través de los pulmones. En el interior de la célula hepática, el alcohol es oxidado a acetaldehído y en una segunda reacción, el acetaldehído es oxidado a acetato.

Este proceso está catalizado por la alcohol deshidrogenasa y la acetaldehído deshidrogenada citoplasmáticas, respectivamente, que utilizan la nicotina adenin dinucleótido (NAD) como cofactor y de otras vías metabólicas son el sistema microsomal (MEOS) (Encinas y Revuelva, 2008).

El MEOS juega un papel en el metabolismo del alcohol, particularmente después de un mayor consumo de alcohol. Las reacciones que componen el MEOS se producen en microsomas, que se separan del retículo endoplásmico, que sirve para transportar moléculas dentro y fuera de las células. El componente principal del MEOS es la enzima citocromo P450 y como la ADH, convierte el alcohol en acetaldehído (Lieber, 2003).

El acetaldehído, un producto intermediario el metabolismo del etanol, puede generar cambios estructurales entre las moléculas con residuos reactivos en proteínas o moléculas pequeñas. Estas modificaciones químicas pueden alterar y / o interferir con los procesos biológicos normales, como la transducción de señales o ser directamente tóxicos para la célula. Las moléculas biológicas modificadas también podrían estimular la respuesta inmune del huésped y causar una enfermedad de tipo autoinmune (Beier y McClain, 2010).

Asimismo, durante el metabolismo del alcohol se genera un exceso de equivalentes reducidos en forma de NADH. Los cambios en el potencial redox en el hígado inhiben la oxidación de los ácidos grasos dando lugar a depósitos de grasa. Debido a estos cambios, existe un aumento de la permeabilidad intestinal y, en consecuencia, un aumento de los niveles de endotoxina circulante. La endotoxina activa a las células de Kupffer que tienen un papel fundamental en la patogenia de la hepatopatía alcohólica. Uno de los principales mecanismos involucrados en el desarrollo y en la progresión de la hepatopatía alcohólica es el estrés oxidativo originado por una producción excesiva de radicales libres (Encinas y Revuelva, 2008).

La ADH es una enzima que se encuentra en el citosol hepatocitario y se encarga de convertir el alcohol en acetaldehído. El CY2E1 es una proteína que cumple una función similar a la ADH respondiendo a las altas concentraciones de etanol en el sistema. Ambas provocan la reducción del NAD⁺ en NADH. (Conde de la Rosa y col., 2008).

El CYP2E1 cuyas concentraciones son proporcionales a los niveles de etanol en sangre, genera radicales libres a través de la oxidación del NADPH en NADP⁺, aunado a este proceso, la exposición crónica de alcohol es capaz de activar al factor de necrosis tumoral α (TNF- α) proveniente de macrófagos que posteriormente conduce a la elevada producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (ERO) (Conde de la Rosa y col., 2008).

Es así como la alcohol deshidrogenasa (ADH) y el citocromo p450 2E1 (CY2E1), se han señalado como responsables de la capacidad del etanol para inducir estrés oxidativo conduciendo a la generación de lesiones hepáticas. Los niveles de CYP2E1 se muestran elevados en diversas condiciones fisiológicas y son un gran generador de ERO tales como el radical O[•]₂ y el H₂O₂. Debido a esto, se inicia un proceso de estrés oxidativo comprometiendo la integridad celular considerablemente (Conde de la Rosa y col, 2008).

3.5.2 Efectos del alcohol en la ingestión y absorción de los nutrimentos

Cuando se consume el etanol de forma crónica puede causar enfermedades al interferir con el estado nutricional del bebedor, alterando la ingesta, absorción y utilización de diversos nutrimentos esenciales para mantener la homeostasia celular. Ejerce efectos nocivos a través de su metabolismo y los compuestos tóxicos resultantes, particularmente en el hígado, donde se produce la mayor parte del metabolismo del alcohol (Lieber, 2003).

Como consecuencia de ello, pueden sufrir diversos grados de desnutrición. La desnutrición primaria ocurre cuando el alcohol reemplaza otros nutrientes en la dieta, lo que resulta en una ingesta general reducida de nutrientes. La desnutrición secundaria ocurre cuando el bebedor consume nutrientes adecuados pero el alcohol interfiere con la absorción de esos nutrientes en el intestino, por lo que no están disponibles para el cuerpo (Lieber, 2003).

La desnutrición más grave, que se acompaña de una reducción significativa en la masa muscular, generalmente se encuentra en aquellos alcohólicos que están

hospitalizados por complicaciones médicas del alcoholismo. Si estos pacientes continúan bebiendo, perderán peso adicional; por el contrario, si se abstienen de beber, aumentarán de peso (Lieber, 2003).

Los efectos nocivos de la ingestión abundante de alcohol se reflejan principalmente sobre el metabolismo proteico. Tanto las proteínas como aminoácidos son indispensables para el mantenimiento de la estructura celular, participan en el transporte de distintas sustancias y actúan como enzimas mediadoras en casi todas las reacciones bioquímicas celulares. Los aminoácidos esenciales se obtienen a través de las proteínas provenientes de la dieta, sin embargo, el alcohol interfiere con la captación de estos aminoácidos de forma que se reduce significativamente la absorción intestinal de aminoácidos (Moreno y Cortés., 2008).

Cuando se produce una insuficiencia hepatocelular secundaria por alcoholismo crónico, son evidentes las alteraciones de la síntesis hepática de proteínas (sobre todo albúmina y factores de la coagulación) y de urea. Las consecuencias clínicas, potencialmente graves, son las siguientes:

- 1) Hipoalbuminemia con alteraciones del transporte de ciertos minerales y posible acumulación de líquido.
- 2) Hipoprotrombinemia y déficit de síntesis de otros factores de la coagulación, con riesgo de hemorragias digestivas o de otros órganos.
- 3) Reducción de la síntesis de urea, con aumento de la concentración sanguínea de amoníaco y riesgo de desarrollar encefalopatía hepática
- 4) Alteración del balance de aminoácidos, con incremento de los niveles de los aminoácidos aromáticos y riesgo de encefalopatía hepática. La ingestión proteica de estos pacientes es igual o inferior a 30-50 g por día.

En los bebedores que consumen más del 30% de sus calorías totales a través de la ingesta de alcohol, no solo el aprovechamiento de hidratos de carbono, sino también el aprovechamiento de proteínas y grasas disminuyen significativamente.

El consumo de algunos micronutrientes como vitamina A, vitamina C y tiamina (vitamina B1) también puede caer por debajo de las cantidades diarias recomendadas debido a una ingesta deficiente (Moreno y Cortés., 2008).

3.6 Estado redox celular a nivel hepático

Las células cuentan con mecanismos específicos altamente eficientes para controlar el nivel intracelular de los radicales libres y mantener un equilibrio entre los componentes antioxidantes y prooxidantes generados por el estrés oxidativo. Este fenómeno está relacionado con el estado fisiológico de un individuo. La exposición a altos niveles de ROS genera como respuesta, el reclutamiento o liberación de diversas citoquinas, hormonas y factores de crecimiento u otros mediadores como el ATP extracelular y defensa contra la invasión de patógenos, siendo la principal causa de daño a diferentes tipos de órganos, entre ellos el hígado. Las mitocondrias actúan como fuente primaria de ROS que son generados en células y tejidos durante la fosforilación oxidativa (Cesaratto y col., 2004).

La formación del anión superóxido a nivel molecular esta mediado por enzimas como NADP oxidasas y xantina oxidasa, sin embargo, este componente se convierte rápidamente dentro de la célula a H_2O_2 (peróxido de hidrogeno) y en O_2 mediante la superóxido dismutasa. El peróxido de hidrogeno puede reaccionar con algún metal de transición reducido a través de la reacción de Fenton para producir el radical hidroxilo, un componente altamente reactivo y más dañino. Posterior a la formación de este radical libre, las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa tienen la capacidad de convertirlo en agua evitando que pueda acumularse en grandes concentraciones tóxico para la célula. Las altas concentraciones de H_2O_2 generan daño hepatocelular (Cesaratto y col., 2004).

El metabolismo de etanol genera un desequilibrio en el estado redox celular ya que normalmente el hígado tiene perfectamente regulado el sistema antioxidante enzimático y no enzimático particularmente en las células de Kupffer, las cuales están altamente expuestas a las moléculas de ROS (Figura 3). (Cesaratto y col., 2004).

Este desequilibrio muestra una correlación entre el daño hepático y el aumento de marcadores de estrés oxidativo tales como MDA, 4-HDA, óxido nítrico, entre otros (Cesaratto y col., 2004).

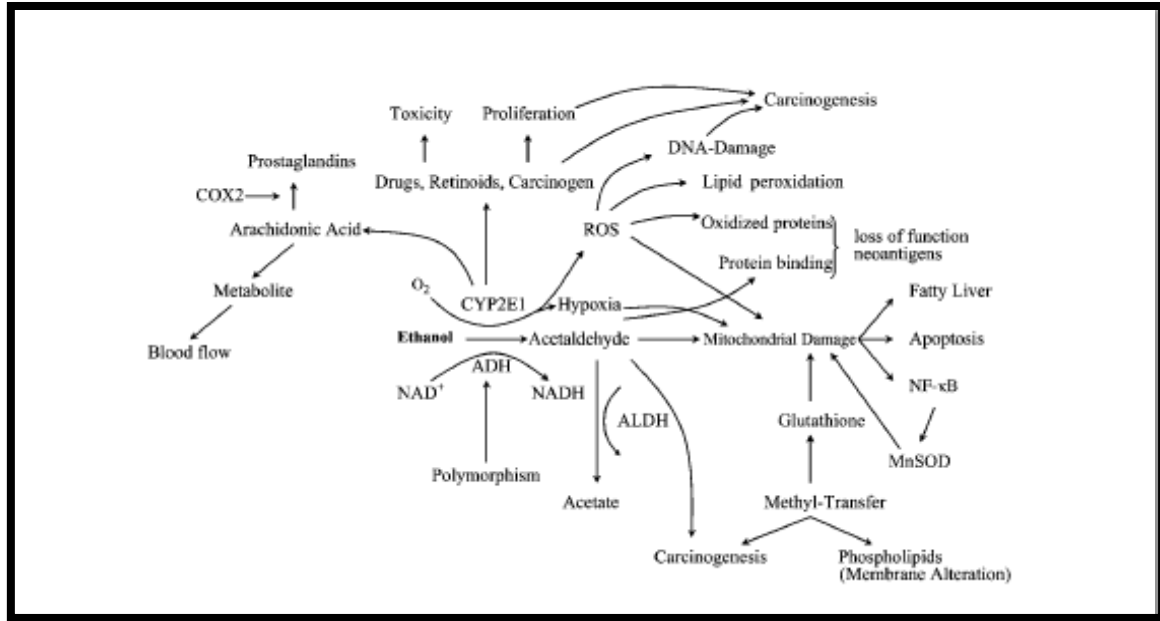


Figura 3: Generación de radicales libres por el metabolismo del etanol (Seitz y Stickel., 2006).

3.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la exposición de las células, tejidos u órganos a un exceso de productos oxidantes y altamente tóxicos que pueden conducir a muerte celular acelerada. Algunas hipótesis sugieren que las especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel determinante en el daño celular, originando cambios en el estado redox producido por el metabolismo del etanol, mediante las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas. La generación de productos reactivos como el acetaldehído, generan daño mitocondrial, disminuyen la síntesis de ATP causando daños directos en la membrana. Además, dichos productos interfieren en la absorción de algunos nutrientes importantes para cada célula como los hidratos de carbono, proteínas, vitaminas y algunos minerales además de alterar la funcionalidad del sistema inmune y el equilibrio de algunas citoquinas proinflamatorias. (Cederbaum, 2001).

En el mecanismo de daño se puede analizar la gran participación de moléculas altamente reactivas como los radicales libres en el hepatocito, los cuales alteran considerablemente su funcionalidad (Cederbaum, 2001).

3.7.1 Cambios bioquímicos inducidos por estrés oxidativo

Las altas concentraciones séricas de alcohol junto con la elevada tasa metabólica hepática, produce estrés bioquímico para las células hepáticas. Mientras que el acetato, producto de la oxidación del etanol, puede entrar en el ciclo del ácido cítrico después de la conversión en acetil-CoA, las diversas alteraciones metabólicas y bioquímicas causadas por la exposición al etanol dan como resultado un balance energético negativo. Estos cambios bioquímicos causados por el metabolismo del alcohol exacerban la enfermedad hepática alcohólica. Específicamente, el cambio en la relación NADH a NAD⁺ aumenta la tasa de síntesis y esterificación de ácidos grasos, mientras que simultáneamente disminuye la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos libres y promoviendo la peroxidación lipídica. Este cambio en el estado redox también puede afectar el metabolismo normal de los hidratos de carbono, lo que resulta en múltiples efectos, incluido un suministro reducido de ATP a la célula (Beier y McClain, 2010).

3.8 Radicales Libres

Los radicales libres son moléculas que contienen uno o más electrones no apareados altamente reactivos y pueden dar lugar a reacciones en cadena que provocan muerte celular y daño tisular (Cuadro 1). Agrupan a un conjunto de compuestos como las ERO que incluyen al radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrogeno, así como el ácido hipocloroso y especies reactivas de nitrógeno (ERN) que se refiere a moléculas derivadas del óxido nítrico (Elvir, 1994).

Radicales libres como el peróxido de hidrógeno, pueden reaccionar con otras biomoléculas como el radical hidroxilo e interactuar con bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) lo que conlleva a una alteración en la información genética almacenada en las células o simplemente estimula la peroxidación lipídica

afectando a los ácidos grasos poliinsaturados convirtiéndolos en moléculas oxidantes. Una sola molécula de radical $\cdot\text{OH}$ tiene la capacidad de transformar varias moléculas de ácidos grasos en hidroperóxidos, produciendo aldehídos altamente dañinos para las membranas celulares (Paredes y Roca, 2002).

La generación de oxígeno molecular en forma de especies reactivas de oxígeno (ROS) en bajas concentraciones es una parte natural de la respiración aerobia que es responsable de la manifestación de funciones celulares fisiológicas que van desde vías de transducción de señales, defensa y expresión genética. Por el contrario, una cantidad excesiva de estas biomoléculas son nocivas para las células ya que inducen a estrés oxidativo, produciendo daño a componentes celulares; proteínas, lípidos y ADN (Cichoz y Michalak., 2014).

Cuadro 1: Principales moléculas reactivas que generan daño hepático a nivel celular (Galicia y Gutiérrez, 2014).

Especies reactivas de oxígeno	Especies reactivas de nitrógeno
Anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Anión peroxinitrito (ONOO^{\cdot})
Radical hidróxilo (OH^{\cdot})	Dióxido de nitrógeno (NO_2)
Radical hidroperóxido (HO_2^{\cdot})	Óxido nítrico (NO)
Radical Lipídico (L^{\cdot})	
Radical peroxilipídico(LO_2^{\cdot})	
Peróxido de hidrógeno(H_2O_2)	
Hidroperóxido lipídico(LOOH)	

3.8.1 Óxido Nítrico (NO)

El hígado es un órgano que está claramente influenciado por el NO. La exposición aguda y crónica al NO se ha asociado con distintos patrones de enfermedad hepática. Para poder determinar los efectos beneficiosos o perjudiciales del NO son la cantidad, la duración y el sitio de producción de NO. Una dosis baja de óxido nítrico sirve para neutralizar los radicales tóxicos de oxígeno en el hígado durante los eventos de sepsis aguda y reperfusión (Hon y Col., 2002).

Este componente demuestra propiedades antimicrobianas y antiapoptosis durante la infección aguda de hepatitis y otros procesos inflamatorios. Sin embargo, en el contexto de inflamación crónica del hígado, cuando hay una gran cantidad sostenida de compuesto, podría volverse genotóxico y conducir al desarrollo de cáncer de hígado. El NO se inactiva rápidamente en los tejidos por oxidación a sus metabolitos, nitritos y nitratos, los cuales se difunden fácilmente en la circulación. Por lo tanto, las concentraciones de nitrito y nitrato a menudo se usan como indicadores de la presencia de óxido nítrico. Está involucrado con la etiología o la progresión de las enfermedades hepáticas porque este gas juega un papel importante en la regulación homeostática, así como en los mecanismos de defensa inmunológica. La mayoría de los efectos perjudiciales del NO se basan en el concepto de que el NO sirve como precursor, produciendo potentes factores tóxicos, como el peroxinitrito y el radical hidroxilo, como resultado de la interacción con el anión superóxido (Hon y Col., 2002).

El óxido nítrico es un gas muy versátil que cumple diversas funciones, actuando como vasodilatador, segundo mensajero, neurotransmisor, inhibe la agregación plaquetaria e interviene en la relajación del músculo liso. Es una de las principales fuentes intracelulares de ERO's tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo producidos en la cadena transportadora de electrones. Cuando el NO se combina con radicales superóxido genera moléculas como el anión peroxinitrito altamente reactivo que se ha relacionado con la peroxidación lipídica y la nitrosación de los residuos de tirosina en las proteínas logrando disminuir de esta forma su biodisponibilidad. Este último componente es altamente tóxico ya que compromete la integridad de orgánulos como la mitocondria y en casos severos genera muerte celular mediante la producción daño estructural en proteínas y lípidos (Trujillo y Tovar, 2008).

3.8.2 Óxido Nítrico en enfermedades del Hígado

El NO es generado por tres isoformas de óxido nítrico sintasas (NOS), NOS neuronal (nNOS; NOS1), NOS inducible (iNOS; NOS2) y NOS endotelial (eNOS; NOS3). En la biología hepática, eNOS e iNOS son las isoformas más importantes, mientras que el papel de nNOS es poco conocido. En muchas condiciones patológicas, el iNOS

produce grandes cantidades de NO, el cual es una fuente importante de especies de nitrógeno reactivo (RNS). En particular, el peroxinitrito (ONOO-) puede dañar una amplia gama de moléculas celulares que incluyen ADN y/o lípidos, además de facilitar la nitración de proteínas afectando tanto su estructura como su función. El NO reacciona con especies reactivas de oxígeno (ROS) para formar RNS como $\bullet\text{NO}_2$, ONOO-, HNO_2 y NO_2^+ . Las mitocondrias se han considerado la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se originan principalmente de la cadena respiratoria mitocondrial (Iwakiri y Kim, 2015).

El exceso de ONOO- mitocondrial puede perjudicar la fosforilación oxidativa al inhibir los complejos de la cadena respiratoria (Complejo I, Complejo IV y ATP sintasa) y la actividad de MnSOD. Además, el ONOO- puede oxidar bases nitrogenadas, residuos de proteínas de tirosina y grupos tioles causando la muerte de los hepatocitos de forma significativa (Iwakiri y Kim, 2015).

3.8.3 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso en el que moléculas oxidantes como los radicales libres o especies no radicalarias, atacan a los lípidos que contienen doble enlace (s) carbono-carbono, especialmente ácidos grasos poliinsaturados, que implica la extracción de un átomo de hidrogeno a un carbono, generando radicales peroxilo lipídicos e hidroperóxidos. Tanto el (OH^{\bullet}) e hidroperóxido (HO_2) afectan notablemente a los lípidos, y es altamente probable que esto suceda debido a que una célula produce alrededor de 50 radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) cada segundo, además la generación del ONOO $^{\bullet}$ formado por la unión entre ROS y RNS aumenta la probabilidad del daño. Los glucolípidos, fosfolípidos y colesterol se ven afectados por esta reacción la cual daña potencialmente y modifica la funcionalidad de estos componentes celulares (Ayala, Muñoz y Argüelles., 2014).

La peroxidación de los lípidos empieza cuando una ERO tiene suficiente reactividad para atraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-), este doble enlace adyacente al grupo metileno debilita la energía del enlace del hidrogeno alélico y deja un electrón desapareado sobre el carbono (- $\dot{\text{C}}\text{H}$ -). De tal forma que, bajo condiciones

aérobicas este radical se combinará con O₂ para formar el radical peróxido del lípido. Este radical tiene la capacidad de atraer un ion H que pertenece a otra molécula de lípidos, es así como ocurre la propagación de la peroxidación lipídica, generando muchas moléculas de peróxido de lípido, inestabilizando la integridad de la membrana (Halliwell y Gutteridge., 2002).

El proceso general de peroxidación lipídica consta de tres fases; en la fase de iniciación, las moléculas prooxidantes toman una molécula de hidrogeno alílico para formar un radical lipídico creando inestabilidad en el ácido graso poliinsaturado, en la fase de propagación, el radical lipídico reacciona rápidamente con el oxígeno para formar el radical peroxilo que extrae un hidrogeno de otra molécula lipídica generando un nuevo radical lipídico. En la reacción denominada terminación, los antioxidantes donan un átomo de hidrogeno a las especies radicales peroxilipídicas lo que da como resultado, productos no radicalarios. Durante la peroxidación lipídica se producen una gran variedad de aldehídos como productos secundarios siendo malondialdehído (MDA), propanal, hexanal y 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) los más característicos. Sin embargo, el MDA parece ser el producto más mutagénico de la peroxidación lipídica, mientras que el 4-HNE es más tóxico (Ayala, Muñoz y Argüelles., 2014).

3.9 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que previene, retrasa o elimina el daño oxidativo de una molécula producida por un radical libre. Cada organismo desarrolla un sistema antioxidante altamente complejo que puede ser de origen enzimático o no enzimático y presenta una acción sinérgica en conjunto para proteger a las células y los órganos contra el daño de los radicales libres. Los antioxidantes pueden ser endógenos u obtenidos exógenamente como parte de la dieta, pueden encontrarse en frutas, oleaginosas o bien mediante suplementos dietéticos. Los suplementos dietéticos funcionan como antioxidantes mediante diversas formas, neutralizando radicales libres o bien potencializando la actividad endógena de otra molécula o de algunas enzimas que tengan la capacidad antioxidante tal es el caso de las fitoalexinas. Los antioxidantes endógenos juegan un papel crítico en el mantenimiento

de funciones celulares óptimas y por lo tanto, en la salud y el bienestar sistémico. Sin embargo, en condiciones que soportan el estrés oxidativo los antioxidantes endógenos no son suficiente y los antioxidantes de la dieta pueden ser necesarios para mantener las funciones celulares óptimas. Aunado a esto, enzimas como la superóxido dismutasa y catalasa juegan un papel fundamental en el mantenimiento de funciones celulares óptimas evitando la sobreproducción de radicales libres (Kurutas, 2016).

3.9.1 Catalasa

Esta enzima se encuentra en todos los organismos vivos que están expuestos al oxígeno y su función es catalizar la descomposición de radicales libres como el peróxido de hidrógeno para formar moléculas de agua y oxígeno (Figura 4). El desempeño de esta enzima es excepcional puesto que puede convertir millones de moléculas de peróxido de hidrógeno a las moléculas anteriormente mencionadas. A nivel celular, se encuentra localizada en mitocondrias y peroxisomas excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. (Nabi, 2014).

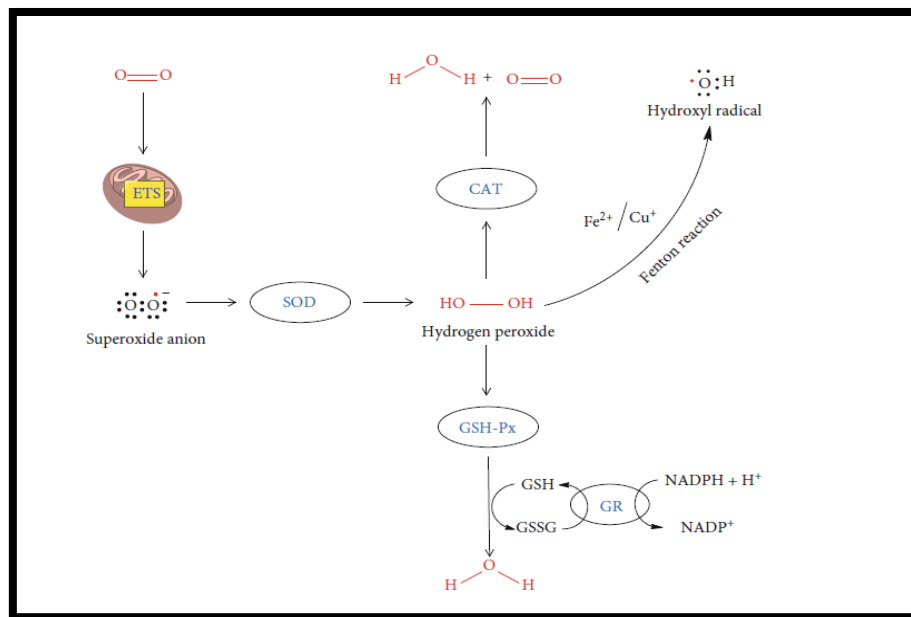


Figura 4: Mecanismo de acción sobre los radicales libres de la catalasa (Nandi y col., 2019).

3.9.2 Superóxido Dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es uno de los antioxidantes enzimáticos más potentes a nivel celular y existen tres isoformas de SOD en el organismo; Cu/Zn-SOD citosólico, Mn-SOD mitocondrial y Cu/Zn SOD extracelular (Cuadro 2). Su principal función es catalizar la conversión de los aniones superóxido en dióxígeno y peróxido de hidrogeno para que posteriormente el peróxido de hidrogeno sea eliminado mediante la acción de la catalasa (Kurutas, 2016).

La SOD neutraliza los iones superóxido al pasar por ciclos sucesivos oxidativos y reductores de iones metálicos de transición en su sitio activo. Esta enzima cataliza específicamente la dismutación del anión superóxido generando moléculas oxígeno y agua (Kurutas, 2016).

Cuadro 2: Principales isoformas de superóxido dismutasa, composición y localización (Fukai y Ushio-Fukai, 2011).

Isoforma	Características	Metal de cofactor	Proteína relacionada con el suministro del metal	Ubicación
SOD 1 (Cu/ZnSOD)	32kDa, homodímero	Cu ²⁺ (Catalítica) Zn ²⁺ (Estabilidad)	CCS, GSH Desconocida	Citoplasma y espacio intermembranoso mitocondrial
SOD 2 (MnSOD)	96kDa, homotetramero	Mn ³⁺ (Catalítica)	Desconocida	Matriz mitocondrial
SOD3 (ecSOD)	135 kDa, homotretamerica	Cu ²⁺ (Catalítica) Zn ²⁺ (Estabilidad)	Atox, ATP7A (MNK, Menkes ATPasa) Desconocida	Matriz extracelular, superficie celular y fluidos extracelulares

Tanto la catalasa como la superóxido dismutasa se encargan que el estado redox celular mantenga un equilibrio constante, si este equilibrio se altera y estas enzimas se ven superadas, por lo tanto, es necesaria la administración de antioxidantes no enzimáticos de origen exógeno para poder contrarrestar el daño que pueda generarse (Kurutas, 2016).

3.9.3 Antioxidante exógeno: el resveratrol

El resveratrol es un polifenol natural y una fitoalexina que se encuentra en una amplia variedad de fuentes alimenticias como las uvas, ciruelas, cacahuates, vinos tintos y en menor cantidad en vinos blancos. Desde el punto de vista químico, este antioxidante existe en forma cis y trans isómero, sin embargo, la forma trans es la más predominante, presentan una mayor estabilidad estructural y funcional si se protege de ciertos ambientes como el pH alto y luz. Posee una amplia variedad de beneficios por los cuales su consumo es ampliamente recomendado. Interviene en la regulación del metabolismo de los lípidos de baja densidad (LDL), brinda protección cardiovascular, interviene en la vasodilatación arterial mediada por óxido nítrico (NO) y, sobre todo, posee gran efecto antioxidante (Figura 5) (Alarcón y Villegas., 2007).

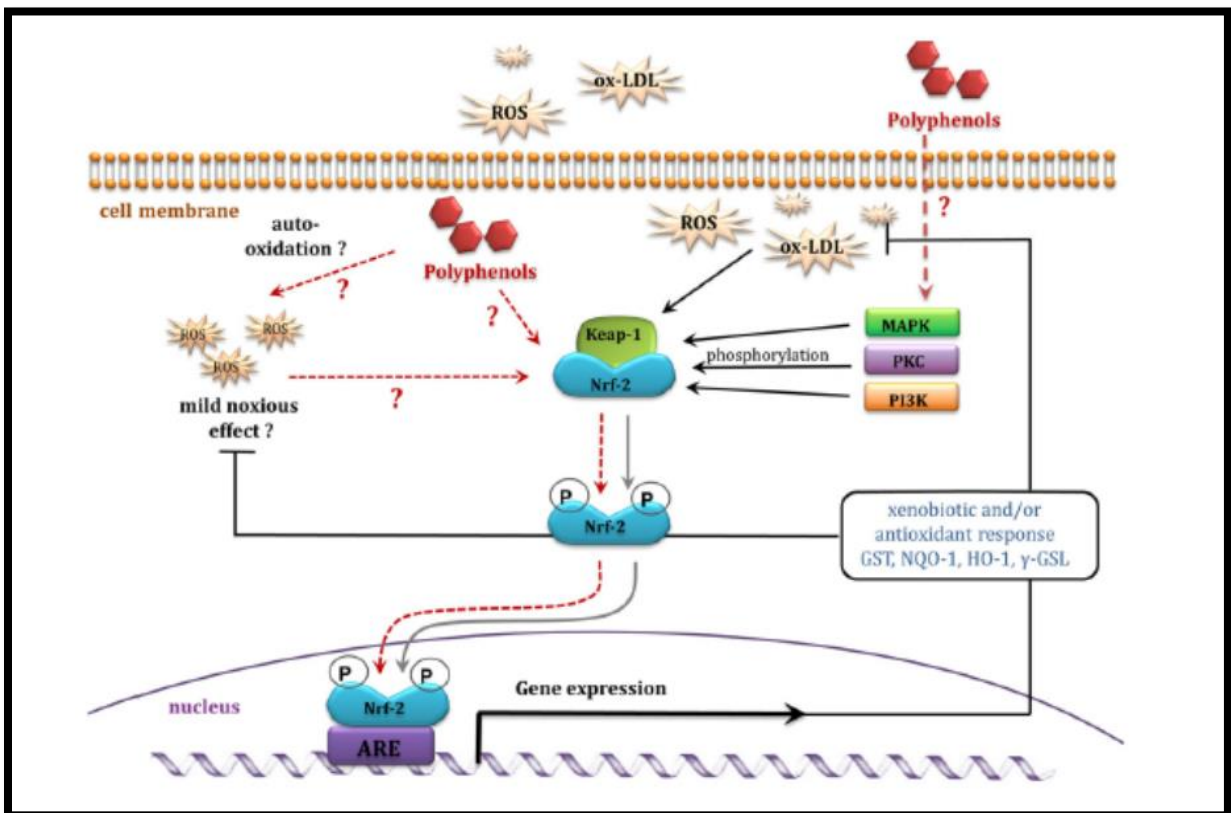


Figura 5: Mecanismo de acción antioxidante de un polifenol mediado a través de la expresión génica. (Goszcz y col., 2017).

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede inducir a la modificación funcional de las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos). El daño al ADN por estos radicales libres da lugar a mutagénesis, oncogénesis y un acelerado envejecimiento (Alarcón y Villegas., 2007).

La función fisiológica antioxidante del resveratrol se lleva a cabo por tres mecanismos: el primero es por competencia con la coenzima Q que permite disminuir el complejo enzimático de la cadena respiratoria, sitio donde se lleva a cabo la mayor formación de ROS, fungiendo como almacén de moléculas radicalarias de oxígeno formado en las mitocondrias para evitar que las moléculas interactúen con nutrimentos o bases nitrogenadas del ADN y mediante la inhibición de la peroxidación lipídica inducida por los productos de la reacción de Fenton y además, promueve la actividad de una variedad de enzimas antioxidantes (Figura 6)(Alarcón y Villegas., 2007).

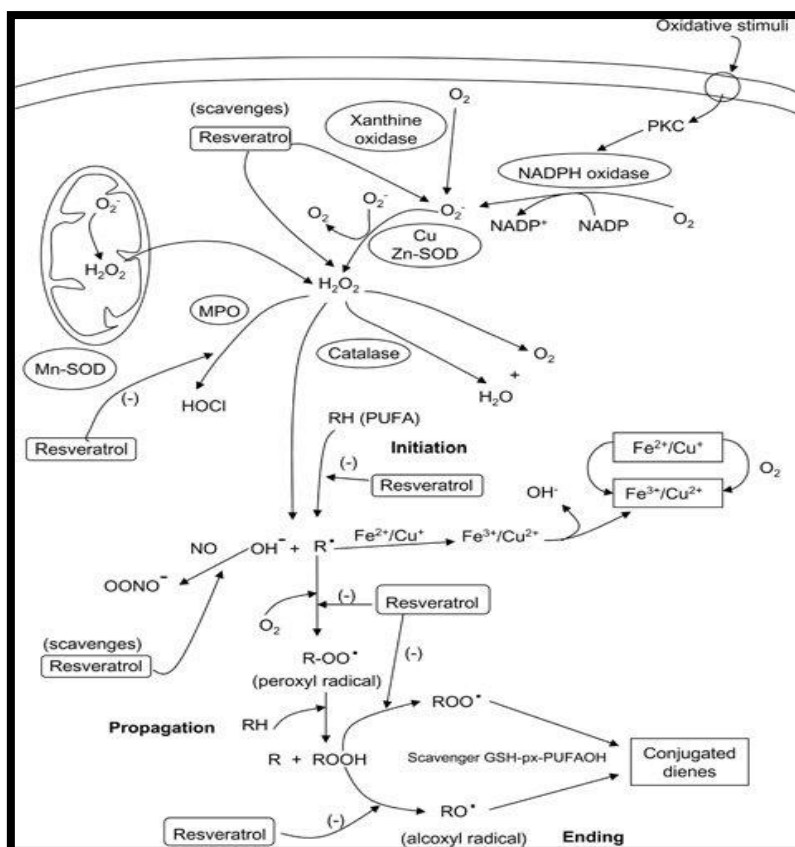


Figura 6: Acción del resveratrol sobre radicales libres actuando como segundo mensajero promoviendo la actividad enzimática antioxidante (Alarcón y Villegas., 2007).

IV. JUSTIFICACIÓN

El consumo excesivo de alcohol es un problema de salud pública a nivel mundial representa un factor de riesgo importante para la prevención de enfermedades crónicas hepáticas y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo a causa de los efectos secundarios generados por esta sustancia.

Tanto el etanol como sus metabolitos, son causantes de inducir a estrés oxidativo mediante la síntesis de sustancias altamente tóxicas y nocivas para las células. Debido a esto, la administración de agentes antioxidantes de origen exógeno como los polifenoles, permiten disminuir el efecto tóxico de los metabolitos generados por la oxidación celular y previenen el daño hepático crónico inducido por etanol. El resveratrol es un potente antioxidante que pertenece al grupo de dichos polifenoles y se sabe que posee una amplia variedad de efectos benéficos a nivel hepático.

Por esta razón, es importante analizar el efecto funcional de este componente sobre el estrés oxidativo producido por etanol, así como el efecto antagónico que tiene este antioxidante sobre el óxido nítrico y confirmar si el resveratrol cumple una función hepatoprotectora aun en concentraciones elevadas de etanol en sangre.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

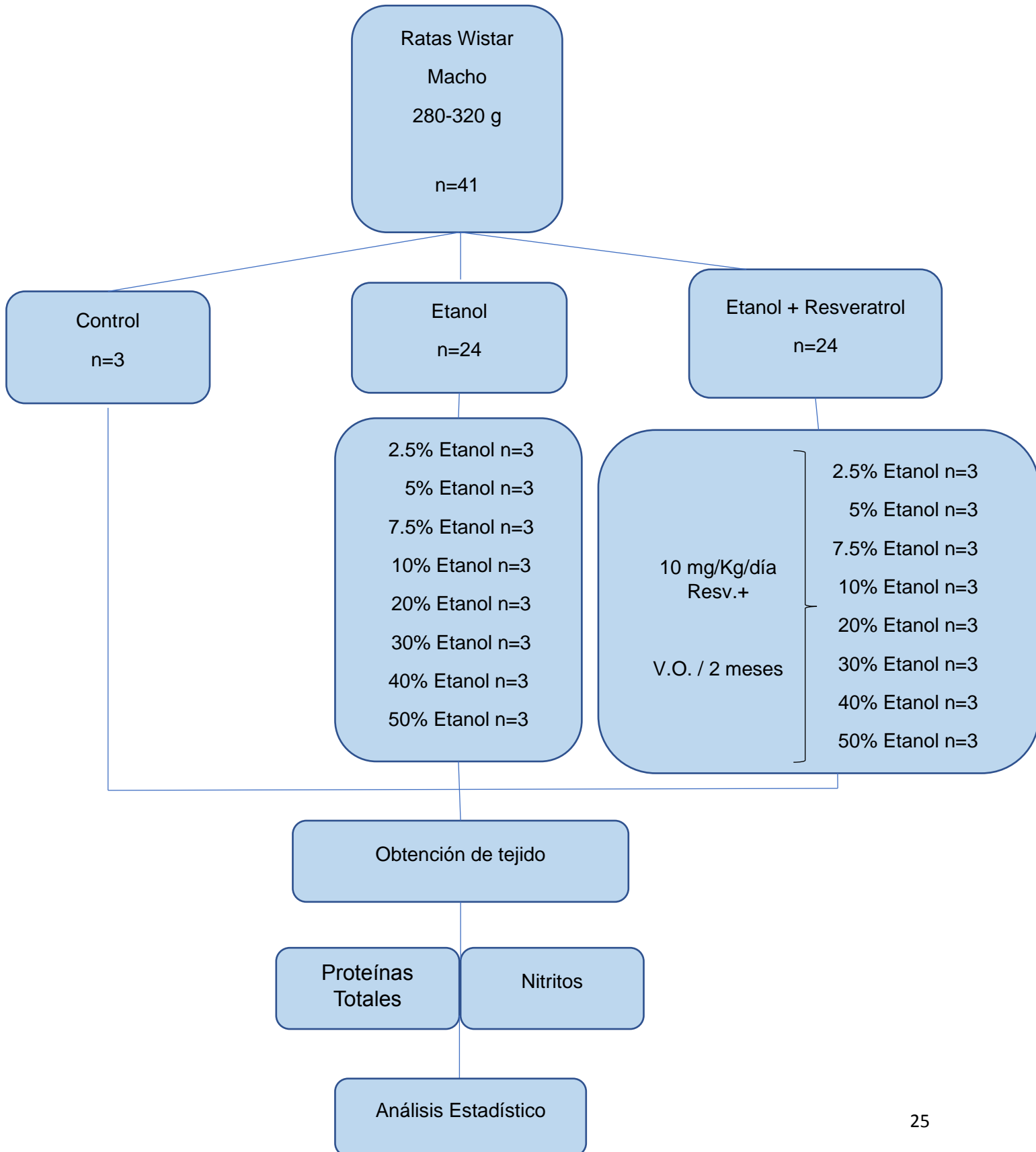
Determinar el efecto antioxidante del resveratrol sobre el estrés oxidativo en hígado de ratas administradas con etanol.

5.2 Objetivo específico

- Comparar los niveles de óxido nítrico en hepatocitos de ratas de la cepa Wistar en los grupos control, etanol y resveratrol.

VI. METODOLOGÍA

1. Diagrama general de trabajo



2. Recursos materiales

2.1 Material

Material de vidrio.

Todo el necesario para cada una de las determinaciones.

Reactivos:

Reactivos grado analítico.

El necesario para cada una de las determinaciones.

3. Cuadro de métodos

	Técnica	Referencia
Análisis bioquímico	Cuantificación de Proteínas Totales	(Sedmak & Grossberg, 1977)
	Cuantificación de nitritos	(Tsikas, 2006)

4. Administración de animales

Se utilizaron 41 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad con un peso aproximado de 280-320g, que se obtuvieron del bioterio Claude Bernard, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas, temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con acceso de agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron divididos al azar en 17 grupos: un grupo control, un grupo etanol subdividido en ocho diferentes concentraciones de etanol: 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 y 50% y ocho subgrupos administrados con resveratrol más su respectivo vehículo (10 mg/kg/día + vehículo). El tratamiento tuvo una duración de 2 meses. La administración se realizó para todos los grupos por vía oral mediante una cánula esofágica. Para la administración de resveratrol se realizó la solución en un vehículo de agua-etanol a 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 y 50% según corresponda, en una concentración de 5mg/mL. Las ratas fueron sacrificadas mediante el uso de Ketamina / Xilazina en una dosis de 0.2mL / 100g de peso, el hígado fue disecado y almacenado a 70°C para la determinación de nitritos como una forma indirecta de analizar los niveles de óxido nítrico. Los procedimientos para la obtención de los tejidos se basaron en la Norma Oficial Mexicana NOM-62-ZOO-1999 y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, minimizando el sufrimiento innecesario de los animales que fueron utilizados para el presente estudio. (Fuentes Paredes, 2010).

4.1 Cuantificación de nitritos

La determinación de óxido nítrico se realizó mediante el contenido de ion nitrito (NO_2^-) del sobrenadante que se obtuvo por el método de Griess (Tsikas, 2007). La reacción de colorimetría fue promovida por la adición de 100 μL de sobrenadante + 100 μL del reactivo de Griess y 800 μL de H_2O . El resultado de la reacción se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm. Los niveles de NO_2^- se determinaron interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar determinada para el ensayo.

4.2 Cuantificación de proteínas totales

La determinación de proteínas se realizó mediante el método de (Sedmak & Grossberg, 1997), utilizando albumina sérica bovina como proteína estándar. Las proteínas fueron cuantificadas en 2 μL del sobrenadante más 500 μL del reactivo de color (azul de Coomassie 0.06% a 465 nm) llevando a 1 ml. con agua destilada. El resultado de la concentración de proteínas se cuantificó interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de albumina de suero bovina para el ensayo.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

7.1 Efecto antioxidante del resveratrol en las concentraciones de nitritos en el estrés oxidativo inducido por etanol en hígado de rata de la cepa Wistar.

Para determinar el efecto antioxidante del resveratrol sobre el estrés oxidativo, se analizaron las concentraciones de la producción de nitritos como un método indirecto de la producción de NO, debido a que la vida media de este componente es de 6 a 9 segundos y posterior a ello es oxidado rápidamente a través de mecanismos enzimáticos dando lugar a la síntesis de nitratos y nitritos. Los cambios en las concentraciones de este marcador se analizaron una vez concluido el tratamiento cuya duración fue de 2 meses. El tamaño de la muestra fue de 41 ratas de la cepa Wistar dividida en 3 grupos conformados por el grupo control, etanol y resveratrol más alcohol, estos a su vez fueron subdivididos en las distintas concentraciones de etanol que fueron administrados desde un porcentaje que parte desde 2.5% hasta 50% de etanol más 10 mg/kg/día de resveratrol. En el grupo control la concentración de nitritos fue de 2.2893 $\mu\text{M}/\text{mg PT}$, de tal manera que se determinó que los grupos administrados con 2.5% de etanol (Figura 7A) estadísticamente no muestran diferencias significativas.

De acuerdo con el autor Conde de la Rosa y col, 2008, el consumo crónico de etanol aumenta significativamente la producción de especies tóxicas y reactivas para las células como el peroxinitrito, un compuesto derivado del óxido nítrico. Estas moléculas generan cambios en el estado redox induciendo estrés oxidativo y produciendo daños en diversos órganos, principalmente a nivel hepático. Debido a ello, se decidió analizar los niveles de óxido nítrico en hepatocitos de ratas administradas con etanol, utilizando tanto bajos (2.5%) como altos (50%) porcentajes de esta sustancia. Posteriormente fueron comparadas con las concentraciones del grupo de ratas administradas con el antioxidante utilizado para el presente estudio, de tal forma que permitiera identificar qué porcentaje de etanol administrado está produciendo mayor cantidad de estrés oxidativo en las células y a su vez determinar que efectivamente este antioxidante tiene un efecto favorable sobre los niveles de este biomarcador.

Como se puede observar en las concentraciones de etanol al 2.5%, no se generaron cambios significativos en los niveles de nitritos en ninguno de los 3 grupos, ya que las concentraciones que se muestran, indican que el resveratrol a esta concentración no ejerce algún efecto benéfico sobre los niveles de nitritos.

En el grupo de etanol que fue administrado con una concentración de 5% (Figura 7B), muestra un incremento en las concentraciones de nitritos de $226.69 \pm 110.17\%$ con respecto al grupo control, indicando que existen diferencias significativas al ser comparados ambos grupos, mientras que el grupo que fue administrado con resveratrol más 5% de etanol como vehículo, incrementó $161.46 \pm 50.54\%$ sin embargo no mostró diferencia significativa cuando fue comparado con el grupo control. De igual forma, cuando se realizó una comparativa entre el grupo resveratrol con el grupo etanol, no mostraron diferencias significativas. Por tanto, el efecto antioxidante del resveratrol sobre una concentración del 5% de etanol administrado no muestra cambios favorables esperados en los niveles de nitritos, sino todo lo contrario, las concentraciones de este marcador aumentaron.

En una concentración de 7.5%, (Figura 7C), se encontró un incremento del $226.82 \pm 191.69\%$ en los niveles de nitritos del grupo etanol con respecto al grupo que no fue administrado con algún tratamiento, aunque no hubo diferencias significativas cuando ambos grupos fueron comparados. Por otro lado, el grupo resveratrol expresó un incremento de $203.58 \pm 135.21\%$ sin mostrar diferencia estadísticamente significativa cuando fue comparado con el grupo control. A su vez, cuando se realizó la comparativa entre el grupo resveratrol con el grupo etanol no mostraron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Tanto en el grupo de etanol como el de resveratrol hubo incremento en los niveles de nitritos tomando como comparativa la gráfica de las concentraciones al 5%, lo que podría indicar que, a mayores concentraciones de etanol, el estrés oxidativo podría atenuar la función antioxidante de resveratrol disminuyendo su efecto biológico sobre los hepatocitos.

En la administración de 10%, las concentraciones de nitritos en el grupo de etanol aumentaron $352.20 \pm 319.74\%$ con respecto al grupo control, sin embargo, estadísticamente no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. Por otro lado,

hubo una disminución de $29.25 \pm 4.35\%$ en los niveles de nitritos del grupo resveratrol cuando se compararon con el grupo que no tuvo tratamiento alguno, por lo cual estadísticamente se encontró diferencia significativa. Cuando se realizó la comparativa del grupo etanol con el grupo resveratrol, se encontró que presentan diferencias significativas, ya que hubo una notable disminución de las concentraciones de nitritos en el grupo resveratrol con respecto a los niveles del grupo etanol (Figura 7D). Lo anteriormente mencionado permite inferir que las altas concentraciones de nitritos en el grupo etanol demuestran que las células hepáticas se encuentran en estado de estrés nitrosoactivo lo cual indica un alto riesgo de generar daño hepático, si esta tendencia sigue en aumento. Sin embargo, los niveles de nitritos en el grupo resveratrol disminuyeron considerablemente, lo que podría indicar que este polifenol está ejerciendo su efecto antioxidante y está tratando de revertir el estado de estrés oxidativo generado por el metabolismo del etanol.

A una concentración de 20% de etanol en las muestras biológicas del grupo etanol, se presentó una disminución en los niveles de nitritos de $85.14 \pm 28.64\%$ aunque no se encontró diferencia significativa entre dicho grupo y el grupo control. De igual manera, el grupo resveratrol, manifestó una disminución de $24.82 \pm 6.43\%$ con respecto al grupo control y un incremento de $1.949 \pm 0.65\%$ con respecto al grupo administrado con etanol y debido a ello, estadísticamente se encontró diferencia significativa entre estos grupos en sus respectivas comparativas (Figura 8E). Por consiguiente, el incremento del porcentaje de etanol utilizado en las muestras biológicas generó un incremento en los niveles de nitritos, principalmente en el grupo de resveratrol, debido a que posiblemente el antioxidante podría estar siendo inhibido por la toxicidad del etanol.

En una concentración de 30% de etanol, los niveles de nitritos disminuyeron $60.89 \pm 21.99\%$ al ser comparados con los niveles del grupo control, aunque no mostraron diferencia significativa (Figura 8F). En lo que respecta al grupo resveratrol, presentó un incremento de $208.65 \pm 86.50\%$ y $4.77 \pm 1.98\%$ al ser comparado con el grupo control y etanol respectivamente, encontrando diferencia significativa con ambos grupos. En estas concentraciones de etanol generó un reajuste en los niveles de nitritos en la cual, el grupo resveratrol elevó considerablemente las concentraciones

de los mismos a tal grado de sobrepasar los niveles del grupo etanol, deduciendo que el resveratrol no está ejerciendo su efecto antioxidante y hepatoprotector en estas concentraciones y las células están perdiendo la capacidad de regenerarse, ya no están respondiendo adecuadamente al tratamiento de tal manera que les permita poder contrarrestar el posible daño inducido por el etanol.

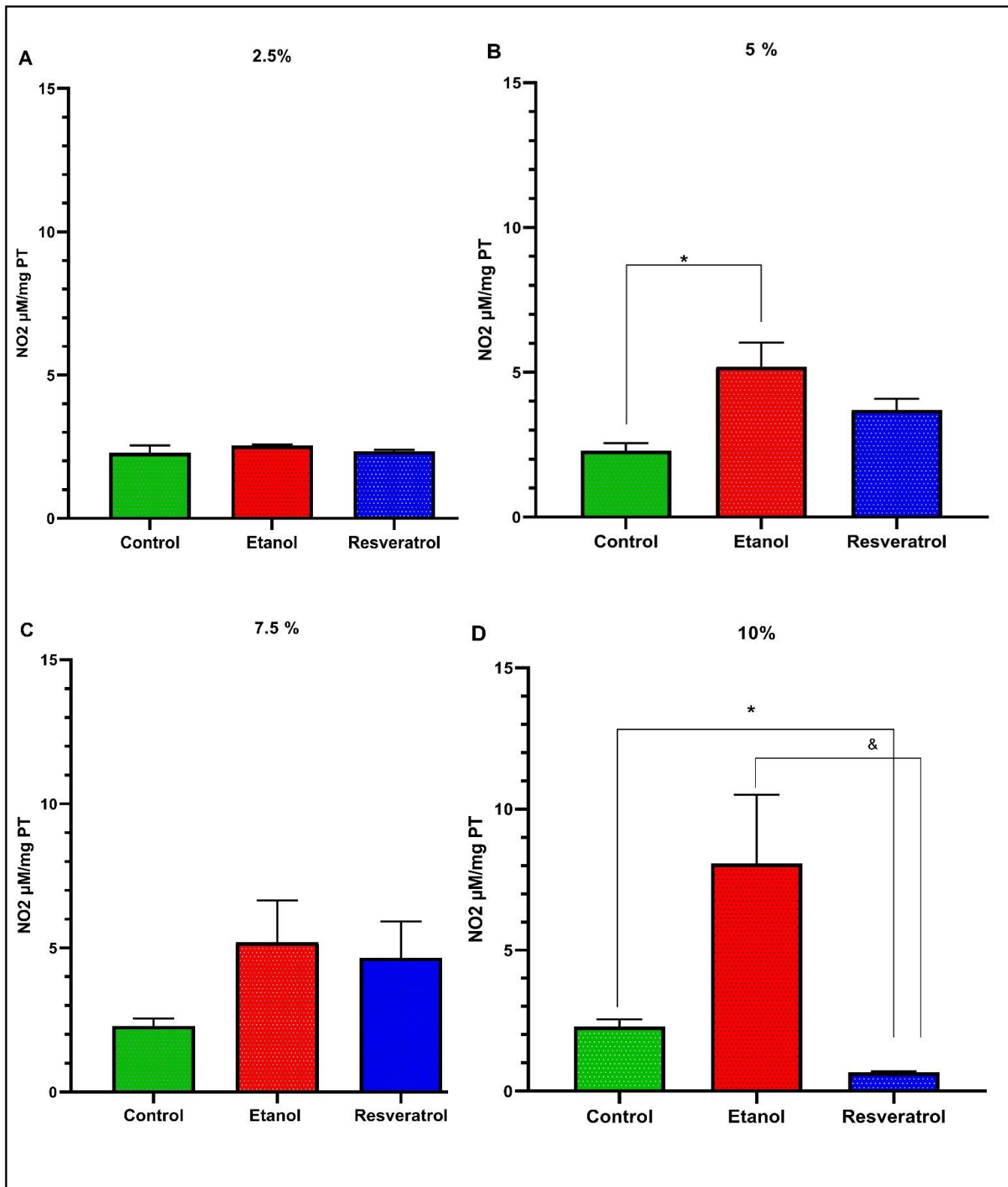
En el grupo que fue administrado con etanol al 40% expresó un incremento de $107.20 \pm 12.66\%$ al ser comparado con el grupo control y con respecto al grupo de resveratrol tuvo una disminución de 2.254 ± 0.29 , aunque en ninguna de las dos comparativas existió diferencia significativa. Del mismo modo el grupo resveratrol tuvo un incremento de $152.77 \pm 39.89\%$ con respecto al grupo control, sin embargo, estadísticamente tampoco hubo diferencia significativa. En las figura 8F y 8G, se puede comparar que las concentraciones de nitritos en el grupo resveratrol al 40%, disminuyó con respecto a las concentraciones de resveratrol al 30% posiblemente se debe a que el hígado presenta una capacidad de regeneración celular lo está permitiendo que los hepatocitos están tratando de contrarrestar el daño por las concentraciones elevadas de etanol administradas y evidentemente el resveratrol no está ejerciendo un evidente efecto protector contra el daño que se está produciendo.

En el último grupo el cual fue administrado con 50% de etanol, el grupo resveratrol muestra un incremento de $170.38 \pm 59.93\%$ con respecto al grupo control, aunque sin diferencia significativa entre estos grupos. En lo que respecta al grupo de etanol, expresa un incremento de $149.62 \pm 16.07\%$ por lo tanto estadísticamente existe diferencia significativa con respecto al grupo sin tratamiento. De igual manera, el grupo resveratrol tuvo un ligero incremento del $3.9 \pm 1.37\%$ con respecto al grupo etanol, no obstante, sin diferencia significativa entre ambos grupos. En la figura (Figura 8H), se puede observar que las concentraciones de nitritos en el grupo etanol incrementaron, pero resultaron ser más bajas que las concentraciones del grupo resveratrol, indicando que el efecto biológico de este componente fue superado por las concentraciones de alcohol y de alguna manera interfiriendo en su función antioxidante.

Por si fuera poco, se ha propuesto que el NO está involucrado en la etiología y la progresión de enfermedades hepáticas porque participa en muchos procesos en la

regulación homeostática, entre los mecanismos de defensa inmunológicos y el equilibrio redox, ya que el óxido nítrico sirve como precursor de diferentes moléculas altamente tóxicas para las células como el peroxinitrito y el radical hidroxilo, los cuales son resultado de la interacción con el anión superóxido mismos que tienen la capacidad de dañar la estructura fosfolipídica de la célula induciendo peroxidación lipídica. (Hon y Col., 2002)

Peiyuan y col. (2017) evaluaron la capacidad antioxidante del resveratrol sobre la enfermedad alcohólica hepática mediante la determinación de marcadores de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes, de tal forma que concluyeron que la administración de este polifenol de 250 mg/kg de peso corporal/día ejerce un efecto altamente efectivo sobre la hepatotoxicidad del etanol. Por lo tanto, las concentraciones de resveratrol que se utilizaron para el presente estudio no lograron que este antioxidante ejerciera su función biológica de forma evidente, ya que durante el proceso de estrés oxidativo inducido por etanol los niveles de óxido nítrico no disminuyeron de manera significativa.



*Figura 7: Efecto del resveratrol como antioxidante sobre los niveles de nitritos en bajas concentraciones. Evaluación de los niveles de Nitritos como una medida indirecta de la producción de óxido nítrico en diferentes concentraciones de etanol. Los datos indican la media \pm SEM para $n=3$ ratas analizadas por triplicado y mediante un análisis estadístico de ANOVA de una vía, seguida por una prueba de rango de Tukey donde *Indica $p<0.05$ con respecto al control. & Indica $p<0.05$ con respecto del grupo vehículo.*

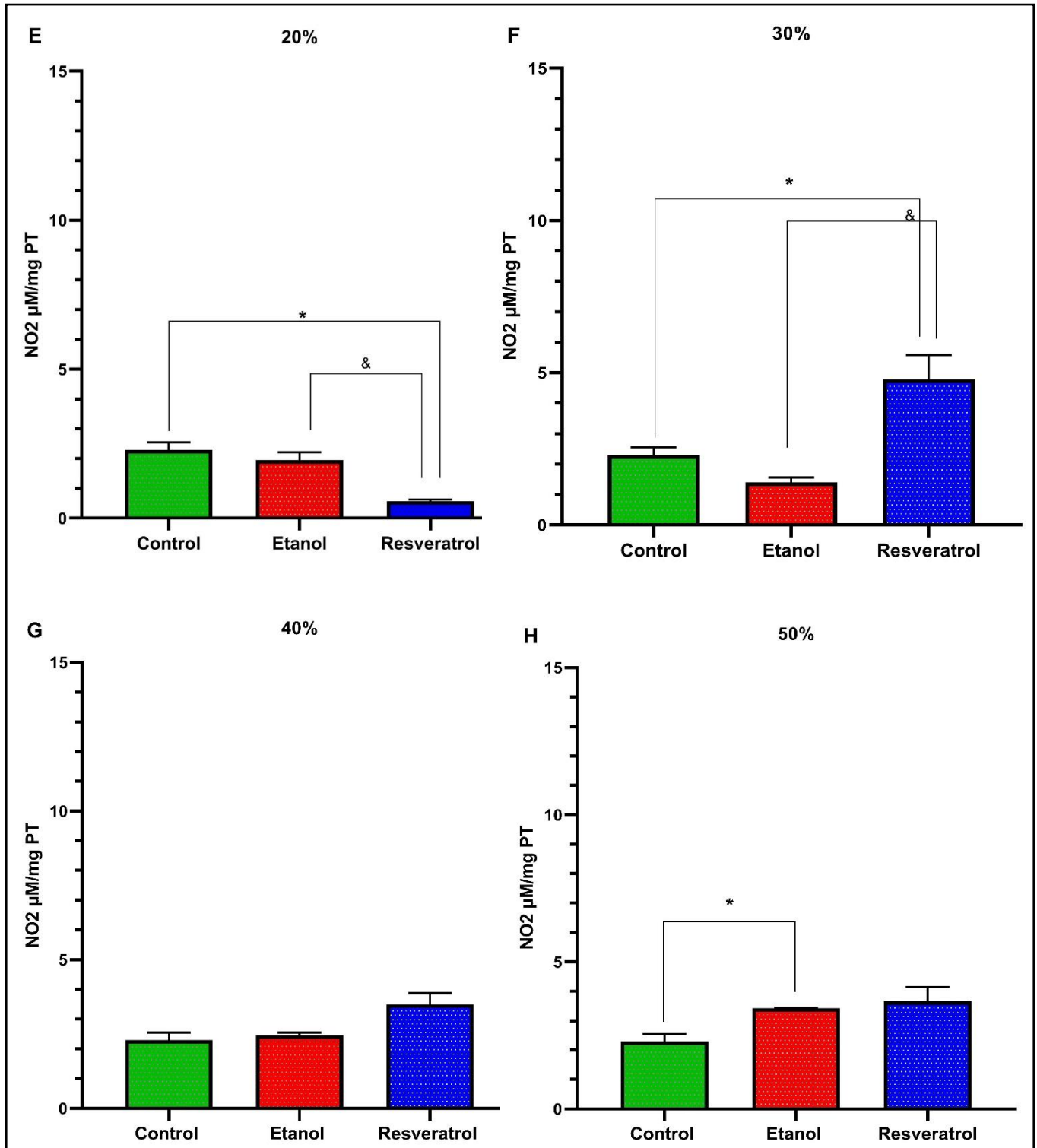


Figura 8: Efecto del resveratrol como antioxidante en los niveles de nitritos en altas concentraciones. Evaluación de los niveles de Nitritos como una medida indirecta de la producción de óxido nítrico en diferentes concentraciones de etanol. Los datos indican la media \pm SEM para $n=3$ ratas analizadas por triplicado y mediante un análisis estadístico de ANOVA de una vía, seguida por una prueba de rango de Tukey donde *Indica $p<0.05$ con respecto al control. & Indica $p<0.05$ con respecto del grupo vehículo.

VIII. CONCLUSIONES

El etanol induce a estrés oxidativo de forma creciente a partir de concentraciones del 5%, aunque debido a la función biológica del resveratrol, en los grupos administrados a partir de 10% y 20% de esta sustancia, disminuyen considerablemente los niveles de nitritos, lo cual indica que tiene un efecto favorable sobre los niveles de este metabolito desde esas concentraciones.

La administración de concentraciones de etanol a partir del 30%, tienen un efecto adverso y significativo sobre los nitritos, observando un incremento considerable incluso en los grupos administrados con resveratrol. Debido a esto, hay poca respuesta por parte del hepatocito y la función biológica del antioxidante no es tan eficiente en comparación con los grupos administrados de etanol en bajas concentraciones.

Por lo tanto, se concluye que el efecto antioxidante del resveratrol en hepatocitos durante el proceso de estrés oxidativo inducido por etanol, es efectivo en concentraciones bajas de este compuesto, ya que en porcentajes a partir del 30% presenta un efecto adverso, al incrementar los niveles de nitritos y aumentando el riesgo de daño hepático de forma progresiva y acelerada, sin embargo, falta realizar un análisis más exhaustivo de otros marcadores de estrés oxidativo que permitan complementar más la información obtenida.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

Llevar a cabo una evaluación de marcadores de peroxidación lipídica como malondialdehído y 4- hidroxialquenos, a fin de analizar los cambios generados durante el tratamiento sobre estos metabolitos.

Evaluar la actividad enzimática de la enzima superóxido dismutasa y catalasa en hepatocitos, que permita afirmar que el resveratrol ejerce una función benéfica sobre estas enzimas antioxidantes.

Realizar un análisis de cortes histológicos en hígado de ratas administradas con etanol para observar las posibles alteraciones generadas en el tejido a consecuencia del estrés oxidativo generado.

Llevar a cabo un estudio con mayores porcentajes de etanol administrados en hígado de rata por un mayor periodo de tiempo de manera que permita analizar el comportamiento de este antioxidante en concentraciones por arriba del 50% de etanol administrado.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahumada C., Guadalupe, J., Enrique, M., & Fuerte, E. (2017). Redalyc. EL CONSUMO DE ALCOHOL COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA. *Revista Ra Ximhai*, 13(2), 24.
2. Alarcón De La Lastra, C., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 35, pp. 1156–1160).
3. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Landes Bioscience.
4. Beier, J. I., & McClain, C. J. (2010). Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biological chemistry*, 391(11), 1249–1264.
5. Cederbaum, A. I. (2001). Introduction - Serial review: Alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(12), 1524–1526.
6. Cesaratto, L., Vascotto, C., Calligaris, S., & Tell, G. (2004). The importance of redox state in liver damage. *Annals of Hepatology: Official Journal of the Mexican Association of Hepatology*.
7. Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press.
8. Conde de la Rosa, L., Moshage, H., & Nieto, N. (2008). Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(3).
9. Elvir Mairena J.R., (1994). Alcoholismo y Daño hepático, 76–82. Recuperado de: <http://www.bvs.hn/>.
10. Fuentes Paredes, F., Yanavilca, M., Amelia, R., Rivera Rodríguez, R., Márquez, V., & Dante, M. (2010). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos.

11. Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*.
12. Galicia-Moreno, M., & Gutiérrez-Reyes, G. (2014). Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(2), 135–144.
13. Goszcz, K., Duthie, G. G., Stewart, D., Leslie, S. J., & Megson, I. L. (2017). Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc.
14. Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge. (2002). *Free radicals in biology and medicine*, Tercera edición, Oxford University Inc., New York, 936 p.
15. Hall E. John. (2016). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. Barcelona, España: Elsevier.
16. Hon, W. M., Lee, K. H., & Khoo, H. E. (2002). Nitric oxide in liver diseases: Friend, foe, or just passerby? In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 962, pp. 275–295). New York Academy of Sciences.
17. Iwakiri, Y., & Kim, M. Y. (2015). Nitric oxide in liver diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 36(8), 524–536.
18. Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutrition Journal*. BioMed Central Ltd
19. Lazarte, R., Pavez, C., & Poniachik, J. (2016). Enfermedad hepática por alcohol. *Avances En Hepatología*, 27, 142–162.
20. Lieber C. S. (2003). Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 27(3), 220–231.

21. Moreno O, y Cortés, J. (2008). Nutrición y alcoholismo crónico. *Nutrición Hospitalaria*, 23 (Supl.2), 3-7. Recuperado en 09 de junio de 2020, de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S021216112008000600002&lng=es&tlng=es
22. Nabi, S. (2014). *Toxic effects of mercury*. *Toxic Effects of Mercury* (pp. 1–268). Springer India.
23. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
24. NOM-062-ZOO-1999. (1999), NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
25. Organización Mundial de la Salud Sistema de información global sobre alcohol y salud. (2014) (consultado el 30 de enero del 2020). Disponible en: <http://www.who.int/gho/alcohol/en/>
26. Paredes Salido, F., & Roca Fernández, J. (2002). Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(7), 96–100.
27. Pastor Encinas, I. J., & Inés Revuelta, S. (2008). Enfermedad hepática inducida por el alcohol. *Medicine*. Ediciones Doyma, S.L.
28. Peiyuan, H., Zhiping, H., Chengjun, S., Chunqing, W., Bingqing, L., & Imam, M. U. (2017). Resveratrol Ameliorates Experimental Alcoholic Liver Disease by Modulating Oxidative Stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
29. Roswall, N., & Weiderpass, E. (2015). Alcohol as a risk factor for cancer: Existing evidence in a global perspective. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. Korean Society for Preventive Medicine.
30. Sedmak, J. J., Grossberg, E. (1977). A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*. 79(1-2): 544-552.

31. Seitz, H. K., & Stickel, F. (2006). Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biological Chemistry*.
32. Trujillo, M. C. B., & Tovar, A. P. (2008). Óxido nítrico. *Revista Colombiana de Anestesiología*, 36(1), 45–52.
33. Tsikas, D. (2006). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*. 851(1): 51-70.
34. Villatoro-Velázquez J.A., Resendiz Escobar E., Mujica Salazar A., Breton-Cirett M., Cañas-Martínez V., Soto-Hernández I., Fregoso-Ito D., Fleiz-Bautista C-, Medina- Mora ME., Gutiérrez-Reyes J., Franco-Núñez A., Romero-Martínez M., & Mendoza-Alvarado L. (2016-2017). Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017. Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco, ENCODAT 2016-2017, 1, 190. 2020, De ENCODAT Base de datos.