

tor dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) que se convierte en su forma reducida (NADH). A su vez, la aldehidodeshidrogenasa capta otro átomo de hidrógeno del Ac, que le transforma en acetato, que también es transferido al NAD convirtiéndose en NADH. Con estas reacciones se produce un desequilibrio del sistema redox intracelular con aumento del índice NADH/NAD que es responsable de muchas de las alteraciones metabólicas que aparecen en los alcohólicos (hiperlactacidemia, acidosis láctica, cetosis, hiperuricemia, hipertrigliceridemia por atrapamiento de ácidos grasos, etc). Un exceso de Ac en el citosol, puede ser oxidado por vías alternativas, tales como la xantina oxidasa y la aldehidoxidasa con la producción de radical superóxido (6).

La segunda vía oxidativa del Et se localiza en los microsomas, es el sistema microsomal oxidante del Et (MEOS) y se activa cuando la concentración etílica es superior a 50-80 mg/dl ó cuando alcoholemias más moderadas son más persistentes. Este sistema está integrado por la NADPH-oxidasa, el sistema citocromo P-450IIE1 y el NADPH citocromo c reductasa, capaces de oxidar el Et a Ac. El aumento de actividad de NADPH-oxidasa, también da lugar a la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno (7). Por fotooxidación del peróxido de hidrógeno ó por reacciones tipo Fenton, en presencia de hierro, se produce radical hidroxilo, capaz de reaccionar con Et y producir sus formas radicales hidroxietil y etoxilo (8). Además se ha comprobado como pueden formarse RL de Et por mecanismos hidroxilo independientes, en los que interviene de forma activa el citocromo p-450IIE1.

La tercera vía oxidativa del Et es el sistema catalasa, que en presencia de peróxido de hidrógeno produce Ac y agua. La participación del peróxido de hidrógeno puede conducir a la formación de radical hidroxilo que como hemos visto es capaz de producir RL de Et y el Ac puede producir radical superóxido.

Las lesiones orgánicas producidas en el etilismo están mediadas por el efecto tóxico del Et y del Ac, pero en ellas también intervienen los RL de oxígeno y los del Et, cuya participación se demuestra por tres tipos de evidencias: a) comprobación de su formación y de productos derivados de sus

efectos, como el Malondialdehído, que es un derivado de la lipoperoxidación de las membranas celulares; b) demostración de consumo de sustancias antioxidantes endógenas; y c) efecto beneficioso de las sustancias antioxidantes. Por técnicas de "spin" resonancia electrónica espectroscópica se ha comprobado la formación de RL de oxígeno y de Et y también se ha comprobado la producción de malondialdehído y de hidroxinonenal. Además el Et disminuye los sistemas antioxidantes protectores contra los RL, tanto la superoxidodismutasa como el sistema del glutatión, con lo que se incrementa el cociente prooxidante/antioxidante a favor del primero (9). También se ha demostrado descenso de vitamina E, betacarotenos y vitamina A en pacientes alcohólicos. Los tratamientos con antioxidantes disminuyen las lesiones grasas hepáticas inducidas por Et (10) y la administración de metionina, precursor del glutatión, disminuye la peroxidación lipídica provocada por Et (11,12).

Además se ha comprobado que Et y Ac, alterando la membrana celular del hepatocito, activan la cascada del complemento y su fracción C5a, que es un potente factor quimiotáctico para neutrófilos (13) cuyo acúmulo y activación produce RL de oxígeno, capaces de atacar las moléculas de su entorno, lo que se ha observado en pacientes con hepatitis aguda alcohólica (14), en las que se comprueba anatomopatológicamente la importante infiltración de estas células (15). También se ha descrito la formación de factores quimiotácticos lipídicos en hepatocitos de ratas tratadas con Et que facilita el acúmulo de leucocitos (16).

En nuestro trabajo hemos observado aumento de RL secundario al estrés oxidativo desencadenado por el Et, aunque no ha alcanzado significación a la concentración 25 mM, que es inferior al desencadenado por el estímulo máximo que produce la fagocitosis de bacterias. También hemos observado una marcada citotoxicidad dosisdependiente, lo que ya había sido indicado por otros autores (17), y lo que podría intervenir, al menos en parte, en la leucopenia que padecen los alcohólicos, que es multifactorial, y en las lesiones producidas en otros órganos y tejidos (18).

## Bibliografía

- Bor S, Caymaz-Bor C, Tobey NA, Abdounour-Nakhoul, Marten E, Orlando RC. Effect of ethanol on the structure and function of rabbit esophageal epithelium. *Am J Physiol* 1998; 274: 819-26.
- Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA. Alcohol and cancer: *Recent Dev Alcohol* 1998; 14: 67-95.
- Zalusky R, Furie B. Hematologic complications of liver disease and alcoholism. In: *Hematology: Basic principles and practice*. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Eds (2ª Ed). Churchill Livingstone. New York 1995: 2096-103.
- Poli G. Liver damage due to free radicals. *Brit Med Bull* 1993; 49: 604-20.
- Rhote G, Oser A, Valet G. Dihydrorodamin 1.2.3.: A new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 1988; 75: 354-5.
- Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 303-8.
- Reinke LA. Spin trapping evidence for alcohol-associated oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 953-7.
- Albano E, Tomasi A, Person J, Terelius Y, Gorla-Gatti L, Ingelman-Sundberg M, et al. Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1) in catalysing the free radicals activation of aliphatic alcohols. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 1895-902.
- Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 737-43.
- Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 601-28.
- Wu D, Cederbaum AI. Ethanol cytotoxicity to a transfected Hep G2 cell line expressing human cytochrome P4502E1. *J Biol Chem* 1996; 271: 23914-9.
- Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 601-28.
- Walport M. Complement. In: *Immunology*. Roitt I, Brostoff J, Male D. Eds. (5ª Ed) London: Mosby International Ltd, 1998. p. 43-54.
- Jaeschke H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002; 27: 23-27.
- French SW. Alcoholic hepatitis: inflammatory cell-mediated hepatocellular injury. *Alcohol* 2002; 27: 43-6.
- Roll FJ, Alexander MA, Cua D, Swanson W, Perez HD. Metabolism of ethanol by rat hepatocytes results in generation of lipid chemotactic factor: studies using a cell-free system and role of oxygen-derived free radicals. *Arch Biochem Biophys* 1991; 287: 218-24.
- Higuchi H, Kurore I, Kato S, Miura S, Ishii H. Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20 (9 suppl.) 340A-346A.
- Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkovska J, Malbohan I, Stipek S, Mikulikova L, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci* 2001; 8: 59-70.

que consigue la oxidación de hasta un 20% del Et ingerido. La producción de dismotilidad gastrointestinal, con dispepsia y diarrea, también parece deberse al efecto tóxico sobre la mucosa digestiva. A los pocos minutos de su ingesta aparece en la sangre, donde alcanza su máxima concentración a los 30 minutos, disminuyendo progresivamente hasta las 3 ó 4 horas, en función de la capacidad de aclaramiento hepático, que normalmente es de 2 mmol/min. El contacto del Et con los eritrocitos, leucocitos y plaquetas produce defectos cualitativos y cuantitativos, por diferentes mecanismos, en estas células (3).

Las lesiones tisulares que se observan en la enfermedad alcohólica se ponen en marcha por los efectos tóxicos del Et y de su metabolito oxidativo acetaldehído (Ac), que llega a ser unas 30 veces más potente. Como consecuencia de la oxidación del Et (alcoholdehidrogenasa, citocromo P-450 II E1 y catalasa) y del Ac (acetaldehidodeshidrogenasa), se desencadena stress oxidativo (4), generador de radicales libres (RL) de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) y RL de Et (radical hidroxietil y etoxilo), que por su gran capacidad reactiva juegan un importante papel en la producción de las lesiones que aparecen en el hígado y en otros órganos y tejidos.

En el presente estudio hemos realizado un ensayo "in vitro" para comprobar el efecto del Et, a concentraciones finales 50 y 25 mM sobre el metabolismo oxidativo de los leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos) de sangre venosa periférica de un grupo de donantes sanos considerados no alcohólicos, por manifestar una ingesta etílica no superior a 30 gr/día, y se ha comparado con muestras de sangre consideradas control (sin estímulo) y con muestras incubadas con bacterias, que tras su fagocitosis, producen stress oxidativo máximo en estas células.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Preincubación de células:** en cada análisis se han utilizado 100 ml de sangre venosa total, heparinizada de donantes sanos. Cada muestra fue preincubada a 37 °C durante 30 minutos en baño de agua en ausencia (20 µl de Buffer fosfato salino: PBS) o presencia de Et (20 µl a concentración final 50 mM y 25 mM) o de bacterias (20 µl de concentrado de *E. coli*, estabilizadas y opsonizadas a  $2 \times 10^7$  bacterias/20 µl).

**Oxidación:** para marcar el estado oxidativo celular en reposo y en las muestras estimuladas con Et y bacterias, se añadió 20 µl de 1.2.3. dihidrorodamina (Orpegen-Pharma. Heidelberg. Germany) y se incubaron las muestras 10 minutos en baño de agua a 37 °C (5).

**Lisis y fijación celular:** para lisar los eritrocitos y fijar las reacciones leucocitarias se trataron con 2 ml de formaldehído disuelto en agua bidestilada en solución 1,5% y tras su agitación se mantuvieron 20 minutos a temperatura ambiente. Después fueron centrifugadas 5 minutos a 250 g a 4 °C y posteriormente lavadas con 3 ml de PBS y centrifugadas 5 minutos a 250 g, desechando el sobrenadante.

**Tinción del DNA:** las preparaciones fueron tratadas con 100 µl de yoduro de propidio en solución 40% e incubadas durante 15 minutos en baño de hielo.

**Citometría de flujo:** se utilizó un citómetro de flujo Ortho-Cyturon Absolute (*Ortho Diagnostic Systems*. Rantan. New Jersey. EE.UU.) con argón ión laser de 350 mW y ajustado a 488 nm de excitación. El número de células estudiadas por muestra fue de 15.000 y los datos fueron analizados con

Inmonocount II software. Versión 2.00. 1994. Las tres poblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos y granulocitos) fueron separadas en diferentes ventanas en función de su tamaño y complejidad citoplasmática. La distribución de la fluorescencia verde se realizó a través de histogramas (FL1) que separan claramente las poblaciones de células con fluorescencia positiva y negativa. Por análisis directo se obtiene el número y porcentaje de células fluorescentes, que se correlaciona con la oxidación producida en cada población celular.

**Toxicidad celular:** se valoró por el porcentaje de células que se distribuyeron en las tres ventanas, en relación con las 15.000 que forman la adquisición por muestra. Las células más desestructuradas se localizaron fuera de estas ventanas, lugar en el que aparecen los restos celulares desechados durante la técnica (debris).

**Análisis estadístico:** los datos obtenidos se presentan como media aritmética de los casos estudiados  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó aplicando el t-test de Student para muestras dependientes y la valoración "p" se consideró significativa cuando fue  $< 0,05$ . El software utilizado fue el monopost *Horus Hardware R-Sigma* versión 1990.

## RESULTADOS

El estudio fue realizado con muestras de sangre venosa de seis donantes sanos.

**Linfocitos:** En el grupo control de muestras preincubadas con PBS, el estado oxidativo en reposo, con células que mostraban fluorescencia verde positiva fue de  $1,15 \pm 0,65\%$ . Las preincubadas con Et 50 mM de  $9,19 \pm 3,02$  ( $p < 0,05$ ), con Et 25 mM de  $2,39 \pm 0,91\%$  (n.s.) y con bacterias  $1,2 \pm 0,3\%$  (n.s.).

**Monocitos:** En el grupo control preincubado con PBS ofrecían fluorescencia positiva el  $4,31 \pm 0,95\%$  de las células, el  $32,31 \pm 8,87\%$  ( $p < 0,05$ ) de las tratadas con Et 50 mM, el  $9,22 \pm 2,64\%$  (n.s.) con 25 mM y con bacterias el  $50,23 \pm 4,59\%$  ( $p < 0,05$ ).

**Granulocitos:** En el grupo control ofrecían fluorescencia positiva el  $3,82 \pm 0,66\%$ , el  $36,4 \pm 5,93\%$  ( $p < 0,05$ ) de las tratadas con Et 50 mM, el  $4,46 \pm 1,27\%$  (n.s.) con 25 mM y con bacterias  $90,07 \pm 1,6\%$  ( $p < 0,05$ ).

**Citotoxicidad:** En el grupo control, de las 15.000 células de adquisición, se distribuyeron en las tres ventanas celulares 14.045, que corresponde a una rentabilidad del 93,63%. En las muestras preincubadas con Et 50 mM el número de células fue de 8.889 con rentabilidad del 59,26% y citotoxicidad del 40,74%. En las preincubadas con Et 25 mM el número fue de 13.395 con rentabilidad de 89,3% y citotoxicidad del 10,7% y en las tratadas con bacterias, el 14.155 con rentabilidad del 94,36% y citotoxicidad de 5,64%.

## DISCUSIÓN

Para evitar el efecto tóxico del Et y de su metabolito Ac, el organismo dispone de una serie de mecanismos enzimáticos que conducen a la degradación de estos productos. Sin embargo, en estas reacciones de degradación, aparecen sustancias que también son tóxicas y puede jugar un papel importante en las lesiones orgánicas que sufren los enfermos alcohólicos. La alcoholdehidrogenasa es la responsable de la oxidación del Et a Ac, extrayéndole un átomo de hidrógeno que es transferido al cofac-

## Radicales libres y citotoxicidad del etanol en los leucocitos humanos de sangre venosa periférica

J. A. COLOMÉ PAVÓN, J. JORDÁ TORMO, G. FERNÁNDEZ REQUEIJO, R. SEGOVIANO MATEO, A. J. DÍAZ FERNÁNDEZ, D. ESPINÓS PÉREZ

*Hospital Clínico San Carlos. Servicio de Medicina Interna I y Cátedra de Patología Médica. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid*

FREE RADICALS AND CYTOTOXICITY OF ETHANOL OVER HUMAN LEUCOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD

### RESUMEN

**Introducción:** La ingesta de alcohol desencadena stress oxidativo generador de radicales libres de oxígeno y de etanol que, por su capacidad reactiva molecular, juegan un importante papel en la producción de las lesiones que aparecen en el hígado y en otros órganos y tejidos. Hemos realizado un estudio "in vitro" analizando el estado oxidativo en reposo y la explosión respiratoria desencadenada por Etanol, a concentraciones finales de 50 y 25 mM y por la fagocitosis de un concentrado de bacterias (E.coli) previamente opsonizadas, en los leucocitos humanos de sangre periférica de seis donantes sanos.

**Método:** Como marcador oxidativo hemos utilizado la 1.2.3. dihidrorodamina, (no fluorescente) cuya oxidación la transforma en rodamina que es fluorescente y se examina cuantitativamente por Citometría de flujo.

**Resultados:** El stress oxidativo máximo se alcanza con las bacterias en las células fagocíticas (monocitos 50% y granulocitos 90%) con diferencia significativa con respecto al grupo control. Con Etanol 50 mM se comprueba stress oxidativo con diferencia estadísticamente significativa en los tres tipos de células (linfocitos 9,19%, monocitos 32% y granulocitos 36%). A concentración 25 mM, aunque aumenta el estado oxidativo, no alcanza diferencia significativa (linfocitos 2,39%, monocitos 9,22% y granulocitos 4,46%). También hemos comprobado toxicidad celular que alcanza el 40,75% de las células con Etanol 50 mM, el 10,7% con Etanol 25 mM y el 5,65% con bacterias.

**Conclusión:** El stress oxidativo con producción de radicales libres de oxígeno y de etanol en los leucocitos y la citotoxicidad comprobada, pueden jugar un papel importante en el trastorno cualitativo y cuantitativo de estas células en los enfermos alcohólicos y en las lesiones producidas por este tóxico en otros órganos y tejidos.

**PALABRAS CLAVE:** Stress oxidativo. Radicales libres. Etanol. Citotoxicidad. Leucocitos.

### ABSTRACT

**Introduction:** The ingestion of alcohol produces oxydative stress generating free radicals of oxygen and ethanol. These free radicals have a molecular reactive ability and, therefore, they play an important role in the production of the injury which appears in the liver and in other organs and tissues. We have done an "in vitro" study where we analyse the oxydative status at rest and the respiratory explosion produced by ethanol at final concentrations of 50 and 25 mM and by the phagocytosis of a previously opsonized concentrate of bacteria (E.coli) in human leucocytes taken from peripheral blood of six healthy persons.

**Method:** We have used 1.2.3. dihydrorhodamine (non-fluorescent) as the oxydative marker because it is transformed in rhodamine (fluorescent), which is quantitatively studied by Flow Cytometry.

**Results:** The peak of oxydative stress is reached with the bacteria in the phagocytes (monocytes 50% and granulocytes 90%) and it has a significant difference with the control group. By adding ethanol at 50 mM we have seen an statistic significant difference in oxydative stress in the cells of all three types (lymphocytes 9.19%, monocytes 32% and granulocytes 36%). With a concentration of 25 mM of ethanol the oxydative stress is increased but without a significant difference (lymphocytes 2.39%, monocytes 9.22% and granulocytes 4.46%). We have also seen toxic cellular effect which reaches the 40.75% of cells with ethanol at 50 mM, the 10.7% with ethanol at 25 mM and the 5.65% with bacteria.

**Conclusion:** The oxydative stress caused by the production of oxygen and ethanol free radicals in the leucocytes, and the proved cytotoxic effect of ethanol may play an important role over the qualitative and the quantitative leucocyte disorder on different organs and tissues of the alcoholic patient.

**KEY WORDS:** Oxydative stress. Free radicals. Ethanol. Cytotoxic effect. Leucocytes.

*Colomé Pavón JA, Jordá Tormo J, Fernández Requeijo G, Segoviano Mateo R, Díaz Fernández AJ, Espinós Pérez D. Radicales libres y citotoxicidad del etanol en los leucocitos humanos de sangre venosa periférica. An Med Interna (Madrid) 2003; 20: 396-398.*

### INTRODUCCIÓN

El etanol (Et) es una sustancia muy soluble en agua y solventes orgánicos que cruza rápidamente las membranas celulares. Al ser ingerido, ya produce lesión en glándulas salivares

disminuyendo la cantidad de saliva y aumentando su viscosidad. Su paso por el esófago puede producir alteraciones de su motilidad, esofagitis (1) y carcinoma (2). En el estómago e intestino se absorbe por difusión pasiva e inicia su metabolismo merced a la existencia de una alcohol-deshidrogenasa gástrica,

*Trabajo aceptado:* 20 de marzo de 2003

*Correspondencia:* J. A. Colomé Pavón. Servicio de Medicina Interna I y Cátedra de Patología Médica. Hospital Clínico San Carlos. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. C/ Martín Lagos, s/n. 28040 Madrid.