



Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol

RESUMEN

Los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) son moléculas muy reactivas que pueden reaccionar con las macromoléculas de la célula y provocarle un daño irreversible. Dentro del hepatocito, el etanol es oxidado a acetaldehído por medio de tres sistemas: *a*) en el citosol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH); *b*) en el retículo endoplásmico por el citocromo P450 (CYP2E1), y *c*) en los peroxisomas por la enzima catalasa. El acetaldehído es oxidado en la mitocondria por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) para generar acetato. Las consecuencias metabólicas de la oxidación por el etanol incluyen una alteración del equilibrio redox citoplásmico y mitocondrial que genera alta producción de radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno, principalmente en la cadena respiratoria de las mitocondrias. La producción de éstos puede sobrepasar las defensas antioxidantes y ocasiona el llamado estrés oxidativo junto con estrés nitrosativo, ambos capaces de dañar a todos los componentes macromoleculares de la célula y provocar su muerte al activar el mecanismo de apoptosis.

Palabras clave: acetaldehído, estrés oxidativo, estrés nitrosativo, metabolismo del etanol, radicales libres.

Oxidative and Nitrosative Stress as Mechanism of Hepatocyte Damage Produced by Ethanol Metabolism

ABSTRACT

Free radicals derived from reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are highly reactive molecules, which usually reacts with cell macromolecules producing irreversible cell damage. Ethanol is oxidized to acetaldehyde within hepatocytes through three main systems: *a*) by alcohol dehydrogenase (ADH), an enzymatic reaction carried out in the cytosol; *b*) by cytochrome P450 (CYP2E1) within endoplasmic reticulum, and *c*) by catalase enzyme within the peroxisomes. Acetaldehyde is oxidized in the mitochondria by aldehyde dehydrogenase (ALDH) producing acetate. The metabolic sub-products derived from ethanol oxidation include an alteration of the redox balance; both at cytoplasm and mitochondria level, thus generating a high ROS and RNS production mainly at mitochondria's electron transport chain (or respiratory chain). ROS and RNS over-production can lead to oxidative/nitrosative stress with a high potential to damage macromolecular cell components inducing cell death through the activation of apoptosis mechanism.

Key words: oxidative stress, nitrosative stress, acetaldehyde, ethanol metabolism, free radicals.

Sergio Hernández-Rodríguez¹
José Gutiérrez-Salinas¹
Liliana García-Ortíz²
Paul Mondragón-Terán³
Sotero Ramírez-García⁴
Norma R Núñez-Ramos⁴

¹ Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica.

² División de Medicina Genómica.

³ Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, División de Investigación Biomédica. Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México DF.

⁴ Uromédica OSF.

Recibido: 30 de octubre 2013

Aceptado: febrero 2014

Correspondencia

Dr. José Gutiérrez-Salinas
Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental
División de Investigación Biomédica
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre
San Lorenzo 502, 2º piso
03100 México, DF
quauhtlicutli@yahoo.com

Este artículo debe citarse como

Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortíz L, Mondragón-Terán P y col. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. Med Int Mex 2014;30:295-308.

El alcoholismo es una enfermedad que se distingue por el consumo de alcohol (etanol) de manera aguda o crónica, y es uno de los principales problemas de salud pública mundial y causa importante de morbilidad y mortalidad en la población económicamente activa. Mientras que la ingestión moderada de pequeñas cantidades de etanol parece tener un efecto benéfico para la salud, en especial para el sistema cardiovascular, el consumo de grandes cantidades ejerce un efecto dañino para el hígado, el páncreas, el corazón y el sistema nervioso; además de que se ha reconocido su influencia en otro tipo de enfermedades como el cáncer.¹⁻⁴ El alcoholismo agudo es una de las primeras causas de muerte en la población adulta joven y la primera causa directa de accidentes de tránsito, así como de ausencia laboral y violencia urbana. Esto se traduce en pérdidas humanas y materiales que afectan directamente a la economía familiar y a la de un país en general.¹⁻⁴

El alcoholismo crónico es una de las principales causas de enfermedad hepática y representa un serio problema de salud pública mundial. Se describen tres tipos histológicos de daño hepático provocados por el etanol, que a menudo se superponen: a) hígado graso; b) hepatitis alcohólica y c) cirrosis hepática. El hígado graso se distingue por la acumulación de ácidos grasos en el hepatocito, que puede ser reversible y es posterior a la ingestión aguda de etanol. La hepatitis alcohólica puede ser reversible y se distingue por necrosis e inflamación del tejido hepático, mientras que en la cirrosis ya existe esclerosis pericentral en el lobulillo hepático con amplias zonas de necrosis y fibrosis.⁵⁻⁷

El principal sitio en donde se lleva a cabo el metabolismo del etanol es el hígado; sin embargo, algunos otros órganos también pueden metabolizarlo, lo que provoca daño local. En el

hígado, la principal vía metabólica para eliminar el etanol implica su oxidación a acetaldehído por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa localizada en el citosol. Otras vías de oxidación del etanol que se consideran menores existen en el retículo endoplásmico, sitio en el que actúa el citocromo P450-2E1 (CYP2E1), y la enzima catalasa en los peroxisomas.⁵⁻⁷

El acetaldehído obtenido de estas reacciones pasa a la mitocondria, donde es metabolizado por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y convertido en acetato.^{2,4,7,8} La oxidación del etanol a acetaldehído y de éste a acetato se lleva a cabo por medio de la reducción del NAD⁺ a NADH en el citosol y la mitocondria, respectivamente, lo que produce un importante cambio en el ambiente redox total de la célula que está relacionado con diversas alteraciones metabólicas, entre las que se encuentra la generación de un exceso de radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno, que constituyen agentes prooxidantes muy dañinos para el hepatocito.^{4,6-9}

Cuando en la célula ocurre un desequilibrio entre agentes prooxidantes y sistemas antioxidantes, se genera un proceso conocido como estrés oxidativo, que se distingue por exceso de especies reactivas llamadas radicales libres (principalmente derivadas del oxígeno y del nitrógeno), o por la disminución en los mecanismos de eliminación de radicales libres (llamados antioxidantes). Durante el estrés oxidativo, los radicales libres reaccionan con las principales macromoléculas de la célula, como son las proteínas, los ácidos grasos, los carbohidratos y los ácidos nucleicos (ADN y ARN) dañando su estructura y su función biológica. De esta manera, el estrés oxidativo afecta considerablemente la célula, alterando diversos procesos bioquímicos que derivan en la activación del mecanismo de muerte celular programada, conocida también como apoptosis.^{4,9-11}



Oxidación del etanol a acetaldehído

Una vez que se ingiere, el etanol pasa al sistema digestivo; 30% de él es absorbido por el estómago y el resto por el duodeno y el yeyuno; de ahí pasa al torrente sanguíneo a través de las venas que forman la vena porta y de esta manera llega al hígado. En el torrente sanguíneo el etanol se distribuye a todos los fluidos corporales, sus propiedades químicas le permiten atravesar libremente las membranas celulares. En el hígado se metaboliza 80 a 90% del etanol, mientras que sólo una mínima parte se oxida en otros órganos, como el tubo gastrointestinal, los pulmones, el riñón y el cerebro.^{4,7,11-14}

El etanol es oxidado por el hepatocito en dos pasos consecutivos: la conversión de etanol a acetaldehído y de este último a acetato.^{4,6,11-14}

En el hepatocito existen tres vías metabólicas que oxidan al etanol a acetaldehído: a) en el citosol por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa b) por el citocromo P450-2E1 (CYP2E1) localizado en el retículo endoplásmico y c) en los peroxisomas por medio de la enzima catalasa. El acetaldehído obtenido por esas tres vías es oxidado a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa de la mitocondria. El acetato así formado es liberado a la circulación general, en donde lo utiliza el resto de los tejidos y órganos.^{4,7,12-14} Además, aunque menos importante, se ha descrito una vía no oxidativa de etanol en la que este compuesto reacciona con ácidos grasos formando etil éster de ácidos grasos y fosfatidil etanol, que son compuestos sumamente tóxicos para diversos tipos celulares y tejidos.¹⁵

De los tres sistemas enzimáticos de oxidación del etanol descritos, la principal vía metabólica de eliminación del etanol en condiciones normales es la enzima alcohol deshidrogenasa, que junto con la enzima aldehído deshidrogenasa

se encarga de convertir cerca de 80 a 90% del etanol a acetato.^{7,13,14}

En la oxidación del etanol catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa se transfiere el hidrógeno del sustrato al cofactor NAD^+ , transformándolo en NADH y produciendo acetaldehído. El hecho de que aumente el cociente $\text{NADH}:\text{NAD}^+$ tiene repercusiones en el estado redox del hepatocito, porque crece el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que se considera un factor determinante del daño hepático generado por este tóxico.^{4,7,12-14}

La ingestión crónica de etanol promueve en el hepatocito la proliferación del retículo endoplásmico que potencia la capacidad de metabolizar etanol.^{13,15,18-20} Lo anterior se debe a que en el retículo endoplásmico existe la isoforma del citocromo P450 inducible por el etanol, que es el citocromo P450-2E1 (CYP4502E1), un sistema capaz de oxidar etanol y adaptarse a la administración crónica de éste. El citocromo P4502E1 utiliza NADPH y oxígeno molecular para oxidar el etanol en acetaldehído con producción de NADP^+ ; por lo que contribuye a alterar el equilibrio redox en la célula.¹⁴⁻¹⁸

Además, la catalasa que se localiza en los peroxisomas puede oxidar etanol usando una molécula de peróxido de hidrógeno; en condiciones fisiológicas, la oxidación del etanol por la catalasa no tiene un papel relevante en su eliminación; sin embargo, en el alcoholismo crónico parece tener un papel más destacado, principalmente en órganos extrahepáticos, como el sistema nervioso.¹³⁻¹⁸

El exceso de equivalentes reductores producidos durante la oxidación del etanol da lugar a toda una serie de trastornos metabólicos, como la estimulación de la lipogénesis que, junto con la disminución de la actividad del

ciclo del ácido cítrico y de la oxidación de ácidos grasos, favorece la acumulación de triglicéridos; lo que explicaría el depósito de vacuolas lipídicas observado en el citoplasma de los hepatocitos durante la esteatosis por consumo de etanol.^{5-7,11}

Oxidación del acetaldehído por la ALDH mitocondrial

El acetaldehído producido por las tres vías metabólicas descritas es metabolizado a acetato por la enzima acetaldehído deshidrogenasa, que en el hepatocito se encuentra en la mitocondria con baja afinidad por el acetaldehído (baja K_m , que es la afinidad que tiene la enzima por su sustrato, a medida que K_m es mayor, la afinidad es menor) y en el citoplasma (con alta K_m y cuyo papel fisiológico en el metabolismo del acetaldehído es de poca relevancia). Esta enzima necesita del NAD^+ como cofactor para oxidar al acetaldehído, por lo que las pozas internas de $NADH$ se incrementan dentro de la mitocondria.^{13-15,17-20}

En condiciones normales, una vez que se ingiere etanol, las concentraciones en plasma de acetaldehído son indetectables, porque existe adecuada actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa. En los alcohólicos crónicos, las concentraciones plasmáticas de acetaldehído son más elevadas debido a la menor actividad de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial; efecto que se correlaciona con la gravedad del daño hepático.^{13-15,20-22} Además, hay otras enzimas capaces de metabolizar el acetaldehído, como la xantina oxidasa (XO) y la aldehído oxidasa (AO). Se ha reportado que la baja afinidad de la xantina oxidasa para el acetaldehído es mayor de 30 mM, mientras que la de la aldehído oxidasa es de 1 mM; por tanto, es de prever que en concentraciones relativamente bajas de acetaldehído (200 μM), su metabolismo ocurra preferentemente vía $ALDH > AO > XO$.^{18,19,23,24}

Alteraciones metabólicas provocadas en el hepatocito por la oxidación del etanol

La oxidación del etanol aumenta la demanda de oxígeno por parte del hepatocito. Como producto directo de la oxidación del etanol a acetaldehído, se genera un exceso de equivalentes reductores en el citosol (donde se localiza la enzima alcohol deshidrogenasa que está oxidando al etanol). Estos equivalentes reductores no se pueden oxidar directamente en la mitocondria porque sus membranas son impermeables al $NADH$. Por ello el proceso de reoxidación mitocondrial del NAD^+ es indirecto y se lleva a cabo mediante los sistemas lanzadera-sustrato cuya función es llevar los reaccionantes reducidos de las deshidrogenasas desde el citosol a las mitocondrias, oxidarlos y, finalmente, transportarlos ya oxidados al citosol. Este proceso acrecienta importantemente el consumo de oxígeno en las mitocondrias; además, la oxidación del $NADH$ generada por la oxidación del etanol a acetaldehído por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa y éste último por vía de la enzima aldehído deshidrogenasa que está en la mitocondria estimula aún más el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria por el incremento de los equivalentes reductores y la alteración del equilibrio redox.^{4,7,9-12}

El aumento en el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria debido al metabolismo del etanol provoca la generación de especies químicas sumamente reactivas conocidas como radicales libres, que afectan de manera importante a las macromoléculas que están en la célula, además de interferir con su metabolismo y funciones generales al ocasionar una condición metabólica llamada estrés oxidativo y estrés nitrosante, que desencadena diversas alteraciones en los procesos bioquímicos de la célula que pueden terminar en la activación del proceso de apoptosis.^{4,7,19-22}



Radicales libres y estrés oxidativo-nitrosativo y antioxidantes

Se define como radical libre a un átomo, molécula o compuesto que contiene un electrón desapareado en su orbital exterior. Ese electrón le confiere gran inestabilidad y un alto poder oxidante o reductor, lo que los hace reaccionar de inmediato con otras moléculas o sustancias que estén cercanas para aparearse con ellas y lograr estabilidad. Para alcanzar un estado químico más estable, los radicales libres pueden robar un átomo de hidrógeno, ligarse químicamente a otra molécula, o actuar recíprocamente con otros radicales libres.²³⁻²⁶

Debido a que los radicales libres son entes químicos muy inestables, intentan equilibrarse reaccionando con otros átomos o moléculas cercanos, alterando así las biomoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etc.) en la célula cuando se producen dentro de ésta o son generados por fuentes externas a la misma. Se ha descrito que existen al menos cuatro formas principales de reacciones químicas que puede realizar un radical libre:

1. Robo de hidrógeno. En este mecanismo, el radical libre interactúa con otra molécula que funciona como un donador de hidrógeno. Como resultado, el radical libre se une a un átomo de hidrógeno y se hace más estable, mientras que el donante se convierte en un radical libre.
2. Adición. En este caso, el radical libre se une a una molécula más estable, lo que convierte a la molécula receptora en un radical libre.
3. Terminación. En donde dos radicales libres reaccionan entre sí para formar un compuesto más estable.

4. Desproporción. Consiste en que dos radicales libres idénticos entre sí reaccionan entre ellos mismos, pero uno actúa como donador y el otro como aceptor de electrones y, de esta manera, se forman dos moléculas más estables.

Los radicales libres de importancia para los seres vivos se clasifican de acuerdo con el tipo de átomo del que provienen (Cuadro 1). Así, existen radicales libres derivados del oxígeno (también llamados especies reactivas derivadas del oxígeno o ROS) y los radicales libres derivados del nitrógeno (también llamados especies reactivas derivadas del nitrógeno o RNS). A su vez, ambos muestran varios tipos de prorradicales, que son moléculas que, bajo ciertas circunstancias, pueden convertirse en radicales libres.^{12,23-27}

Radicales libres derivados del oxígeno

Un elemento químico frecuentemente implicado en la formación de radicales libres

Cuadro 1. Principales especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno y sus correspondientes prorradicales

Especies reactivas derivadas del oxígeno	
Radical libre	Prorradical
Superóxido (O_2^\bullet)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo (OH^\bullet)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Radical peroxilo ($R-O_2^\bullet$)	Ácido hipobromoso ($HOBr$)
Radical alcoxilo (RO^\bullet)	Ozono (O_3)
Hidroperoxilo (HO_2^\bullet)	Oxígeno singulete (1Ag)
Especies reactivas derivadas del nitrógeno	
Radical libre	Prorradical
Óxido nítrico (NO^\bullet)	Ácido nitroso (HNO_2)
Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet)	Catión nitrosilo (NO^+)
	Anión nitrosilo (NO^-)
	Tetróxido de dinitrógeno (N_2O_4)
	Trióxido de dinitrógeno (N_2O_3)
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Ácido peroxinitroso ($ONOOH$)
	Catión nitrilo (NO_2^\bullet)
	Alquil-peroxinitrito ($R-OONO$)

es el oxígeno. El oxígeno molecular (O_2) es esencial en la célula dado el papel que juega en la cadena respiratoria, pues es responsable de la producción de adenosín trifosfato (ATP), requerido para todas las funciones celulares. En la cadena respiratoria, la molécula de oxígeno puede aceptar un total de cuatro electrones y sus correspondientes protones, uno a la vez, lo que genera dos moléculas de agua. Durante este proceso, se forman consecutivamente radicales libres derivados de oxígeno como productos intermedios en la cadena respiratoria; sin embargo, debido a que son compuestos muy inestables y rápidamente pueden reaccionar agregando electrones o protones, se convierten en agua antes de que puedan dañar a la célula. De todo el oxígeno molecular que pasa por la cadena respiratoria, sólo 2 a 3% se transforma en radicales libres.²³⁻²⁷

La cadena respiratoria en las mitocondrias es la principal fuente de radicales libres derivados del oxígeno en el organismo; no obstante, existen otras reacciones de óxido-reducción localizadas en distintos organitos intracelulares y que son catalizadas por las enzimas NADPH reductasa, la xantino-oxidasa, la citocromo C reductasa y otras deshidrogenasas que también generan radicales. Los principales radicales libres derivados del oxígeno que se producen son el superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el radical peróxido ($O_2^=$), que normalmente existe como el prorradiel peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que proviene del $O_2^{\bullet-}$ y tiene la capacidad de formar radicales libres derivados del oxígeno cuando las condiciones le son favorables. El $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 son tóxicos para las células, el más reactivo y potencialmente más dañino es el radical hidroxilo, que puede generarse espontáneamente por dos reacciones catalizadas por un metal de transición en una reacción llamada de tipo Fenton, o a partir del H_2O_2 y del $O_2^{\bullet-}$, en una reacción de tipo Haber-Weiss.²³⁻²⁹

En condiciones extremas del metabolismo intermedio, la función y la integridad de las membranas mitocondriales se ven comprometidas por el "ataque" a los lípidos de la membrana originado por las especies reactivas derivadas de oxígeno, lo que puede ocasionar un escape de estas especies desde la mitocondria hacia el medio citoplasmático, acrecentando progresivamente el daño a la célula que puede expresarse como inactivación de enzimas que son esenciales en las rutas metabólicas; inducir mutaciones en el ADN, o cualquier otra alteración en los procesos biológicos de las células.^{23,25,30}

Radicales libres derivados del nitrógeno

El radical que más atención ha tenido en los últimos tiempos es el óxido nítrico (NO^{\bullet}). Es un gas sumamente difusible, soluble en lípidos y de vida corta, generado a partir de la conversión de L-arginina en L-citrulina a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual se conocen tres isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). La nNOS y la eNOS son enzimas constitutivas reguladas en relación con su actividad, mientras que la iNOS es regulada transcripcionalmente. Todas las enzimas óxido nítrico sintasa que se encuentran en los mamíferos son hemoproteínas que requieren nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y oxígeno para producir óxido nítrico, y usan flavín adenín dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN) como cofactores. El óxido nítrico media efectos fisiológicos cuando se produce en bajas cantidades; sin embargo, también está involucrado en la citotoxicidad cuando se genera en exceso.²⁶⁻³¹

Debido a que el óxido nítrico es un gas sumamente difusible y no puede ser almacenado en el organismo, cuando una célula lo produce escapa a través de la membrana celular y se difunde a las proximidades. Esa misma propiedad de atravesar las membranas permite al óxido nítrico afectar a



otras células sin necesidad de receptores en la superficie. Se trata, por tanto, de una molécula-señal que puede ser liberada desde cualquier parte de la célula y actuar sobre la misma célula que la produce o cualquier otra en las proximidades que pueda responder a ella.^{11-13,35-39} También esta molécula es sumamente reactiva para los centros hemo de las proteínas que controlan el tono vascular, por lo que tiene un papel muy importante en la regulación del calibre vascular controlado por este tipo de mecanismos.³¹⁻³⁶

Para lograr tal diversidad de efectos, el óxido nítrico puede unirse covalentemente a metales de transición o a los grupos tiol de los aminoácidos de las proteínas y producir moléculas “activadas” a las que la célula sea sensible.³¹⁻³⁶ Este tipo de moléculas puede modificar directamente la actividad de una enzima o receptor membranar que, bajo ciertas circunstancias, alteran la transcripción de una proteína determinada.^{23-25,30-36}

Además, en los medios intracelular y extracelular, si la producción de óxido nítrico es mayor a lo normal o continua, puede existir un “acercamiento” molecular entre éste y el oxígeno para formar nitrito y nitrato; este último reaccionaría rápidamente con el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para dar origen al peroxinitrito ($ONOO^-$), mismo que es una molécula sumamente reactiva capaz de hidroxilar o nitrosilar los grupos sulfhidrilos y tioéster de las proteínas y lípidos, lo que daña a la célula e induce la oxidación de lipoproteínas, fragmenta las moléculas de ADN, disminuye los sistemas antioxidantes de la célula y ocasiona nitración de proteínas clave en los sistemas de señalización inter e intracelulares, entre otras.³⁶⁻⁴⁰ El $ONOO^-$ crea un conjugado en equilibrio con su forma ácida ($ONOOH$), que se descompone en radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}). Este último es mucho más reactivo que el óxido nítrico y tiende a alterar rápidamente los grupos tiol de las proteínas, por lo que, junto con el OH^{\bullet} , son

una pareja de radicales libres muy tóxica para la célula.^{23,25,36-39}

Una vez que se forman los radicales libres, éstos “atacan” a las principales macromoléculas de la célula y modifican su estructura, actividad o ambas, que resulta en la alteración general de los organitos celulares. De esta forma, los radicales libres derivados del oxígeno peroxidizan los ácidos grasos de las membranas biológicas, lo que daña su fluidez y permeabilidad; además de que puede alterar la unión de enzimas y receptores a la membrana.^{23,25,38,39} Las especies reactivas de nitrógeno pueden nitrosilar diversas macromoléculas y alterar su estructura, como es el caso de las moléculas de ADN en donde provocan, junto con las especies reactivas de oxígeno, rotura de la cadena de nucleótidos; si el daño es extenso, la célula será incapaz de funcionar y morirá, ya sea por necrosis o apoptosis en donde la membrana celular y otros organelos son “atacados” por los radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno, poniendo en riesgo la integridad del tejido y, en su caso, el órgano afectado.³⁶⁻⁴¹

Antioxidantes

Debido a que los radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno se originan naturalmente durante los procesos metabólicos de la célula; ésta ha desarrollado diversos mecanismos de protección que previenen su formación o promueven la detoxificación. Un antioxidante es una estructura molecular capaz de prevenir o evitar la oxidación de otra molécula, ya sea por interacción y estabilización de especies reactivas o por la transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida. Los antioxidantes representan un grupo variado de elementos que tienen una función homeostática de gran importancia, como es el control de las concentraciones fisiológicas de radicales libres, manteniéndolos por debajo de sus umbrales citotóxicos.^{23,25,42-44}

Los antioxidantes biológicos pueden dividirse en dos grandes grupos de moléculas: a) las que tienen una estructura compleja y elevado peso molecular, que constituyen el grupo de las enzimas antioxidantes; y b) antioxidantes de menor tamaño y peso molecular, entre los que se encuentran: vitaminas E y C, glutatión reducido (GSH), ácido úrico, carotenos, compuestos fenólicos, etc. A cada uno de ellos corresponde la estabilización de uno o más radicales libres en el compartimento celular adecuado.^{23,25-27,43-45}

Las enzimas conforman el grupo de compuestos con propiedades antioxidantes más importante; de ellas, se estudian principalmente la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPX), ya que actúan en sincronización para reducir o eliminar eficientemente a los radicales libres $O_2\bullet^-$ y al H_2O_2 para transformarlos en agua y oxígeno. Al mismo tiempo, estas enzimas evitan la interacción entre los anteriores radicales libres en presencia o ausencia de metales de transición y, así, inhiben la producción del más reactivo, que es el radical hidroxilo que puede formarse a través de las reacciones tipo Haber-Weiss y Fenton. Al inhibir la formación de $O_2\bullet^-$ disminuye la probabilidad de la interacción entre esta molécula y el óxido nítrico, evitando la formación de ONOO \cdot y otros radicales libres.^{23,25-27,43-45}

La superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa son las enzimas antioxidantes más importantes que juegan un papel muy destacado como sistemas de desintoxicación dentro de las células, particularmente en el hepatocito.²³⁻²⁶

La enzima superóxido dismutasa se encarga de la dismutación de radicales $O_2\bullet^-$ a H_2O_2 ; esta última molécula, aunque más estable, sigue teniendo una alta reactividad. Existen dos variantes moleculares de la enzima: Cu/Zn-SOD, localizada en el citosol con una variante extracelular;

y la Mn-SOD que se localiza en la mitocondria. Una vez producido el H_2O_2 , por acción de la superóxido dismutasa, entra en juego la catalasa, que se encarga de la dismutación y peroxidación de dos moléculas de H_2O_2 para producir oxígeno y agua. Por su parte, la glutatión peroxidasa elimina hidroperóxidos y peróxidos orgánicos (ROOH) al mismo tiempo que oxida su sustrato fisiológico, el glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Esta enzima muestra una afinidad disminuida para el H_2O_2 , se encarga de la degradación del H_2O_2 a concentraciones bajas y actúa como mecanismo complementario de la catalasa.²³⁻²⁶

Por su parte, las pequeñas moléculas antioxidantes, como las vitaminas C y E, el ácido úrico y el glutatión, entre otras, juegan un papel muy importante como antioxidantes celulares, porque el mecanismo de acción de algunas (por ejemplo, las vitaminas C y E y los β -carotenos) se basa en ser "atrapadores", lo que significa que interactúan directamente con ellas para neutralizarlas o disminuir su reactividad.^{23-27,39-45}

Cuando los mecanismos antioxidantes son insuficientes para contener a los radicales libres derivados del oxígeno o nitrógeno, se da lugar a una condición conocida como estrés oxidativo o estrés nitrosativo, que puede ser de tal magnitud que termine por afectar las funciones principales de la célula e inducir su muerte, ya sea por necrosis o por apoptosis.

Estrés oxidativo y nitrosativo en el hepatocito inducido por el etanol

En los seres vivos, la concentración de radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno es normalmente muy baja y rara vez adquiere valores lo suficientemente altos para provocar una reacción que altere a una molécula vecina. El equilibrio oxidativo del organismo humano es fundamental para la regulación metabólica, por



lo que si el equilibrio entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes se modifica a favor de los primeros, por la producción excesiva de radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno, junto con el debilitamiento de los sistemas antioxidantes, entonces se induce una situación conocida como estrés oxidativo o nitrosativo.^{10,23-27,38,42,43}

El estrés oxidativo es un término que está relacionado con el incremento en la producción de radicales libres derivados del oxígeno y con una baja protección antioxidante provocada por la disminución de las enzimas antioxidantes o de los antioxidantes de bajo peso molecular. Puede detectarse en la célula a través de la medición de los productos de las reacciones oxidativas que tienen los radicales con las macromoléculas (peroxidación lipídica, oxidación del ADN, oxidación de proteínas, etc.), mediante la reducción de moléculas antioxidantes o por la modificación de la actividad de las enzimas antioxidantes.^{23-27,42,43}

Una vez que se conoció la acción oxidativa del óxido nítrico y el hecho de que puede formar un oxidante altamente poderoso como el ONOO⁻ al unirse con el radical O₂•⁻, se ha vinculado invariablemente al estrés oxidativo con el estrés nitrosativo, que es un término que denota el exceso de radicales libres derivados del nitrógeno.^{25-28,42-45}

Los principales efectos citotóxicos generados por el estrés oxidativo-nitrosativo son consecuencia de la interacción de los radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno con los lípidos de las membranas celulares, las proteínas y los ácidos nucleicos. Uno de los daños más representativos es la peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas (por ejemplo: membrana celular, membranas mitocondriales, membrana del retículo endoplásmico, etc.).^{23-27,38,42-45} Los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las membranas biológicas son especialmente

vulnerables a la oxidación debido a que tienen en su estructura dobles enlaces C=C, lo que hace que sean extremadamente sensibles a la agresión de los radicales libres derivados del oxígeno y las especies reactivas no radicales. El proceso que resulta del ataque a los lípidos de membrana por parte de los radicales libres derivados del oxígeno se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación y tiene como producto final al malondialdehído (MDA).^{38,42-45} Éste tiene bajo peso molecular, es de carácter aldehídico y se genera como producto final durante la lipoperoxidación. La toxicidad del malondialdehído se debe a su alta reactividad con las proteínas y con el ADN, en donde forma productos modificados de las bases nitrogenadas como la pirimidopurinona, que es sumamente mutagénica y carcinogénica.⁴³⁻⁴⁵ Cuando se establece el estrés oxidativo-nitrosativo, el daño se observa inicialmente en las macromoléculas y posteriormente en la función de los distintos organitos intracelulares, y puede culminar en apoptosis, con la resultante muerte celular.^{4,38,43-45}

El consumo de etanol es un detonante muy importante para la generación de estrés oxidativo-nitrosativo en el hepatocito, y ya sea a corto o a largo plazo, puede desencadenar la muerte de la célula, el tejido y el organismo en general. Algunos factores que están involucrados en la generación de estrés oxidativo-nitrosativo por etanol son: 1) cambios en el estado redox intracelular como resultado del metabolismo oxidativo del etanol; 2) hipoxia celular, porque las alteraciones en el metabolismo redox afectan el consumo de oxígeno y la producción de adenosín trifosfato en la mitocondria.^{4,6-8,13,14}

La oxidación del etanol en el citosol por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa y en el retículo endoplásmico por medio del CYP2E1 utiliza como cofactor una molécula de NAD (o NADPH, respectivamente), convirtiéndola en NADH (o NADP, en su caso) para producir

acetaldehído (Figura 1). El acetaldehído ingresa a la mitocondria, en donde se convierte en acetato por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa usando una molécula de NAD^+ (que se transforma en NADH) como cofactor. El aumento en los cocientes NADH/NAD^+ y NADPH/NADP provoca una alteración en el estado redox del citosol y de la mitocondria, lo que a su vez incrementa las relaciones lactato-piruvato y β -hidroxibutirato-acetoacetato, respectivamente.^{4,6-8} En la mitocondria, la oxidación del NADH estimula el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria que genera un exceso de radicales libres derivados del oxígeno, lo que puede generar radicales libres derivados del nitrógeno (Figura 1). Además, los sistemas lanzadera-sustrato de la mitocondria hacen que los equivalentes reductores generados extramitocondrialmente por la oxidación del etanol pasen a la cadena respiratoria, en donde elevan aún más la demanda de oxígeno, con el resultante aumento en la producción de radicales libres derivados del oxígeno en la mitocondria y la inducción de un estado de hipoxia.^{4,6-8,29}

El radical $\text{O}_2\bullet^-$ creado por la cadena respiratoria mitocondrial es desintoxicado por la enzima superóxido dismutasa, que lo convierte en H_2O_2 , mismo que, si no es transformado a H_2O por la glutatión peroxidasa (usando como cofactor al glutatión reducido), puede reaccionar con metales (por ejemplo, hierro o cobre) mediante Fenton y generar radicales hidroxilo. Con el consumo de etanol se incrementa la producción de radicales libres derivados de oxígeno intramitocondriales, porque los sistemas antioxidantes se ven superados y se consume el glutatión reducido; lo que provoca que las especies generadas en exceso “ataquen” las estructuras mitocondriales (principalmente a los lípidos y proteínas de membrana). Lo anterior ocasiona un “escape” de las especies reactivas de oxígeno hacia el citosol, en donde afectan significativamente al metabolismo celular, alterando los mecanismos de transducción

de señales hormonales y la expresión de genes, aparte de que dispara la producción de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento que, a su vez, originan un proceso inflamatorio que incrementa el daño al hepatocito.^{4,6-8,10,13-17}

Además, el estado de hipoxia inducido por el incremento en la demanda de oxígeno estimula la actividad de la enzima iNOS, lo que genera un ambiente citotóxico al potenciarse la producción de óxido nítrico en el citosol y en la mitocondria.⁴⁵⁻⁴⁹ El óxido nítrico así formado puede interaccionar con el $\text{O}_2\bullet^-$ (generado en el citosol y en la cadena respiratoria) para crear ONOO- y de esta manera, acrecentar el daño al hepatocito (Figura 1). La enzima iNOS no sólo se expresa en los hepatocitos, también en las células de Kupffer, en las células estelares y las células vasculares, lo que le da una amplia gama de actividad dentro del hígado. Asimismo, la expresión de la iNOS es instigada por la interleucina 1β (IL- 1β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ) y el lipopolisacárido.⁴⁹⁻⁵³

El hígado no sólo está conformado por hepatocitos, durante la ingestión crónica de etanol se incrementa en su tejido el número de macrófagos y neutrófilos. Estas células elaboran una gran cantidad de radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno, porque son “activadas” por diversos factores humorales y ocurre en ellas el “estallamiento oxidativo” (estrés oxidativo), en el que liberan en abundancia radicales libres derivados del oxígeno (sobre todo $\text{O}_2\bullet^-$ y $\text{OH}\bullet$, además de agentes prooxidantes como el H_2O_2) que generan, por su parte, radicales libres derivados del nitrógeno.^{4,6,45-53}

La “activación” de las células del sistema inmunitario que están en el hígado (principalmente células de Kupffer), provocada por el etanol, hace que éstas secreten citocinas y quimiocinas proinflamatorias que incrementan

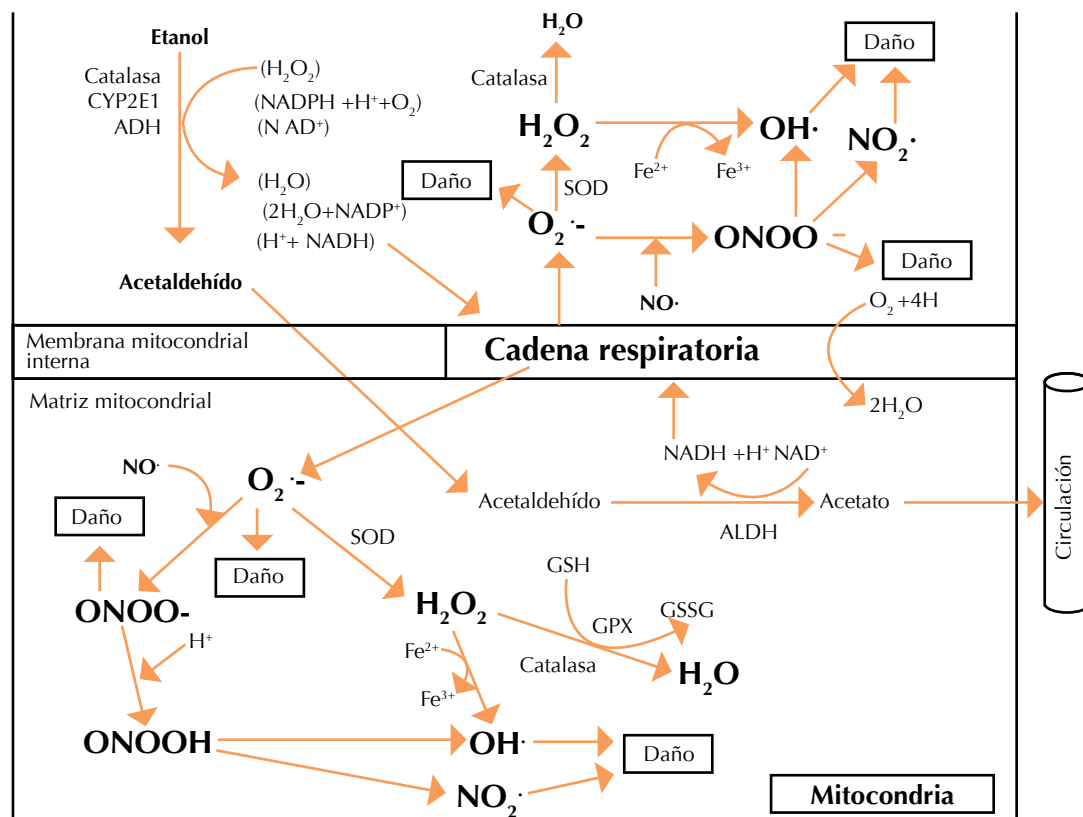


Figura 1. Esquema representativo de la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno como consecuencia del metabolismo oxidativo del etanol en el hepatocito.

el “reclutamiento” de macrófagos y neutrófilos en ese órgano, lo que contribuye a perpetuar su proceso inflamatorio.^{45,51-53} Además de todo lo mencionado, la producción de radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno puede activar el factor de transcripción NF- κ B, sensible a los cambios en el estado redox de la célula, que induce la transcripción de un gran rango de genes que están implicados en el proceso inflamatorio, como las citocinas (TNF- α , IL-6 y IL-1 β), quimiocinas y moléculas de adhesión.⁴⁷⁻⁵³

Por su parte, la hipoxia en el hepatocito, instigada por el metabolismo del etanol, provoca el cambio de actividad de la xantina reductasa

a xantina oxidasa, con lo que se incrementa la elaboración de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 . La principal función fisiológica de la xantina oxidasa es la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico, que es el producto final del catabolismo de la bases púricas en el humano.⁵⁴ La xantina oxidasa está fundamentalmente bajo la forma deshidrogenasa NAD^+ -dependiente. La forma deshidrogenasa se puede convertir en oxidasa mediante la oxidación de grupos sulfhidrilos, este paso es reversible, o por un proceso proteolítico, mismo que es irreversible y está catalizado por una proteasa calcio-dependiente que libera un fragmento peptídico de 20 kDa de cada subunidad. La forma deshidrogenasa utiliza

como aceptor de electrones el NAD^+ durante la oxidación de la hipoxantina, mientras que la forma oxidada usa al O_2 y genera $\text{O}_2^{\bullet-}$. La hipoxia y algunos mediadores de la inflamación, como el $\text{TNF-}\alpha$, también inducen la conversión de la forma deshidrogenasa a la oxidasa.⁵⁴⁻⁵⁶ Durante la hipoxia ocurre, por una parte, la acumulación de hipoxantina debido a la degradación masiva del adenosín trifosfato y, por otra, la conversión intracelular de la forma deshidrogenasa a la oxidasa. Así, la xantina oxidasa cataliza la oxidación de la hipoxantina acumulada en la fase hipóxica con la consiguiente formación del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el consecuente daño oxidativo a las estructuras celulares.⁵⁴⁻⁵⁶

Algunos de los procesos mencionados ocurren de manera concomitante a la ingestión aguda o crónica de etanol y varios de ellos, si no es que todos, afectan al hepatocito y al hígado en general. El daño celular debido al estrés oxidativo-nitrosativo provocado por la generación de radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno desempeña un papel muy importante en la patogénesis de muchas enfermedades hepáticas.

CONCLUSIONES

El proceso de la inducción del estrés oxidativo-nitrosativo que sucede en el hígado ante el consumo de etanol implica la conjugación de varios factores que influyen en el desequilibrio de prooxidantes y antioxidantes del hepatocito. El estudio de los factores que determinan el aumento en la generación de los radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno en el hígado por la ingestión aguda o crónica de etanol, es de gran trascendencia, porque permitirá disminuir los daños que estos radicales ocasionan en el hepatocito. Además, aunque en la actualidad se conoce bastante acerca de los mecanismos fisiopatológicos de daño al hígado por el consumo de etanol y el papel que los radicales libres

derivados del oxígeno y del nitrógeno juegan en esos procesos, aún no se sabe con exactitud el alcance del daño ni cómo prevenirlo.

Las investigaciones encaminadas a conocer la capacidad del etanol para promover estrés oxidativo-nitrosativo y la función de los radicales libres derivados del oxígeno y el nitrógeno en el daño hepático inducido por este tóxico son de gran importancia, porque permitirán el desarrollo de medicamentos efectivos y específicos, capaces de bloquear la acción de los radicales y, en consecuencia, el efecto tóxico del etanol.

La aplicación de nuevos procedimientos experimentales, así como la identificación de posibles biomarcadores que sean confiables y sensibles, es un gran avance que puede contribuir a implantar un adecuado sistema de prevención y diagnóstico para detectar, en lo posible, el daño temprano al hígado ocasionado por la ingestión de etanol, porque dicho órgano es una parte vital de nuestro cuerpo debido a que se encarga del soporte metabólico del organismo.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. José Gutiérrez Salinas agradece el apoyo del Programa de Investigación Científica y Tecnológica del ISSSTE (clave E015). La Dra. Liliana García Ortiz agradece el apoyo del CONACyT (Fondo Sectorial en Salud; Salud 2012-01-181582). El Dr. Paul Mondragón Terán agradece el apoyo del CONACyT (Apoyo Complementario para la Adquisición de Equipo Científico núm. 188458-2012). Los autores agradecen al ingeniero en alimentos Jorge E López Ochoa por su ayuda en la recuperación de la información bibliográfica y a la Srita. Cinthia Santiago Nicolás (ambos de la División de Investigación Biomédica, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE) por su ayuda en el trabajo secretarial.



REFERENCIAS

1. Grant BF, Dufour MC, Harford TC. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Sem Liver Dis* 1988;8:12-25.
2. Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc* 2004;63:49-63.
3. WHO Library Cataloguing-in-Publication Date. Global status report on alcohol and health. Switzerland: World Health Organization; 2011:1-85.
4. Caballería J. Current concepts in alcohol metabolism. *Ann Hepatol* 2003;2:60-68.
5. Mezey E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2709-2718.
6. Lieber CS, de Carli LM, Rubin E. Sequential production of fatty liver, hepatitis and cirrhosis in sub-human primates fed ethanol with adequate diets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:437-441.
7. Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J* 2001;15:1335-1349.
8. Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 1997;38:601-628.
9. Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. Dose response of alcohol induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharmacol Res* 2005;1:337-343.
10. Ambade A, Mandrekar M. Oxidative stress and inflammation: Essential partners in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol* 2012;Article ID 853175, 9 pages.
11. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003;27:277-284.
12. Zakhari S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health* 2006;29:245-254.
13. Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997;257:59-84.
14. Lieber CS. Metabolism and metabolic effects of alcohol. *Semin Hematol* 1980;17:85-99.
15. Lange LG, Sobel BE. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J Clin Invest* 1983;72:724-731.
16. Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:573-592.
17. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004;34:9-19.
18. Siegmund SV, Brenner DA. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:102-109.
19. Israel Y, Orrego H, Carmichael FJ. Acetate-mediated effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:144-148.
20. Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: A dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 2002;122:2049-2063.
21. Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc* 2004;63:49-63.
22. Hasumura Y, Teschke R, Lieber CS Characteristics of acet-aldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1976;251:4908-4913.
23. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
24. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Inter J Pharma Sci Res* 2010;1:185-192.
25. Saltman P. Oxidative stress: a radical view. *Semin Hematol* 1989;26:249-256.
26. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
27. Radi R. Nitric oxide, oxidants and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4003-4008.
28. Yang D, Felétou M, Boulanger CM, Wu HF, et al. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent. *Br J Pharm* 2002;136:104-110.
29. Lluís-Duque JM. Relevancia del acetaldehído, la hipoxia y la mitocondria en la hepatopatía alcohólica. Tesis de grado. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona 2004:1-35.
30. Kurban S. The effect of alcohol on total antioxidant activity and nitric oxide levels in the sera and brains of rats. *Turk J Med Sci* 2008;38:199-204.
31. Elahi MM, Matata BM. Significance of the nitrosative-oxidative stress disequilibrium on endothelial dysfunction during cardiac development. *Oxid Antioxid Med Sci* 2013;2:73-82.
32. Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, Stamler JS. Nitrosative Stress: Activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 1996;86:719-729.
33. Little C, O'Brien PJ. Mechanism of peroxide inactivation of the sulphhydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1969;10:533-538.
34. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, et al. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993;364:626-632.
35. Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997;272:7617-7625.
36. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem* 1989;58:79-110.

37. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 1992;669:7-20.
38. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33-50.
39. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003;22:5734-5754.
40. García-Medina JJ. Estado oxidativo-metabólico y afectación retiniana en diabetes mellitus e hipertensión arterial. Seguimiento a cinco años. Universitat de Valencia, Facultat de Medicina i Odontologia; Departamento de Cirugía, Tesis doctoral, Servei de Publicacions, ISBN:84-370-6471-62006, 2006;24-39.
41. Deng XS, Deitrich RA. Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction *Curr Clin Pharmacol* 2007;2:145-153.
42. Nakazawa J, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol* 1996;46:15-32.
43. Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad Res* 1999;31:261-272.
44. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med Int Mex* 2004;20:287-295.
45. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
46. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003;140-141:105-112.
47. Zhao W, Diz Robbins ME. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *Br J Radiol* 2007;80:S23-S31.
48. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998;25:434-456.
49. Oekonomaki E, Notas G, Mouzas IA, Valatas V, et al. Binge drinking and nitric oxide metabolites in chronic liver disease. *Alcohol Alcohol* 2004;39:106-109.
50. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007;42:153-164.
51. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 2000;165:1013-1021.
52. Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: A key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:451-462.
53. McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:497-502.
54. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986;548:87-99.
55. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1346-1352.
56. Tan S, Yokoyama Y, Dickens E, Cash TG, et al. Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 1993;15:407-414.