

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CONEJOS TRATADOS CON ETANOL Y DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA

Dra. Isis Lebedo Álvarez, Dra. Aleida Herrera Batista, Dra. Ela Céspedes Miranda y Dra. Gisselle Puldón Seguí

RESUMEN

Se trabajó para determinar la existencia de un efecto protector del alcohol en relación con la aterosclerosis, evaluar los posibles efectos de la ingestión crónica y de dosis moderadas de etanol sobre los parámetros de estrés oxidativo y explorar la presencia de interacción entre los efectos de una dieta hipercolesterolémica y el etanol sobre las variables de estrés oxidativo. Se utilizaron 22 conejos, se conformaron 4 grupos: tratados con alcohol, con dieta hipercolesterolémica, con alcohol y dieta, y un grupo control. Se analizaron las variables superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y malonil-dialdehído (MDA). Los animales tratados con dieta mostraron valores de SOD, CAT y MDA significativamente más altos que los alcohólicos y controles. Los conejos tratados con dieta y etanol mostraron valores de CAT y de MDA por encima de los observados en los tratados con dieta. Se concluyó que el consumo crónico de alcohol, aunque en dosis moderadas, perturba el sistema antioxidante, por lo que no se puede afirmar que ejerce un efecto protector contra la aterosclerosis; y que el consumo de una dieta rica en colesterol aumenta la peroxidación lipídica y las enzimas SOD y CAT.

DeCS: ALCOHOLISMO; ESTRES OXIDATIVO/efectos de drogas; ATERIOSCLEROSIS; SUPEROXIDO DISMUTASA; CATALASA; ETANOL/metabolismo; DIETA ATEROGENICA; HIPERCOLESTEROLEMIA; CONEJOS.

El proceso oxidativo mediado por radicales libres, en particular la oxidación de las LDL y los productos que derivan, desempeñan un importante papel en la aterogénesis.¹

La hipótesis oxidativa de la aterosclerosis sugiere que las LDL se acumulan dentro de la pared arterial como consecuencia de su modificación oxidativa.^{2,3} Esa modificación es mediada por las células residentes, entre estas: las células endoteliales,⁴ los monocitos,⁵ los macrófa-

gos,⁶ y las células musculares lisas de la túnica media.^{1,7,8} La producción aumentada de radicales libres y especies reactivas del oxígeno y/o la disminución de las defensas antioxidantes, favorecen el proceso oxidativo y aceleran el progreso de la aterosclerosis.¹ En relación con el alcoholismo y sus posibles efectos sobre la aterosclerosis se plantea que el alcohol puede proteger o no en dependencia de los hábitos de su ingestión.⁹ Algunos investigadores han observado en alcohólicos ligeros y moderados un pequeño

grado de aterosclerosis y en alcohólicos crónicos gran extensión de aterosclerosis.^{10,11}

Se han descrito 3 vías mediante las cuales se realiza el metabolismo del etanol. Estas vías metabólicas involucran a las enzimas alcohol deshidrogenasa, el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y las catalasas. Cada uno de estos pasos metabólicos puede producir radicales libres y, por ende, afectar el sistema antioxidante.¹²

Estudios realizados en pacientes alcohólicos y en animales de experimentación sometidos a tratamiento con etanol han mostrado aumento del daño peroxidativo y de los productos de peroxidación lipídica, como el malonil dialdehído (MDA). Se plantea que estos hallazgos están relacionados con el consumo de alcohol.¹³ Sin embargo, en una investigación donde se tiene en cuenta que el título elevado de anticuerpos anti-LDL oxidada representa un marcador del incremento de la oxidación de las LDL *in vivo*, se plantea que estos anticuerpos no se observan en el plasma de los pacientes alcohólicos, y que apenas desarrollaron aterosclerosis.^{12,14}

Con la presente investigación se pretendió determinar la existencia de un efecto protector del alcohol en relación con la aterosclerosis, evaluar los posibles efectos de la ingestión de etanol sobre los parámetros de estrés oxidativo y explorar la presencia de interacción entre los efectos de una dieta hipercolesterolémica y el etanol sobre las variables de estrés oxidativo.

MÉTODOS

Se emplearon 20 conejos raza Nueva Zelanda, machos, de 100 d de vida. Se conformaron 4 grupos de idéntico tamaño:

1. Tratado con etanol.

2. Tratado con dieta hipercolesterolémica.

3. Tratado con etanol y dieta.

4. Un grupo control.

La asignación a cada uno de los grupos se realizó mediante una tabla de números aleatorios.

Se utilizó etanol 40 % diluido en agua, a razón de 3 g por kilogramo de peso corporal, en una sola dosis diaria por un período de 16 semanas. La vía de administración fue la vía oral, *ad libitum*. Se midió la cantidad de agua ingerida diariamente por los animales y se halló una media de estas cantidades. Se procuró que ingirieran el etanol suministrado en esta cantidad de agua para que consumieran la dosis total de etanol/día. Los conejos se pesaron todas las semanas y con los valores obtenidos se calculó la cantidad de etanol a suministrar cada día de la semana.

Se utilizó pienso experimental código CME 1403 elaborado en la Fábrica de Piensos del Centro para la producción de animales de laboratorio (CENPALAB). El pienso experimental fue elaborado con colesterol 1,5 %.

A los conejos no alimentados con dieta aterogénica se les suministró pienso habitual para conejos, elaborado en el centro antes citado. Todos los conejos se colocaron en jaulas individuales con agua *ad libitum* y se mantuvieron en iguales condiciones ambientales e higiénicas.

Al finalizar el tratamiento se procedió a la extracción de sangre para realizar las determinaciones en sangre de los parámetros indicadores de estrés oxidativo, la cual se extrajo de la oreja del animal, al nivel del borde externo, donde se localiza el seno venoso marginal. Se analizaron las variables: superóxido dismutasa (SOD), por el método de pirogalol según *Marklund*,¹⁵ catalasas (CAT) según *Brees*,¹⁶ y malonil-dialdehído (MDA) según *Yagi* y *Ohkawa*.¹⁷

Análisis de los datos: se realizó un ANOVA de 2 vías tomando las variables de estrés oxidativo como variables dependientes, y como variables independientes el alcohol y la dieta (como efectos principales) y su interacción.

RESULTADOS

Los valores de SOD no presentaron diferencias significativas entre los conejos alcohólicos y controles. Los animales tratados con dieta mostraron valores significativamente más altos que los alcohólicos y controles ($p < 0,05$). No se comprobó interacción entre los efectos de la dieta y el alcohol (tabla 1).

Los animales que ingirieron etanol mostraron valores elevados de CAT con res-

pecto a los controles, con una diferencia significativa ($p < 0,05$). En los animales que ingirieron dieta hipercolesterolémica se observaron valores de CAT superiores a los que se observaron en alcohólicos y en controles ($p < 0,001$). Los conejos tratados con dieta hipercolesterolémica y etanol mostraron valores de CAT muy por encima de los observados en conejos tratados con alcohol o dieta, de forma aislada. No se comprobó la presencia de interacción (tabla 2).

Los valores medios de MDA no presentaron diferencias significativas entre alcohólicos y controles (tabla 3). En los animales tratados con dieta se observaron valores elevados de MDA, con una diferencia muy significativa ($p < 0,001$). Los animales tratados con dieta hipercolesterolémica y alcohol mostraron valores de MDA supe-

Tabla 1. Valores de superóxido dismutasa (SOD) (U/mL)

Variable	Control	Alcohol	Dieta	Dieta y alcohol
SOD	X = 5,755 DE = 1,355 n = 4	X = 12,645 DE = 1,786 n = 4	X = 19,95 DE = 2,769 n = 4	X = 18,383 DE = 10,399 n = 6
X: media, DE: desviación estándar, n: número.				
		F	p	
Efectos				
Alcohol		0,881	0,364	
Dieta		10,011	0,007	
Interacción dieta * alcohol		1,689	0,215	

Tabla 2. Valores de catalasas (CAT) (U/mL)

Variable	Control	Alcohol	Dieta	Dieta y alcohol
CAT	X = 155,125 DE = 6,744 n = 4	X = 181,682 DE = 9,692 n = 4	X = 241,237 DE = 36,920 n = 4	X = 353,527 DE = 90,90 n = 6
X: media, DE: desviación estándar, n: número.				
		F	p	
Efectos				
Alcohol		6,491	0,023	
Dieta		22,405	0,000	
Interacción dieta * alcohol		2,475	0,138	

Tabla 3. Valores de malonil dialdehído (U/mL)

Variable	Control	Alcohol	Dieta	Dieta y alcohol
MDA	X=1,312 DE=0,065 n=4	X=2,065 DE=0,786 n=4	X=3,238 DE=0,523 n=4	X=3,718 DE=1,021 n=6
X: media, DE: desviación estándar, n: número.				
			F	p
			2,944	0,108
			24,780	0,000
			0,143	0,711

riores a los observados en el grupo tratado con dieta, sin embargo, no se comprobó interacción dieta/alcohol ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Los animales de la presente serie tratados con etanol mostraron un aumento significativo de CAT, lo cual coincide con lo reportado por otros autores.¹⁸ La catalasa es la enzima encargada de la eliminación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2).¹³ Las concentraciones elevadas de peróxido, a su vez, intervienen en la activación de dicha enzima.¹³ La reacción de dismutación del anión superóxido, catalizada por la enzima superóxido dismutasa, constituye una de las principales fuentes de peróxido de hidrógeno.^{7,13} En el presente estudio los animales que ingirieron etanol no mostraron cambios significativos en los valores de SOD. Algunos autores plantean que la inhibición de esta enzima puede deberse a su inactivación por el etanol o sus metabolitos.¹³ Los resultados de la presente investigación evidencian que el consumo crónico de alcohol provoca estrés oxidativo y que la dosis ingerida, aunque moderada, es capaz de perturbar el sistema antioxidante como ha sido planteado por otros autores.^{13,18}

En los animales tratados con etanol se observó un incremento moderado de malonil dialdehído (MDA). El MDA constituye un producto de la peroxidación lipídica.¹³ El incremento de la peroxidación lipídica se considera una de las manifestaciones tóxicas de la ingestión aguda de alcohol.¹³ Por lo tanto, un incremento en los niveles de MDA en plasma puede constituir una respuesta evidente frente a un daño oxidativo de órganos y tejidos vitales después de la ingestión de alcohol.¹³

Al analizar los indicadores de estrés oxidativo en los animales que ingirieron dieta hipercolesterolémica se comprobó un incremento muy significativo en los valores de SOD y CAT, lo cual coincide con lo reportado por otros autores.¹⁹⁻²¹ En la literatura se plantea que la producción endotelial de especies reactivas del oxígeno, en especial de aniones superóxido, constituye un mecanismo importante en la disfunción endotelial presente en la aterosclerosis.⁷ El incremento de estas especies de oxígeno provoca un aumento de la actividad de estas enzimas con su consiguiente elevación en el plasma.¹⁹ En estos animales se observaron valores elevados de MDA. El malonil dialdehído constituye un producto final de la peroxidación lipídica. En la literatura se

reporta un incremento de MDA en animales sometidos a hipercolesterolemia que desarrollan lesiones ateroscleróticas.¹³ Los hallazgos del presente estudio corroboran que el consumo de una dieta rica en colesterol aumenta el grado de peroxidación lipídica, el cual es uno de los procesos tempranos en la aterosclerosis.^{7,13,19-22}

Los animales que ingirieron dieta y alcohol presentaron un incremento no significativo de la SOD. La disminución en la actividad de la enzima puede deberse a inhibición o inactivación de la proteína enzimática, por causa de la generación en exceso de especies reactivas del oxígeno.¹³ La producción aumentada de radicales libres y especies reactivas del oxígeno y/o la disminución de las defensas antioxidantes, favorece el proceso oxidativo y acelera el progreso de la aterosclerosis.¹ Estudios recientes reportan una inhibición mayor de la enzima cuando se emplean dosis crecientes de alcohol, eso indica que el etanol puede

ejercer un efecto inhibitorio específico sobre esta enzima. Estos resultados hacen pensar que una dosis inferior de etanol pudiera no inhibir la actividad enzimática. En estos animales se observó, además, un aumento de los valores de CAT y MDA. Estudios recientes plantean que el incremento de MDA es dosis y tiempo dependiente de la ingestión de etanol.¹³ Se puede pensar entonces, que una dosis de etanol inferior a la utilizada en este estudio pudiera disminuir la peroxidación lipídica y por consiguiente, los valores de MDA, ejerciendo de esta manera un efecto protector contra la aterosclerosis.

Se concluye que el consumo de una dieta rica en colesterol aumenta la peroxidación lipídica y las enzimas SOD y CAT y que el consumo crónico de alcohol, aunque en dosis moderadas, perturba el sistema antioxidante, por lo tanto no se puede afirmar que ejerce un efecto protector contra la aterosclerosis.

SUMMARY

The paper was aimed at determining the existence of a protective effect of alcohol on atherosclerosis, evaluating the possible effects of chronic ingestion and moderate doses of ethanol on the oxidative stress parameters and exploring the interaction between the effects of a hypercholesterolemic diet and of ethanol on the oxidative stress variables. For this purpose, 22 rabbits were used distributed into 4 groups: treated with alcohol, treated with hypercholesterolemic diet, with alcohol and diet and a control group. The variables superoxide dismutase (SOD), catalases (CAT) and malonil-dialdehyde (MDA) were analyzed. The animals treated with diet showed values of SOD, CAT and MDA significantly higher than those of the rabbits treated with alcohol and the control group. The rabbits under diet and ethanol showed CAT and MDA values that exceeded those observed in rabbits treated only with diet. It was concluded that chronic alcohol consumption, though at moderate dose, disturbs the anti-oxidation system, so we can not state that it has a protective effect against atherosclerosis and that the consumption of a cholesterol-rich diet increases lipid peroxidation and enzymes SOD and CAT.

Subject headings: ALCOHOLISM; OXIDATIVE STRESS/drug effects; ATHEROSCLEROSIS; SUPEROXIDE DISMUTASE; CATALASE; ETHANOL/metabolism; DIET, ATHEROGENIC; HYPERCHOLESTEROLEMIA; RABBITS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Violi F, Micheletta F, Iuliano L. Vitamin E, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;85:766-70.
2. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11(3-4):93-102.

3. Wolf G, Phil D. The Role of Oxidized Low-Density Lipoprotein in the activation of peroxisome proliferator activated receptor γ : implications for atherosclerosis. *Nutr Rev* 1999;57(3):88-91.
4. Fang X, Weintraub NL, Rios CD, Chapell DA, Zuacka RM, Engelhardt JF, et al. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res* 1998;82:1289-97.
5. Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, Mac Pherson JC, et al. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes. Pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation in vivo. *Circ Res* 1999;85:950-8.
6. Senna SM, Moraes RB, Bravo MFR, Oliveira RR, Miotto GC, Vidor AC, et al. Effects of prostaglandins and nitric oxide on rat macrophage lipid metabolism in culture: Implications for arterial wall-leukocyte interplay in atherosclerosis. *Biochem Molec Biol Intern* 1998;46(5):1007-18.
7. Miller FJ, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998;82:1298-305.
8. Céspedes EM, Arecibia RE, Broche F, García JC. El estrés oxidativo en la patogenia de la aterosclerosis. *BEB* 1998;17(1):18-21.
9. Hillbom M. Oxidants, antioxidants, alcohol and stroke. *Front Biosci* 1999;4:67-71.
10. Castellí WP, Doyle JT, Gordon T. Alcohol and Blood Lipids. The cooperative phenotyping study. *Lancet* 1997;2:153-5.
11. Baraona E, Lieber CS. Alcohol and lipids. *Rec Dev Alcohol* 1998;(14):97-134.
12. Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkowska J, Malbohan I, et al. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci* 2001;8(1):59-70.
13. Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol* 1999;17(2):95-105.
14. Szirmay IG, Kamondi A, Magyar H. Relation of laboratory and clinical variables to the grade of carotid atherosclerosis. *Stroke* 1993;24:1811-1.
15. Marklund SL, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1984;47:469-74.
16. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195:137-40.
17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animals and tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Bio Chem* 1979; 95:351-8.
18. Husain K, Somani SM. Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *J Appl Toxicol* 1997;17(3):189-94.
19. Fukai T, Galis ZS, Ping X, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular Superoxide Dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998;101(10):2101-11.
20. Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Särkioja T, Ylä-Herttuala S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and Smooth Muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(2):157-67.
21. Mahfouz MM, Kummerow FA. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem* 2000;11(5):293-302.
22. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, et al. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol fed rabbits. *Life Sci* 2001;69(24):2855-66.

Recibido: 10 de septiembre de 2002. Aprobado: 9 de octubre de 2003.

Dra. *Isis Lebrede Álvarez*. Calle C # 65 entre Arellano y San Miguel. Lawton. Teléf: 98-5512.