

## LA INJURIA OXIDATIVA EN HIGADO Y RIÑÓN DE RATA ES ATENUADA A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DEL CYP 2E1 POR EL CONSUMO DE VINO TINTO.

PATRICIO HUERTA BUSTAMANTE<sup>1</sup>, PATRICIO HENRIQUEZ HUERTA<sup>2</sup>,  
RODRIGO CASTILLO PEÑALOZA<sup>3</sup>, RODRIGO CARRASCO LOZA<sup>4</sup>, DRA. MYRIAM ORELLANA<sup>5</sup>,  
DR. RAMON SALINAS<sup>6</sup>.

## THE DAMAGE OXIDATIVE IN LIVER AND KIDNEY RAT IS ATTENUATED ACROSS THE MODULATION OF THE CYP 2E1 BY THE CONSUMPTION OF RED WINE.

**Backgrounds.** The wine protects against illness chronic, thanks to yours antioxidant properties. Nevertheless the metabolism of the ethanol realized partly by the CYP 2E1 hepatic, generates species reactivate of oxygen (EROS).

The aim was analyzed if the consumption of wine, attenuates the induction of the isoenzima CYP 2E1 for ethanol in liver and kidney.

**Materials and Methods.** Rates were treated by water, ethanol, red wine or red wine unalcoholic for 10 weeks. The content of total CYP, CYP 2E1 was evaluated in the microsomal fraction hepatic and renal; and your activity by means of the oxidation of ethanol and p-nitrofenol.

**Results.** The ethanol increased the total CYP and CYP 2E1, as well as the hidroxilation of p-nitrophenol and the oxidation of ethanol in both organs, effects attenuated by the administration of wine.

**Conclusions.** The non alcoholic components of the wine attenuate the induction of CYP2E1 activity and the oxidative damage induced by EROS that provokes the ethanol on liver and kidney of rat.

**Key words:** Citochromo P450, Ethanol, Oxidative stress, Liver and Kidney

### INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo representa un punto de convergencia del mecanismo de daño de varios órganos (cerebro, corazón, pulmón y riñón) provocado por patologías de muy diversa etiología.(1,2,3,4,5,6,7). Si, la injuria que pueden sufrir estos órganos sometidos, por ejemplo, a isquemia, agentes tóxicos o infecciosos, etc. se asocia a un predominio pro - oxidante. Por lo tanto resulta válido plantear que una forma de protección contra la injuria podría operar a través de un mecanismo que reduzca el grado de estrés oxidativo que los puede afectar en estados patológicos.

A partir del año 1990 estudios epidemiológicos relacionaron la menor mortalidad cardiovascular en Francia con el consumo regular de vino. Desde entonces han surgido numerosas investigaciones para probar esta hipótesis. De estos resultados ha surgido información que

confirma las propiedades antioxidantes de algunos compuestos del vino en la prevención del daño cardiovascular, cerebral, sin embargo existen pocos estudios de sus efectos a nivel renal. En general se puede plantear que estos efectos obedecen tanto al etanol como a los componentes no alcohólicos del vino. Entre estos se encuentran diversas sustancias antioxidantes, tales como flavonoles y otros compuestos compuestos polifenólicos. Los polifenoles, que son particularmente abundantes en el vino chileno, son compuestos que se comportan como depuradores de radicales libres, quelantes de metales y moduladores enzimáticos. Por otra parte, el consumo crónico de etanol también ha demostrado provocar efectos antioxidantes al aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes (8,9). Por lo tanto, el consumo moderado de vino tinto puede tener un efecto protector contra los agentes oxidantes, a pesar de la presencia de etanol (10,11,12,13).

<sup>1 2 3 4</sup> Estudiante 4º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>5 6</sup> Profesor Asociado Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Existen estudios experimentales que demuestran que aumenta las defensas antioxidantes a través del aumento de la relación HDL/ apoproteína A-1(14), disminución de la lipoperoxidación plasmática e inhibición de la oxidación de LDL in vivo (15). Ninguno de estos estudios mostró alguno de estos efectos protectores con el consumo moderado de alcohol.

Con respecto al etanol, múltiples estudios epidemiológicos han demostrado una correlación inversa entre el riesgo de enfermedad coronaria y el consumo moderado alcohol (16). Este efecto se ha sido atribuido principalmente al incremento en el plasma de los niveles de HDL.(15) y a una inhibición de la agregación plaquetaria que resulta en una menor tendencia a la trombosis (17). Además la ingesta de alcohol afecta la actividad de las plaquetas a través de la producción de prostacilinas, que actúan como potente vasodilatador y anti-agregante plaquetario (18). Sin embargo el etanol también sería responsable de la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (19) aumentando la lipoperoxidación y disminuyendo los niveles de glutatión intrahepáticos.( 20).

Además, el consumo crónico de etanol aumenta la actividad de la CYP P450 particularmente de la isoenzima CYP 2E1 (21, 22). El citocromo P450 (CYP) es una familia de isoenzimas que metabolizan xenobióticos y compuestos endógenos, como los ácidos grasos, colesterol, etc. El CYP se encuentra principalmente en hígado pero también en diversos tejidos extrahepáticos como el riñón. El contenido de CYP y el metabolismo de xenobióticos en el riñón de la rata son menores que en hígado, siendo la oxidación de ácidos grasos similar en ambos órganos (23, 24). En ambos tejidos, el etanol se oxida a acetaldehído mediante reacciones catalizadas principalmente por la enzima alcohol deshidrogenasa y por el sistema de oxidación microsomal del etanol (MEOS), dependiente del CYP (22). Se sabe que la contribución de CYP2E1 es la más importante de esta reacción (25). El CYP utiliza oxígeno como uno de sus substratos, y se describe como un generador eficaz del anión superóxido, una de las especies reactivas del oxígeno (ROS) implicada en la generación del estrés oxidativo (26). Los ROS pueden causar lipoperoxidación de las membranas de la célula y de los organelos, y por lo tanto, la alteración de su integridad estructural y sus propiedades funcionales (27,28,29).

Así se desconoce si el consumo crónico de vino tinto tendría un efecto injurioso a nivel hepático y renal, mediado por la inducción de la

CYP2E1, debido a la generación de EROS, o bien si este efecto sería atenuado por sus componentes no alcohólicos.

El propósito de nuestro estudio sería investigar el efecto del vino tinto en la expresión y actividad de la CYP2E1 en hígado y riñón de rata, una de las enzimas que contribuye en una proporción importante a la generación de EROS.

Por lo anteriormente expuesto, postulamos que el consumo crónico de vino tinto a través de sus componentes no alcohólicos atenúa el efecto del etanol de inducir una sobre-expresión de la actividad de la CYP450, disminuyendo a su vez la producción de EROS a nivel hepático y renal en la rata, debido a sus propiedades antioxidantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Animales*

Ratas macho (cepa Wistar) que pesaban  $200 \pm 15$  g recibieron una dieta balanceada y, durante 10 semanas se les administró como única bebida: agua (control), vino tinto (etanol de 12,5% v/v y 55,2 mg/l de flavonoles totales), etanol (12,5% v/v) o vino tinto libre de alcohol. A todos los animales se les dio acceso libre a la bebida y alimento. El vino tinto libre de alcohol se obtuvo del mismo líquido usado como bebida en el grupo vino tinto, al cual se les extrajo el alcohol por un procedimiento de evaporación al vacío y a temperatura de 25°C por 4 h. Para evitar la tensión mecánica, el vacío fue aplicado en forma progresiva y gradual e hasta -3 MPa (11).

### *Capacidad antioxidante total del plasma y niveles de etanol sanguíneos*

Las muestras de la sangre de cada grupo fueron obtenidas a través de la arteria carótida después de anestesia usando 20% de uretano en una dosis de 1 mg/ g de peso corporal. Las muestras fueron recibidas en tubos plásticos con EDTA y centrifugadas inmediatamente. La capacidad antioxidante total del plasma fue determinada midiendo la capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) descrito por Benzie y Strain (30) y expresada en  $\mu$ M. Los niveles sanguíneos de etanol fueron determinados por un micrométodo enzimático descrito por Brink et al. (31).

### *Parámetros microsomales del hígado*

Los microsomas fueron preparados por la ultracentrifugación como se describe en Orellana ,

(32) y la proteína microsomal fue medida por el método de Lowry (33) usando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar. El contenido total del citocromo P450 fue medido de acuerdo al método de Omura y Sato (34).

La hidroxilación del p-nitrofenol a 4-nitrocatecol fue medida espectrofotométricamente a 546 nm de acuerdo al método descrito de Reinke y Moyer (35). La oxidación microsomal del etanol fue determinada según el método descrito por Handler (36).

#### Western blots

El western immunoblotting fue realizado usando el gel de poliacrilamida SDS al 7.5% según lo descrito por Towbin. (37). Después de transferirlos a papel de nitrocelulosa, los blots fueron desarrollados usando anticuerpos policlonales contra citocromo P450 2E1 hepático de rata y las bandas fueron teñidas con solución de nitroblue tetrazolium /5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP).

#### Materiales

El vino tinto Cabernet Sauvignon 1998 utilizado en este estudio fue una donación de Viña Lomas de Cauquenes, Chile. Los anticuerpos policlonales anti 2E1 manufacturados por Daichi Pure Chemicals Co (Tokio, Japón) fueron comprados de Gentest, E.E.U.U. El NADPH, isocitrato deshidrogenasa, isocitrato del sodio, NAD, FAD, ditiotreitól, p-nitrofenol, BSA fueron obtenidos de Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, E.E.U.U. Todos los otros químicos fueron obtenidos desde Merck u otras fuentes comerciales y eran de la más alta pureza.

**Tabla 1.** Valores de nitrógeno ureico y creatinina en los grupos experimentales. Los valores son el promedio de 52 ratas  $\pm$  Error estándar. No existiendo diferencias estadísticamente significativas en los valores de función renal analizados.

Parámetro	Control	Etanol	Vino Tinto	Vino Desalcoholizado
CREATININA PLASMÁTICA (mg/dl)	0.41 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.07
NITRÓGENO UREICO (mg/dl)	19.8 $\pm$ 0.92	17.7 $\pm$ 0.85	18.5 $\pm$ 0.70	17.1 $\pm$ 0.65

Los niveles de etanol en la sangre de las ratas que recibieron el etanol o vino tinto fueron (mg/dl) 46.3  $\pm$  5.1 (n = 14) y 52.3  $\pm$  8.1 mg/dl (n

#### Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S., y la significación estadística de diferencias entre los valores promedios fue determinada por el análisis de la varianza (ANOVA) acoplado con la prueba de Newman-Keuls. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en P < 0.05. Los resultados obtenidos por western blot fueron analizados bajo densitometría, utilizando el programa Scion Image y graficados utilizando el programa Microsoft Excel.

## RESULTADOS

El consumo diario de energía y líquido durante el periodo experimental fue similar para los diferentes grupos. En el grupo control el consumo diario de energía (kcal/día/100 g de peso corporal) fue de 21  $\pm$  1.8 (n = 15) y el consumo de líquido (ml/día/100 g de peso corporal) de 9.49  $\pm$  0.36 (n = 14). A pesar que la ganancia de peso en el grupo tratado con etanol fue menor que la de los otros grupos, estos valores no alcanzan una diferencia significativa [2.03  $\pm$  0.20 y 1.87  $\pm$  0.14 g/día/100 g (n = 14) fueron los valores para el control y el etanol, respectivamente.

La tabla 1 muestra la función renal a través de los parámetros de creatinina plasmática y nitrógeno ureico. En los cuatro grupos analizados no existieron diferencias estadísticamente significativas.

=14), respectivamente. Tal como muestra la Tabla 2, el tratamiento con vino elevó significativamente (54%) la capacidad antioxidante del plasma.

**Tabla 2.** Capacidad del plasma de reducir hierro (FRAP) y proteínas microsomales totales en hígado y riñón de rata y contenido total CYP450 en rata. Valores medidos correspondían a promedios  $\pm$  S.D. Números de experimentos en paréntesis. Diferencia significativa en  $P < 0.05$ : a del control, b del etanol, c del vino tinto o d de vino tinto desalcoholizado

Grupo	FRAP ( $\mu$ M)	Proteína microsomal (mg/g tejido)		Citocromo P-450 total (nmol/mg proteína)	
	riñón	riñón	hígado	riñón	hígado
Control	240 $\pm$ 15 (18)	9.70 $\pm$ 0.65 (10)	10.20 $\pm$ 1.10 (15)	0.10 $\pm$ 0.03 (8)	0.47 $\pm$ 0.12 (12)
Etanol	249 $\pm$ 20 (13)	9.80 $\pm$ 0.47 (10)	9.90 $\pm$ 1.20 (16)	0.15 $\pm$ 0.04 <sup>a,c,d</sup> (8)	0.79 $\pm$ 0.10 <sup>ac</sup> (8)
Vino tinto	370 $\pm$ 20 <sup>a,b,d</sup> (11)	10.50 $\pm$ 0.49 <sup>a,b</sup> (5)	10.80 $\pm$ 1.60 (15)	0.09 $\pm$ 0.03 (9)	0.55 $\pm$ 0.10 (8)
Vino tinto desalcoholizado	301 $\pm$ 25 <sup>a,b</sup> (10)	10.70 $\pm$ 0.14 <sup>a,b</sup> (5)	11.20 $\pm$ 1.15 (15)	0.08 $\pm$ 0.02 (6)	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup> (8)

El contenido total del CYP fue aumentado por el etanol en un 68% en hígado y 50% en riñón con respecto a sus respectivos valores control, en ausencia de cambios significativos en la proteína microsomal tanto en hígado como en riñón. En tanto, el tratamiento con vino desalcoholizado disminuyó el contenido de CYP a un 70% de los valores del control en hígado y a un 90% de los del riñón, respectivamente. En el grupo tratado con vino tinto el contenido de CYP fue menor que el de las ratas tratadas con etanol, aún cuando ambos grupos tuvieron el mismo consumo de etanol.

El efecto de los diversos tratamientos sobre la actividad de oxidación de etanol y de hidroxilación de p-nitrofenol, catalizada por las fracciones microsomales del hígado, se muestra en la Tabla 3. La hidroxilación del p-nitrofenol en el hígado fue aumentada por consumo crónico de etanol y vino tinto un 181% y 155% de los valores del control, respectivamente. En riñón, estas actividades aumentaron hasta un 281 y 191% de los valores controles, respectivamente. A diferencia de los resultados anteriores, el

tratamiento con vino desalcoholizado tuvo un efecto disímil en hígado y riñón. Mientras que en hígado la hidroxilación del p-nitrofenol disminuyó un 82% de su valor de control, en riñón dicha actividad aumentó al 138%. Después del tratamiento con etanol, la oxidación microsomal del etanol a acetaldehído experimentó un aumento semejante en hígado y en riñón (179% y 154%, respectivamente). Por el contrario, tanto el vino como el vino desalcoholizado provocaron una caída de estas actividades microsomales en hígado y riñón. En hígado, el tratamiento con vino tinto sólo aumentó la oxidación del etanol a un 140%, mientras que en riñón este valor inclusive disminuyó bajo el control (a un 90%). De la misma manera, en el grupo del vino tinto desalcoholizado se observó que dicha actividad estaba disminuida a un 80% en el hígado y a un 91% en riñón. Es importante remarcar que en el grupo tratado con vino tinto, la oxidación del etanol y la hidroxilación del p-nitrofenol fue significativamente más baja que la del grupo tratado con etanol.

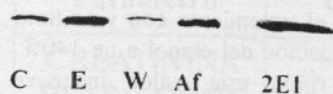
**Tabla 3.** Oxidación del etanol y del p-nitrofenol en microsoma de hígado y riñón de rata (nmol / min / mg proteína microsomal). Valores medidos correspondían a promedios  $\pm$  S.D. Números de experimentos en paréntesis. Diferencia significativa en  $P < 0.05$ : a del control, b del etanol, c del vino tinto o d de vino tinto desalcoholizado.

Grupo	Etanol		p-nitrofenol	
	Riñón	Hígado	Riñón	Hígado
Control	2.85 $\pm$ 0.68 (6)	5.35 $\pm$ 0.88 (15)	0.053 $\pm$ 0.015 (8)	0.22 $\pm$ 0.05 (6)
Etanol	4.38 $\pm$ 0.85 <sup>a,c,d</sup> (6)	9.58 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup> (15)	0.149 $\pm$ 0.040 <sup>a,c,d</sup> (9)	0.40 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> (5)
Vino Tinto	2.60 $\pm$ 0.68 (5)	7.51 $\pm$ 0.72 <sup>ab</sup> (15)	0.101 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup> (5)	0.34 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> (5)
Vino Desalcoholizado	2.38 $\pm$ 0.8 (5)	4.27 $\pm$ 0.22 <sup>abc</sup> (15)	0.073 $\pm$ 0.025 (5)	0.18 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>

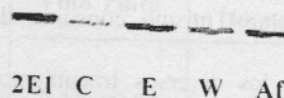
El análisis del Western blot (Figs. 1 y 2) mostró que la intensidad de las bandas para el contenido de CYP 2E1 era más alta en el grupo tratado con etanol que los tratados con vino tinto,

vino tinto desalcoholizado, o el grupo control, tanto en hígado como riñón.

**Figura 1.** Riñón CYP 2E1



**Figura 2.** Hígado CYP 2E1

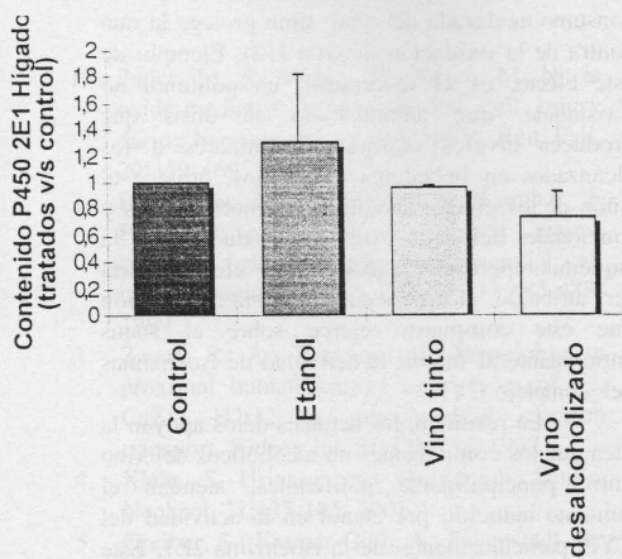


\* Western immunoblotting se realizó usando gel de poliacrilamida 10% SDS y fue transferida a filtro de nitrocelulosa fue puesto en papel secante realizando la marcación mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra CYP 2E1. C: control; W: vino tinto; E: etanol; Af: vino desalcoholizado.

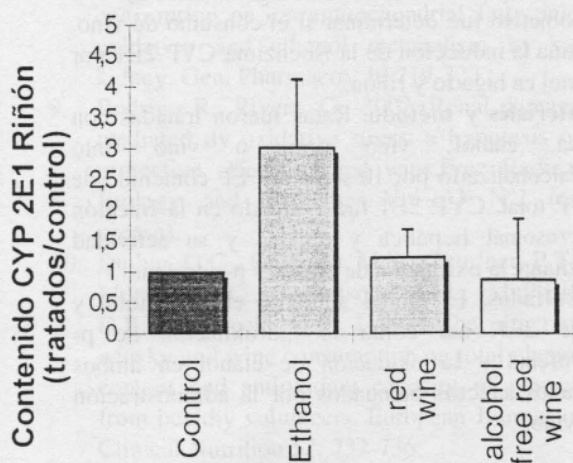
Las densitometrías (figs. 3 y 4), muestran que el contenido de CYP 2E1 en el grupo tratado con etanol tanto en hígado como riñón era alto, siendo en este último el triple respecto al control. En los grupos tratados con vino se observó que en hígado la expresión de CYP 2E1 aumentó levemente

respecto al control en tanto en riñón la expresión de CYP 2E1 fue levemente superior que el control; en tanto en ambos órganos el grupo con vino desalcoholizado presentó un contenido inferior respecto al control.

**Figura 3.** Densitometría del western immunoblotting usando anticuerpos policlonales contra citocromo P450 2E1 de hígado de rata. Los valores son expresados como la razón tratados/control de unidades densitométricas arbitrarias de cantidad de proteína y están expresadas como promedio  $\pm$  D.S. de al menos 3 western blot. Diferencia significativa del control en  $P < 0.05$ .



**Figura 4.** Densitometría del western immunoblotting usando anticuerpos policlonales contra citocromo P450 2E1 de riñón de rata. Los valores son expresados como la razón tratados/control de unidades densitométricas arbitrarias de cantidad de proteína y están expresadas como promedio  $\pm$  D.S. de al menos 3 western blot. Diferencia significativa del control en  $P < 0.05$ .



## DISCUSIÓN

Los resultados aquí expuestos proporcionan evidencia que la administración crónica de etanol (12.5% v/v) aumenta el contenido total de CYP y de su isoenzima CYP 2E1, tanto en el hígado como en el riñón de rata. Estas modificaciones se vieron reflejadas además en los efectos funcionales, representados por los cambios en la actividad microsomal para catalizar la hidroxilación de p-nitrofenol y la oxidación de etanol. En hígado, el aumento en la actividad microsomal parece ser producto del aumento en el contenido de la isoenzima 2E1 inducida por el etanol (Fig. 1), y concuerda con los resultados comunicados en hígado (22). En riñón, se ha reportado que el aumento en la oxidación del etanol tras el consumo crónico de etanol se relacionaría con la inducción de la enzima alcohol deshidrogenasa (8) que se observa en estas condiciones lo que aumenta el acetaldehído produciendo peroxidación renal (38); no existiendo evidencia de la contribución relativa del CYP 2E1 en este órgano.

Sin embargo, la administración de vino tinto con una concentración comparable de etanol (12.5%) disminuyó significativamente el efecto del tratamiento con etanol sobre el contenido de CYP 2E1 y la actividad microsomal. Este hallazgo sugiere que los componentes no alcohólicos del vino tinto podrían estar modulando el efecto inductor de CYP ejercido por etanol sobre estos órganos. Esta observación se fundamenta en la acción que tuvo el tratamiento con vino tinto desalcoholizado, en que estos componentes se administraron en forma aislada. Así, en el hígado el vino tinto desalcoholizado disminuyó el contenido del CYP y la actividad microsomal a valores más bajos que el control. De estos datos, se podría sugerir que el efecto modulador del vino tinto sobre CYP, es debida a sus componentes no alcohólicos, principalmente los polifenoles que actúan como moduladores enzimáticos, entre sus propiedades antioxidantes (9,10,11,12).

Investigaciones recientes han aportado evidencias científicas acerca del beneficio para la salud del consumo moderado de vino tinto en la dieta del ser humano. De estos resultados ha surgido información que confirma las propiedades antioxidantes de algunos compuestos del vino y su posible manera de actuar. Se sabe que sus efectos antioxidantes pueden ser atribuidos tanto al etanol como a sus componentes no alcohólicos. Dentro de estos últimos encontramos los polifenoles, los cuales deben sus propiedades antioxidantes a sus

efectos de quelantes de metales, inactivadores de EROS y moduladores enzimáticos.

Con relación al etanol, durante los últimos años se ha acumulado gran cantidad de evidencias que realfirman la hipótesis que el consumo crónico de etanol produce una variedad de efectos deletéreos a nivel hepático y renal (39,40). La oxidación del etanol aumenta la producción de EROS, que son mediadores del daño tisular que sigue a la intoxicación aguda con etanol. Esta toxicidad se genera en parte debido a su metabolización por el complejo enzimático de la citocromo P450. Al respecto es conocido el efecto inductor sobre el metabolismo hepático del etanol durante un consumo agudo, el que se expresa en un aumento de la actividad de la isoenzima CYP2E1, principal generadora de EROS a nivel hepático. Recientes estudios revelan también un aumento en la expresión de esta enzima a nivel del túbulo proximal después de la intoxicación aguda con etanol (41). Sin embargo, son escasos los estudios que predicen el efecto del tratamiento crónico con etanol sobre la expresión de la CYP2E1 renal.

Dentro de los componentes no alcohólicos del vino, tenemos que los flavonoles (un tipo de polifenol) son los que tiene una mayor aporte a las propiedades antioxidantes del vino tinto, y se comportan como moduladores enzimáticos, incluyendo la regulación de las algunas actividades del CYP (42,43). Estos compuestos podrían mediar la inhibición de la actividad del CYP 2E1 y/o disminuir su contenido, como han demostrado los estudios de biología molecular realizados (Western blot), y de esta manera contribuir a la disminución de la generación de aniones superóxido, y por lo tanto a la potencial generación de estrés oxidativo. Estudios en que se determine el grado de peroxidación lipídica y/u oxidación proteica podrían servir para corroborar esta hipótesis.

Últimamente en múltiples enfermedades crónicas se ha encontrado un aumento de la CYP 2E1. Así se ha visto que ratas obesas (44) y diabéticas exhiben altos niveles de CYP 2E1 a nivel hepático comparado con ratas normales. Observándose un aumento de los parámetros oxidativos del etanol en las obesas:(oxidación microsomal, hidroxilación del p-nitrofenol). En cambio en las diabéticas existe asociación del aumento de la CYP2E1 con la alta concentración de cetonas (  $\beta$ -hidroxibutirato), lo cual permite dar un fundamento más molecular a la presentación clínica de una cetoacidosis diabética y su vez asociar esta a estados pro-oxidantes (45).

Aunque el mecanismo del efecto protector de los compuestos polifenólicos aún no ha sido bien dilucidado, se sabe que podrían reforzar el sistema antioxidante responsable de contrarrestar los efectos del ROS. De hecho, se ha demostrado un aumento de la capacidad antioxidante del plasma en seres humanos después de la ingestión de cantidades moderadas de vino tinto (10) y de vino tinto desalcoholizado (11). Además se ha reportado recientemente que el consumo moderada del vino tinto protege la rata contra de la oxidación in vivo (12). Ejemplo de este efecto, es el resveratrol, un polifenol no flavonoide, que administrado en dosis que producen niveles plasmáticos similares a los alcanzados en bebedores moderados, protege al riñón de los efectos bioquímicos, morfológicos y funcionales del daño oxidativo producido por la isquemia-reperfusión (46,47). Este efecto podría ser atribuido, al menos en parte, a la modulación que este compuesto ejerce sobre el status antioxidante al inhibir la actividad de isoenzimas del complejo CYP.

En resumen, los actuales datos apoyan la idea que los componentes no alcohólicos del vino tinto, principalmente polifenoles, atenúan el aumento inducido por etanol en la actividad del CYP, particularmente de la isoenzima 2E1. Este efecto podría explicar en parte, el efecto antioxidante del consumo moderada del vino tinto rico en flavonoles.

## RESUMEN

**Antecedentes.** El vino protege contra patologías crónicas, gracias a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo la metabolización del etanol realizada en parte por la CYP 2E1 hepática, genera especies reactivas de oxígeno (EROS).

El objetivo fue determinar si el consumo de vino, atenúa la inducción de la isoenzima CYP 2E1 por etanol en hígado y riñón.

**Materiales y método.** Ratas fueron tratadas con agua, etanol, vino tinto o vino tinto desalcoholizado por 10 semanas. El contenido de CYP total, CYP 2E1 fue evaluado en la fracción microsomal hepática y renal; y su actividad mediante la oxidación de etanol y p-nitrofenol.

**Resultados.** El etanol aumentó el CYP total y CYP 2E1, así como la hidroxilación de p-nitrofenol y la oxidación de etanol en ambos órganos, efectos atenuados por la administración de vino

**Conclusiones.** Los componentes no alcohólicos del vino atenúan la inducción de actividad de CYP 2E1 y el daño oxidativo por EROS que provoca el etanol sobre hígado y riñón de rata

**Palabras claves:** Citocromo P450, etanol, estrés oxidativo, hígado y riñón.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Paller, M. S.; Weber, K.; Patten, M. Nitric oxide-mediated renal epithelial cell injury during hypoxia and reoxygenation. *Ren. Fail.* 20:459-469; 1998.
2. Barrouillet, M. P.; Moiret, A.; Cambar, J. Protective effects of polyphenols against cadmium-induced glomerular mesangial cell myocontracture. *Arch. Toxicol.* 73:485-488; 1999.
3. Zager, R. A.; Burkhart, K. Myoglobin in proximal human kidney cells: roles of Fe, Ca<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a mitochondrial electron transport. *Kidney Int.* 51:728-738; 1997.
4. Klahr, S. Urinary tract obstruction. *Semin. Nephrol.* 21:133-145; 2001.
5. Greiber, S.; Kramer-Guth, A.; Pavenstadt, H.; Gutenskunt, M.; Schollmeyer, P.; Wanner, C. Effects of lipoprotein(a) on mesangial cell proliferation and viability. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11:778-785; 1996.
6. Kitamura, M.; Ishikawa, Y. Oxidant-induced apoptosis of glomerular cells: intracellular signaling and its intervention by bioflavonoid. *Kidney Int.* 56:1223-1229; 1999.
7. Fryer, M. J. Vitamin E may slow kidney failure owing to oxidative stress. *Redox. Rep.* 3:259-61; 1997.
8. Orellana, M.; Valdés, E.; Fernández, J.; Rodrigo, R (1998). Effects of chronic ethanol consumption on extramitochondrial fatty acid oxidation and ethanol metabolism by rat kidney. *Gen. Pharmacol.* 30:719-723.
9. Rodrigo R., Rivera, G., 2002. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical Biology and medicine*. Vol 33 N°2 (en prensa).
10. Duthie, G.G.; Pedersen, M.W.; Gardner, P.T.; Morrice, P.C.; Jenkinson, A.M.; McPhail, D.B. and Steele, G.M. (1998) The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* 52, 733-736.
11. Serafini, M., Malani, G. and Ferro-Luzzi, A. (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* 128, 1003-1007.
12. Roig, R., Cascón, E., Arola, L., Bladé, C. and Salvadó, M.J. (1999) Moderate red wine consumption protects against oxidation in vivo. *Life Sci* 64, 1517-1524.
13. Sveglati, B., Jezequel, A.M., Orlandi, F., (1999). Wine: risk factors for liver disease and antifibrotic compounds. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25,143-145.
14. Lavy, A., Fuhrman, B., Markel, A., Danker, G., Ben-Amotz, A., Presser, D. & Aviram M. (1994) Effect of dietary supplementation of red or white wine on human blood chemistry, haematology and coagulation: favourable effect of red wine on plasma high-density lipoprotein. *Ann. Nutr. Metab.* 38: 287-294.
15. Gaziano, J M., Buring J. E., Breslow, J. L., Goldhaber, S. Z., Rosner, B. (1993) Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its sub fractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 329:1829-33.
16. Rimm, E. B., Giovannucci, E. L., Willet, W. C., Colditz, G. A., Ascherio, A., Rosner, B. (1991) Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* 338:464-86.
17. Renaud, S. & de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339:1523-1526.
18. Guivernau, M., Baraona, E., Soong, J. & Lieber, C. S. (1989) Enhanced stimulatory effect of high density lipoproteins (HDL) and other agonists on vascular prostacyclin production in rats fed alcohol-containing diets. *Biochem. Pharmacol.* 38:503-508.
19. Situyanake, R., Crump, B. J., Thurnham, D. I., Davies, J. A., Gearty, J. & Davis, M (1990) Lipid peroxidation and hepatic antioxidants in alcoholic liver disease. *Gut* 31: 1311-17.
20. Videla, L. A. & Valenzuela, A. (1982) Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelation and pathological implications. *Life Sci.* 31: 2395-2407.
21. Ronis, M.J.J., Huang, J., Crouch, J., Mercado, C., Irby, D., Valentine, C.R., Lumpkin, C.K., Ingelmen-Sundberg, M. and Badger, T.M.J. (1993) Cytochrome P450 CYP2E1 induction during alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol



- concentrations in rats. *J Pharm Exp Ther.* 264, 944-950.
22. Lieber, C.S. (1999) Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): The first 30 years (1968-1998) Alcoholism: Clinical and Experimental Research 23, 991-1007.
  23. Philpot R. M. (1991) Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. In: *Methods in Enzymology. Cytochrome P450* Waterman and Johnson EF, Eds) Vol 206 pp 623-631. New York. Academic press.
  24. Amet, Y., Berthou, F., Goasduff, T., Salaun, J.P., Le Berton, L., Menez, J.F., (1994). Evidence that cytochrome P450 2E1 is involved in the ( $\omega$ 1)-hydroxylation of lauric acid in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1168-1174.
  25. Hirohide, A., Imaoka, S., Kuroki, T., Monna, T., Funnae, Y., (1996). Microsomal ethanol oxidizing System activity by human hepatic cytochrome P450s. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 1004-1009.
  26. Lieber, C.S. (1997) Cytochrome P450 2E1: its physiological and pathological Role. *Physiological Reviews*: 77, 517-544.
  27. Halliwell, B., Hu, M.L., Louie, S., et al., (1992). Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS Lett.* 16, 62-66.
  28. Baliga, R., Ueda, N., Walker, R.R., and Shah, S.V. (1997) Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *American Journal of Kidney Diseases* 29, 465-477.
  29. Fryer, M. J., 1997. Vitamin E may slow kidney failure owing to oxidative stress. *Redox Rep.* 3, 259-261.
  30. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J., (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry.* 239, 70-76.
  31. Brink, N., Bonnichsen, R. and Theorell, H. (1954). A modified method for the enzymatic microdetermination of ethanol. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 10, 223-226.
  32. Orellana, M., Fuentes, O., Rosenbluth, H., Lara, M. and Valdés, E. (1992) Modulation of rat liver peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation by starvation. *FEBS Lett.* 310, 193-196.
  33. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
  34. Omura, T., Sato, R., (1964). The carbon monoxide-binding pigment by liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385.
  35. Reinke, L.A. and Moyer, M.J. (1985) p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug. Metab. Dispos.* 13, 548-552.
  36. Handler, J.A., Bradford, B.U., Glassman, E., Ladine, J.K., Thurman, R.G., (1986). Catalase-dependent ethanol metabolism in vivo in deer mice lacking alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4487-4492.
  37. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4355.
  38. Kera, Y.; Ohbora, Y.; Komura, S. (1988) The metabolism of acetaldehyde and not acetaldehyde itself is responsible for in vivo ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Biochem. Pharmacol.* 37:3633-3638.
  39. Lieber, C.S. (1996) Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and non-alcoholic liver disease. In: *Advances in Pharmacol.* vol.38, 601-628.
  40. Cecchin, E. and De Marchi, S. (1996). Alcohol misuse and renal damage. *Addiction Biol.* 1, 7-17.
  41. Lucas, D., C. Menez, C. Girre, P. Bodenez, E. Hispard, and J.F. Menez. Decrease in cytochrome p-4502E1 as assessed by the rate of chlorzoxazone hydroxylation in alcoholics during the withdrawal phase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19:362-366, 1995.
  42. Chan, W.K., Nguyen, L.T., Miller, V.P., Harris, R.Z. (1998) Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A4 by grapefruit juice and red wine. *Life Sci.* 62, 135-142.
  43. Chun, Y.J., Kim, M.Y., Guengerich, F.P. (1999) Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 262, 20-24.
  44. Salazar, D. E., C. L. Sorge, and G. B. Corcoran. Obesity as risk factor for drug-inducing organ injury. VI. Increased hepatic P-450 concentration and microsomal ethanol oxidizing activity in the obese overfed rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 315-320, 1988.
  45. Bellward, G. D., T. Chang, J. H. Rodriguez, J. H. McNeil, S. Maines, D. E. Ryan, W. Levin, and P. E. Thomas. Hepatic cytochrome P-450 induction in the spontaneously diabetic BB rat. *Mol. Pharmacol.* 33:140-143, 1987.
  46. Giovaninni L, Miglioni M, Longoni BM, Dast DK, Verteli AA, Panichi V. Resveratrol, a

- polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidney. *J Cardiovas Pharmacol* 2001 Mar;37(3):262-70.
47. Bertelli A., Panichi V., Fillipi C., Bertelli A., (2001) Resveratrol, a polyphenol found in wine; reduces ischemia reperfusion injury in rat kidney. *J Cardiovas Pharmacol*, Vol 37, 267-270.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Fondo de Ciencias y Tecnología (FONDECYT, proyecto N°1990784). Los autores agradecen la asistencia de los técnicos Diego Soto y Claudio Vilches.

Correspondencia:  
Rodrigo Castillo Peñaloza  
r\_castillo\_p@hotmail.com