

Estudio comparativo del consumo crónico de vino tinto sobre la expresión y la actividad del citocromo P₄₅₀ en hígado y riñón de rata

Patricio Andrés Huerta Bustamante*

Patricio Alejandro Henríquez Huerta*

Rodrigo Luis Castillo Peñaloza*

Rodrigo Andrés Carrasco Loza *

Myriam Orellana B, MSc**

Ramón Aníbal Rodrigo Salinas, MD**

Resumen

El metabolismo del etanol involucra la participación de isoenzimas del citocromo P₄₅₀ (CYP), principalmente con la contribución de la isoenzima 2E1 (CYP 2E1), cuya actividad es inducida por la exposición crónica al alcohol. El metabolismo etílico está relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), responsables de la generación de estrés oxidativo. Por otra parte, se ha sugerido que los antioxidantes contenidos en el vino ejercerían un efecto protector contra la injuria oxidativa. El objetivo de este estudio fue comparar el efecto del consumo moderado de vino tinto sobre la expresión y la actividad del CYP 2E1 en hígado y riñón de rata. Ratas macho adultas fueron tratadas con agua (control), etanol (12,5%), vino tinto (12,5% de etanol) o vino tinto desalcoholizado por 10 semanas. El contenido de CYP total y CYP 2E1 fue evaluado en la fracción microsomal de riñón e hígado. La oxidación del etanol y p-nitrofenol fue tomada como índice de actividad de CYP 2E1, analizándose la contribución relativa de etanol y componentes no alcohólicos del vino. El etanol aumentó los contenidos de CYP total y CYP 2E1, así como la hidroxilación del p-nitrofenol y la oxidación del etanol tanto en hígado como en riñón. Esos efectos fueron atenuados por la administración de vino tinto. Con esta información es posible sugerir que los componentes no alcohólicos del vino tinto son capaces de modular el aumento en la expresión y la actividad del CYP 2E1 de hígado y riñón de la rata inducida por etanol. [Huerta PA, Henríquez PA, Castillo RL, Carrasco RA, Orellana M, Rodrigo RA. Estudio comparativo del consumo crónico de vino tinto sobre la expresión y la actividad del citocromo P₄₅₀ en hígado y riñón de rata. MEDUNAB 2003; 6(16): 4 - 9]

Palabras clave: Citocromo P₄₅₀, etanol, estrés oxidativo, riñón de la rata, hígado de la rata.

Introducción

El citocromo P₄₅₀ (CYP) es una familia de isoenzimas que metaboliza 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.^{1,2}

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.³ Numerosos estudios indican que el consumo crónico de etanol aumenta la actividad de diversas especies del CYP, en particular de la isoenzima CYP 2E1.^{3,4} Se sabe que en la oxidación del etanol están implicadas más de una isoforma del CYP, siendo la contribución de CYP2E1 la más importante de esta reacción.⁵ El CYP utiliza oxígeno como uno de sus sustratos y se describe como un generador eficaz del anión superóxido, una de la especies reactivas del oxígeno (ROS) implicada en la generación del estrés oxidativo.⁶

Se ha sugerido que los ROS están implicados en el daño hepático y renal que se observa en el consumo crónico de etanol. Los ROS pueden causar lipoperoxidación de las membranas de la célula y de los organelos y, por tanto, la alteración de su integridad estructural y sus propiedades funcionales.⁷⁻⁹ Por otra parte, el sistema de defensa antioxidante se puede reforzar in vivo por algunos componentes de la dieta con propiedades antioxidantes. Las fuentes naturales de antioxidantes, tales como frutas, verduras, té o vino, contienen polifenoles como los flavonoles, que son particularmente abundantes en vino tinto chileno. Estos compuestos se comportan como atrapadores de radicales libres, quelantes de metales y moduladores enzimáticos.¹⁰ Por lo tanto, el consumo moderado de vino tinto puede tener un efecto protector contra los agentes oxidantes, pese a la presencia del etanol.¹¹⁻¹⁴

* Estudiante, Carrera de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

** Profesor Asociado, Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Correspondencia: Sr. Huerta, Manuel Montt N° 0404, Buin, Chile; E-mail: pathuerta@mixmail.com

Artículo recibido: 11 de diciembre de 2002; aceptado: 11 de abril de 2003

Tabla 1. Capacidad del plasma de reducir hierro (FRAP) y proteínas microsomales totales en hígado y riñón de rata y contenido total CYP₄₅₀ en rata

Grupo	FRAP (µM)	Proteína microsomal (mg/g tejido)		Citocromo P ₄₅₀ total (nmol /mg proteína)	
	Riñón	Riñón	Hígado	Riñón	Hígado
Control	240 ± 15 (18)	9.70 ± 0.65 (10)	10.20±1.10 (15)	0.10 ± 0.03 (8)	0.47±0.12 (12)
Etanol	249 ± 20 (13)	9.80 ± 0.47 (10)	9.90±1.20 (16)	0.15 ± 0.04 ^{abc} (8)	0.79±0.10 ^{ac} (8)
Vino tinto	370 ± 20 ^{abd} (11)	10.50 ± 0.49 ^{ab} (5)	10.80±1.60 (15)	0.09 ± 0.03 (9)	0.55±0.10 (8)
Vino tinto desalcoholizado	301 ± 25 ^{ab} (10)	10.70 ± 0.14 ^{ab} (5)	11.20±1.15 (15)	0.08 ± 0.02 (6)	0.33±0.04 ^{abc} (8)

Valores medidos correspondían a promedios ± 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.

El objetivo de este trabajo fue el de investigar el efecto del vino tinto en la expresión y en la actividad del CYP2E1 en hígado y riñón de rata, una de las isoenzimas del CYP que contribuye en una proporción importante a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Se espera que el consumo crónico y moderado de vino tinto atenúa el efecto del etanol de inducir una sobre-expresión de la actividad del CYP₄₅₀ en hígado y riñón de rata.

Materiales y métodos

Animales. Ratas macho (cepa Wistar) que pesaban 200 ± 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 hasta -3 Mpa.¹²

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 y expresada en µM.³² Los niveles sanguíneos de etanol fueron determinados por un micrométodo enzimático descrito por Brink.³³

Parámetros microsomales del hígado. Los microsomas fueron preparados por la ultracentrifugación como se describe en Orellana¹⁵ y la proteína microsomal fue medida por el método de Lowry¹⁶ usando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar. El contenido total del citocromo P₄₅₀ fue medido de acuerdo al método de Omura y Sato.¹⁷ La hidroxilación del p-nitrofenol a 4-nitrocatecol fue medida espectrofotométricamente a 546 nm de acuerdo con el método descrito de Reinke y Moyer.¹⁸ La oxidación microsomal del etanol fue determinada según el método descrito por Handler.¹⁹

Western blots. El western immunoblotting fue realizado usando el gel de poliacrilamida SDS al 7.5% según lo descrito por Towbin.²⁰ 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).

Insumos. 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, EEUU. El NADPH, isocitrato deshidrogenasa, isocitrato del sodio, NAD, FAD, ditiotreitol, p-nitrofenol, BSA fueron obtenidos de Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, EEUU). Todos los otros químicos fueron obtenidos desde Merck u otras fuentes comerciales y eran de la más alta pureza.

Análisis estadísticos. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar (DS), 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 período 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 ± 1.8 ($n = 15$) y el consumo de líquido (ml/día/100 g de peso corporal) de 9.49 ± 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 ± 0.20 y 1.87 ± 0.14 g/día/100 g ($n=14$) fueron los valores para el control y el etanol, respectivamente].

Los niveles de etanol en la sangre de las ratas que recibieron el etanol o vino tinto fueron (mg/dl) 46.3 ± 5.1 ($n = 14$) y 52.3 ± 8.1 mg/dl ($n=14$), respectivamente. Tal como muestra la tabla 1, el tratamiento con vino elevó significativamente (54%) la capacidad antioxidante del plasma. 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 2. 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.

El análisis del Western blot (figuras 1 y 2) mostró que la intensidad de las bandas para el contenido de CYP 2E1

Tabla 2. Oxidación del etanol y del p-nitrofenol en microsoma de hígado y riñón de rata (nmol / min / mg proteína microsomal)

Grupo	Etanol		p-nitrofenol	
	Riñón	Hígado	Riñón	Hígado
Control	2.85 ± 0.68 (6)	5.35 ± 0.88 (15)	0.053 ± 0.015 (8)	0.22 ± 0.05 (6)
Etanol	4.38 ± 0.85 ^{acd} (6)	9.58 ± 0.75 ^a (15)	0.149 ± 0.040 ^{acd} (9)	0.40 ± 0.10 ^a (5)
Vino Tinto	2.60 ± 0.68 (5)	7.51 ± 0.72 ^{ab} (15)	0.101 ± 0.025 ^a (5)	0.34 ± 0.05 ^a (5)
Vino Desalcoholizado	2.38 ± 0.8 (5)	4.27 ± 0.22 ^{abc} (15)	0.073 ± 0.025 (5)	0.18 ± 0.12 ^{bc} (5)

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.



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.

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 en el riñón.

Discusión

Durante los últimos años se ha acumulado gran cantidad de evidencias que reafirman la hipótesis que el consumo crónico de etanol produce una variedad de efectos deletéreos a nivel hepático y renal.^{21, 22} La oxidación del etanol aumenta la producción de ROS, que son mediadores del daño tisular que sigue a la intoxicación aguda con etanol. Además, la exposición a etanol puede estimular su metabolismo por el hígado y otros tejidos extrahepáticos, como el riñón. Sin embargo, son escasos los estudios sobre el efecto del tratamiento crónico con etanol sobre su metabolismo por el riñón.

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 (Figura 1), y concuerda con los resultados comunicados en hígado.³ 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 que se observa en estas condiciones²³, 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 es debido a sus componentes no alcohólicos, principalmente los polifenoles que actúan como moduladores enzimáticos, entre sus propiedades antioxidantes.^{11-13, 24}

Existen varios estudios sobre el efecto antioxidante del vino tinto,^{11-13, 24} pero pocos acerca de su efecto sobre la actividad del citocromo P₄₅₀. Chan y cols comunicaron que el jugo de uva, así como el vino tinto, aumenta las concentraciones plasmáticas de muchos agentes terapéu-

Contenido P450 2E1 Hígado (tratados v/s control)

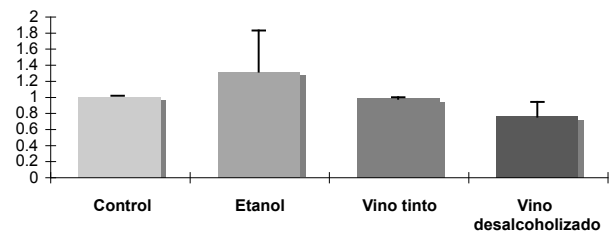


Figura 3. Densitometría del Western immunoblotting usando anticuerpos policlonales contra citocromo P₄₅₀ 2E1 de hígado de rata. Los valores son expresados como la razón tratados/control de unidades densitométricas arbitrarias de cantidad de proteína y están expresadas como promedio ± D.S. de al menos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

Contenido CYP 2E1 Riñón (tratados v/s control)

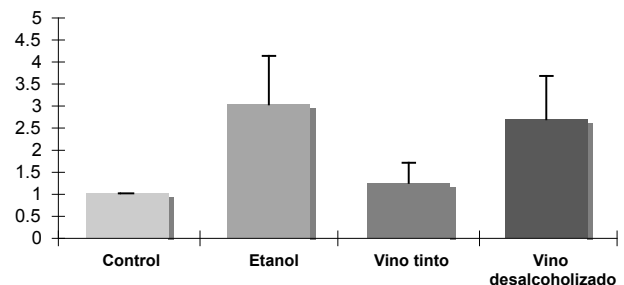


Figura 4. Densitometría del Western immunoblotting usando anticuerpos policlonales contra citocromo P₄₅₀ 2E1 de riñón de rata. Los valores son expresados como la razón tratados/control de unidades densitométricas arbitrarias de cantidad de proteína y están expresadas como promedio ± D.S. de al menos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

ticos. Se cree que estas interacciones son mediadas vía inhibición del CYP3A1 intestinal por flavonoides u otros productos químicos presentes en el jugo de uva o en el vino tinto pese a que el mecanismo de esta inhibición aún no ha sido caracterizado. Se sabe que otras isoenzimas del CYP, junto con CYP 2E1, participan en la oxidación del etanol.⁵ El resveratrol, un polifenol encontrado en vino tinto y el jugo de uvas peladas oscuras, es un inhibidor selectivo de las isoenzimas CYP 1A1 y 1A4e humanos.²⁵ ²⁶ Se ha divulgado que el vino tinto chileno de Cabemet Sauvignon usado en el actual estudio es particularmente rico en polifenoles, con la concentración de flavonoides más alta reportada.²⁷

Puesto que los polifenoles se comportan como moduladores enzimáticos, incluyendo la regulación de las algunas actividades del CYP,^{25, 26} estos compuestos podrían mediar la inhibición de la actividad del CYP 2E1 y/o disminuir su contenido, como han demostrado los 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.

Se sabe que la actividad del CYP 2E1 inducida por el etanol es una de las especies CYP que producen anión superóxido en mayor cantidad, el cual contribuye a la generación de estrés oxidativo.³ Los resultados preliminares en nuestro laboratorio han demostrado que el consumo de vino tinto aumenta la razón GSH/GSSG del riñón de rata y la actividad de enzimas antioxidantes, disminuyendo el contenido de malondialdehído (MDA). Los antioxidantes tales como bioflavonoides disminuyen el riesgo de daño oxidativo causado por ROS, debido a su habilidad para captar radicales libres y quelar metales.^{10, 28} Los flavonoides polifenólicos del vino, tales como quercetina, pueden también ejercer un efecto protector contra la citotoxicidad de ROS, probablemente debido a su afinidad por las membranas.²⁹ De esta manera se espera que aquellas fuentes nutricionales ricas en antioxidantes, incluyendo las proporcionadas por el vino tinto, atenúen el daño causado por los agentes oxidantes, hipótesis que ha sido recientemente documentada.²⁴

Aunque el mecanismo de este efecto aún no ha sido bien dilucidado, los compuestos polifenólicos del vino tinto podrían reforzar el sistema antioxidante responsable de contrarrestar los efectos del ROS. De hecho, fue encontrada una capacidad antioxidante aumentada del plasma en seres humanos después de la ingestión de cantidades moderadas de vino tinto y de vino tinto desalcoholizado.¹¹ ¹² Además, se ha reportado recientemente que el consumo moderado del vino tinto protege la rata contra de la oxidación in vivo.¹³ El resveratrol administrado en dosis que producen niveles plasmáticos alcanzados en bebedores moderados protege al riñón de los efectos bioquímicos, morfológicos y funcionales del daño oxidativo producido por la isquemia-reperusión.^{30, 31} 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 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 moderado del vino tinto rico en flavonoles. Con esto se podría concluir que el consumo moderado de vino tinto atenúa el efecto inductor del etanol sobre la expresión y la actividad del CYP en hígado y riñón de rata; a su vez, el vino desalcoholizado tiene efectos disímiles en las isoenzimas de la CYP₄₅₀ según sea hígado y riñón, quedando de manifiesto la diferencia en el comportamiento de esta enzima según su ubicación hepática o extrahepática.

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.

Summary

The chronic intake's effect of red wine in the expression and activity of the cytochrome P₄₅₀. A Comparative study in rat kidney and liver is done. The ethanol metabolism involves the action of cytochrome P₄₅₀ enzymes (CYP), mainly with contribution of the isoenzyme 2E1 (CYP 2E1). The activity of this isoenzyme is kept, primarily, by the chronic alcohol intake. The ethylic metabolism is associated with the production of oxygen reactive species (ORS), which are the source for oxidative stress. The antioxidants of e wine, have a protection effect against the oxidative injury. The aim of this study is, basically, to compare the effect of moderate intake of red wine over the expression and the activity of the CYP 2E1 by the liver and the kidneys rats'. Adult male Rats were given tap water (control group), and ethanol, as red wine, 12,5%. (study group). Another group received a non-alcohol red wine for a period of 10 weeks. The total contain of the CYP 2E1 was evaluated at the microsomal fraction from kidney and liver. The ethanol and p-nitrofenol oxidation was take it as activity indicator of CYP 2E1, by analyzing the relative contribution of the ethanol and non-alcoholic components of the wine. The ethanol increased the concentration of the total CYP and CYP 2E1, as well the hydroxylation of the p-nitrofenol and the oxidation of the ethanol in the liver and the kidney. These effects were decreased significantly by the red wine consumption. We also may suggest that the non-alcoholic components of the red wine could contribute for the increased of the CYP 2E1 expression and activity of the liver and kidney's rats induced by ethanol.

Key words: Cytochrome P₄₅₀; ethanol; oxidative stress; rat kidney; rat liver.

Referencias

1. Philpot RM. Characterization of cytochrome P₄₅₀ in extrahepatic tissues. *Method Enzimol* 206: 623-31.
2. Amet Y, Berthou F, Goasduff T, Salaun JP, Le Berton L, Menez JF. Evidence that cytochrome P450 2E1 is involved in the (1)-hydroxylation of lauric acid in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203:1168-74.
3. Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): The first 30 years (1968-1998). *Clin Exp Res* 1999; 23: 991-1007.
4. Ronis MJ, Huang J, Crouch J, et al. Cytochrome P₄₅₀ CYP2E1 induction during alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *J Pharm Exp Ther* 1993; 264:944-50.
5. Hirohide A, Imaoka S, Kuroki T, Monna T, Funnae Y. Microsomal ethanol oxidizing system activity by human hepatic cytochrome P₄₅₀. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 277: 1004-9.
6. Lieber CS. Cytochrome P₄₅₀ 2E1: its physiological and pathological Role. *Physiol Rev* 1997; 77: 517-44.
7. Halliwell B, Hu ML, Louie S, et al. Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS Lett* 1992; 16: 62-6.
8. Baliga R, Ueda N, Walker RR, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:465-77.
9. Fryer MJ. Vitamin E may slow kidney failure owing to oxidative stress. *Redox Rep* 1997; 3: 259-61.
10. Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma oxidant status. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 46, 895-903.
11. Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, et al. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52:733-6.
12. Serafini M, Malani G, Ferro-Luzzi A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* 1998; 128:1003-7.
13. Roig R, Cascón E, Arola L, Bladé C, Salvadó MJ. Moderate red wine consumption protects against oxidation in vivo. *Life Sci* 1999; 64:1517-24.
14. Sveglati B, Jezequiel AM, Orlandi F. Wine: risk factors for liver disease and antifibrotic compounds. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25: 143-5.
15. Orellana M, Fuentes O, Rosenbluth H, Lara M, Valdés E. Modulation of rat liver peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation by starvation. *FEBS Lett* 1992; 310:193-6.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
17. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment by liver microsomes. *J Biol Chem* 1964; 239: 2379-85.
18. Reinke LA, Moyer MJ. p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos* 1985; 13: 548-52.
19. Handler JA, Bradford BU, Glassman E, Ladine JK, Thurman RG. Catalase-dependent ethanol metabolism in vivo in deermice lacking alcohol dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:4487-92.
20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-5.
21. Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *Adv Pharmacol* 1996; 38: 601-28.
22. Cecchin E, De Marchi S. Alcohol misuse and renal damage. *Addiction Biol* 1996;1: 7-17.
23. Orellana M, Valdés E, Fernández J, Rodrigo R. Effects of chronic ethanol consumption on extramitochondrial fatty acid oxidation and ethanol metabolism by rat kidney. *Gen Pharmacol* 1996; 30: 719-23.
24. Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical Biol Med* (en prensa).
25. Chan WK, Nguyen LT, Miller VP, Harris RZ. Mechanism-based inactivation of human cytochrome P₄₅₀ 3A4 by grapefruit juice and red wine. *Life Sci* 1998; 62:135-42.
26. Chun YJ, Kim MY, Guengerich FP. Resveratrol is a selective human cytochrome P₄₅₀ 1A1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262, 20-4.
27. McDonald MS, Hughes M, Burns J, Lean MEJ, Matthews D, Crozier A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 368-75.
28. Shimoi K, Shen B, Toyokuni S, Mochizuki R, Furiori M, Kinai N. Protection by alpha G-rutin, a water-soluble antioxidant flavonoid, against renal damage in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 453-60.
29. Kuhlmann MK, Horsh E, Burkhardt G, Wagner M, Kohler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol* 1998; 72:536-40.
30. Giovannini 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; 37:262-70.
31. Bertelli A, Panichi V, Fillipi C, Bertelli A. Resveratrol, a polyphenol found in wine; reduces ischemia reperfusion injury in rat kidney. *J Cardiovas Pharmacol* 2001; 37: 267-70.
32. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239:70-6.
33. Brink N, Bonnicksen R, Theorell H. A modified method for the enzymatic microdetermination of ethanol. *Acta Pharmacol Toxicol* 1954; 10:223-6.