

# ÁLCOOL E RADICAIS LIVRES DE OXIGÉNIO\*

M. LURDES MIRA, C. F. MANSO

Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina. Lisboa

## RESUMO

Radicais livres de oxigénio podem ser gerados durante a metabolização do etanol pelo citocrómio P450, ou devido à formação de xantina oxidase por acção do etanol sobre a xantina desidrogenase. Após transformação em acetaldeído, a metabolização deste composto por xantina oxidase ou por aldeído oxidase também gera radicais de oxigénio. Apresenta-se a hipótese de haver um ciclo vicioso amplificador durante a metabolização do etanol pela aldeído oxidase, que seria responsável por uma intensa lipoperoxidação.

## SUMMARY

### Alcohol and Oxygen Free Radicals

Oxygen free radicals may be generated during ethanol metabolism by cytochrome P450, or due to the formation of xanthine oxidase by ethanol effect on xanthine dehydrogenase. After transformation into acetaldehyde, the metabolism of this compound by xanthine oxidase or by aldehyde oxidase also generates oxygen radicals. We present the hypothesis of a vicious cycle during ethanol metabolism by aldehyde oxidase, which would amplify the process and be responsible for an increased degree of lipid peroxidation.

## INTRODUÇÃO

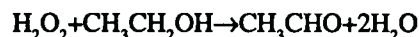
Num trabalho anterior fizemos uma revisão de diversos aspectos relacionados com a importância do álcool em fisiopatologia<sup>1</sup>.

Vimos que o etanol é metabolizado em acetaldeído por 3 vias distintas e que, por sua vez, o acetaldeído é metabolizado em acetato também de 3 modos diferentes. Daqui resulta que há 9 mecanismos para a transformação do etanol em acetato, composto que, uma vez activado pelo coenzima A, vai ser utilizado no metabolismo energético ou na síntese de ácidos gordos, sob a forma de acetil CoA (Fig. 1).

Todas estas vias têm uma importância variável. A desidrogenase do álcool é responsável pela metabolização oxidativa de 70 a 80% do etanol. O MEOS (microsomal ethanol oxidizing system) está hoje identificado com o citocrómio P450. Contudo é de notar que existe um isoenzima, o P450 II E1 (gene no cromossoma 7) que é o principal responsável pela metabolização do etanol. Contudo dado que outros isoenzimas também transformam etanol justifica-se manter a designação MEOS<sup>2</sup>.

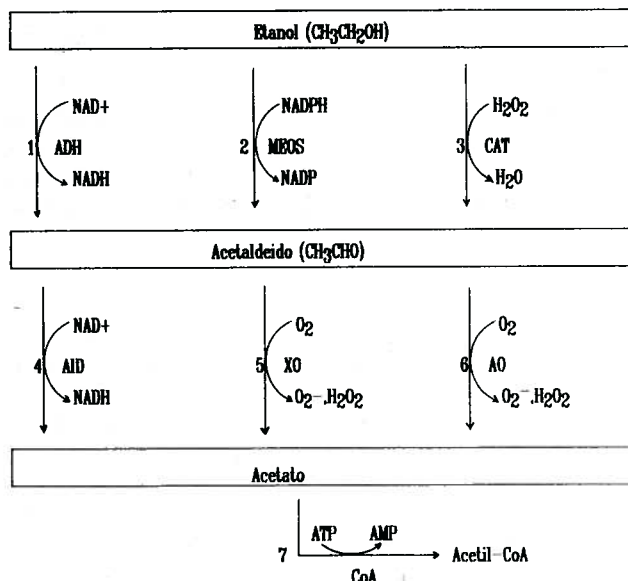
A sua principal vantagem é ser adaptativo. Porém é pouco activo a baixas concentrações de etanol.

A catalase parece não actuar sobre o etanol nas condições habituais, pois requer a presença de ácidos gordos em elevadas concentrações, que nos peroxisomas são metabolizados com geração de peróxido de hidrogénio necessário para acção da catalase:



Este facto talvez explique que o jejum ou ingestão de manteiga ou de outras gorduras facilite a metabolização do etanol. Recentemente demonstrou-se que a catalase é o principal metabolizador de etanol no sistema nervoso central e este facto pode ser revestido de grande importância (ver adiante)<sup>3,4</sup>.

A metabolização do acetaldeído pode ser também executada por 3 vias distintas: a aldeído desidrogenase mito-



1-des. álcool; 2-cit P450; 3-catalase; 4-ald. desid.; 5-xantina oxidase; 6-aldeído oxidase; 7-acetil-CoA sintetase

Fig. 1 — Metabolismo do etanol em acetil CoA

\* Trabalho subsidiado pelo INIC

condrial, geradora de equivalentes redutores, a xantina oxidase e a aldeído oxidase, que, pelo contrário, originam vias oxidativas.

## OS RADICAIS DO ETANOL

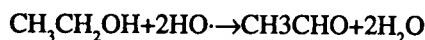
A partir do etanol podem gerar-se 3 tipos de radicais:

$\text{CH}_3\text{-CH}\ddot{\text{O}}\text{H}$ .....	$\alpha$ -hidroxietil
$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ .....	$\beta$ -hidroxietil
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O}^\bullet$ .....	etoxil

Os dois primeiros são oxidantes, ao passo que o terceiro é redutor. O  $\alpha$ -hidroxietil é o mais frequente. A vitamina C medeia a formação de radicais etoxil na presença de etanol<sup>5</sup>.

## ETANOL COMO CAPTADOR DE RADICAL HIDROXIÉO

O etanol é captador de radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ )<sup>6</sup>:



Como se vê formam-se duas moléculas de água e acetaldeído, por abstracção de dois átomos de hidrogénio do etanol.

## GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES DE OXIGÉNIO PELO ETANOL

**A evidência** — Diversas são as razões que levam a pensar que o etanol ingerido pelo homem ou pelo animal de experiência é metabolizado através de vias que produzem colateralmente radicais livres de oxigénio.

Entre estas temos:

a) a deplecção de glutatião no fígado após administração de uma dose elevada de etanol. Porém parte do glutatião é expulso pela bilis sob a forma de adutos de aldeídos<sup>7</sup>.

b) a evidência de peroxidação dos lípidos microsómicos após ingestão aguda de doses elevadas de etanol<sup>8</sup>.

c) a clivagem oxidativa do ácido fólico<sup>9</sup>.

d) a activação da síntese do colagénio que leva à fibrose e á cirrose hepática.

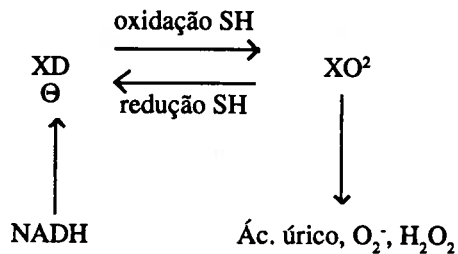
e) a clivagem de ADN de que resulta o aumento de risco de cancro nos alcoólicos<sup>10</sup>

f) a acumulação de lipofuscina em cardiomiocitos em cultura<sup>11</sup>

**Os mecanismos** — Se existem razões mais do que suficientes para admitir que a metabolização hepática de etanol gera radicais livres de oxigénio, o verdadeiro mecanismo, ou pelo menos o mais importante, não está esclarecido. Faremos uma revisão dos mecanismos que têm sido estudados nestes últimos anos.

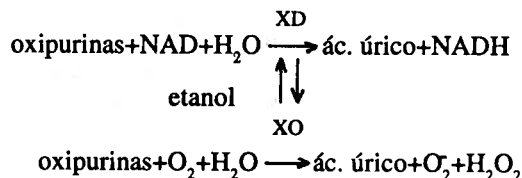
## INIBIÇÃO DA XANTINA DESIDROGENASE POR NADH

O etanol aumenta a concentração de NADH que inibe a XD. Nestas condições as oxipurinas são transportadas pela xantina oxidase reversível (XOr) que não é inibida. A XOr gera  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



## A TRANSFORMAÇÃO DE XANTINA DESIDROGENASE EM XANTINA OXIDASE

A transformação de oxipurinas (hipoxantina e xantina) em ácido úrico é feita de dois modos diferentes: pela xantina desidrogenase (XD) e pela xantina oxidase (XO). A primeira reacção tem como receptor de electrões o coenzima NAD, que fica reduzido, ao passo que a segunda tem como receptor de electrões o oxigénio, que fica reduzido a superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e a peóxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):



Entre os compostos que transformam a XD em XO encontra-se precisamente o etanol. A consequência é a obtenção de mais uma alta percentagem da forma enzimática responsável pela geração de formas activas de oxigénio<sup>12-13</sup>. Ao mesmo aumenta a formação de ácido úrico por falta de retrocontrolo da XOr.

## A DEGRADAÇÃO DE PURINAS APÓS ACTIVAÇÃO DO ACETATO

Já há bastante tempo que se sabe que o consumo de bebidas alcoólicas está associado a hiperuricémia e a gota. O etanol activa a degradação de purinas devido ao aumento de degradação de ATP em AMP durante a activação do acetato<sup>14-16</sup> (Fig. 2).

## FERRO E MICROSOMAS

Como vimos o etanol é metabolizado em acetaldeído nos microsomas hepáticos através do MEOS, nome que convém manter, embora hoje se saiba que o P450 II E1 é de longe o mais activo e adaptável enzima na metabolização do etanol.

Dada a baixa afinidade deste sistema, ele só actua com eficácia quando a concentração de etanol se torna elevada no hepatócito, ou após consumo crónico.

Este sistema é formado por NADPH-citocrómio P-450 redutase, um flavoenzima, que fornece electrões ao citocrómio p450. O etanol é oxidado em acetaldeído com oxidação de NADPH. Contudo a transferência de electrões também origina a formação de radical superóxido, que é dismutado em peróxido pela superóxido dismutase. Estes na presença de ferro, originam radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) que actua directamente sobre o etanol numa reacção não en-

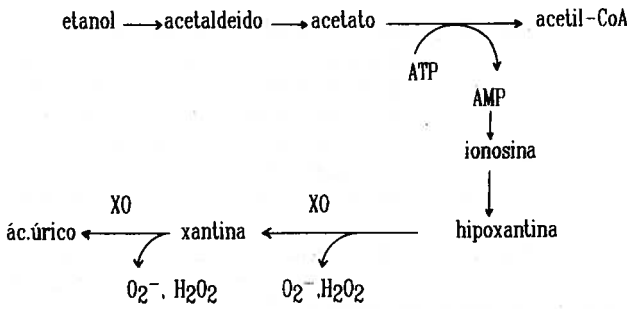


Fig. 2 — Consumo de ATP e degradação de purinas com geração de radicais livres de oxigénio durante a formação de acetato activo pela acetilcoquinase

zimática já descrita<sup>17-20</sup>(Fig.3). De qualquer modo a redutase parece ser o ponto crítico para a actuação do ferro com o oxigénio e produção de HO<sup>6,2,1</sup>. Estudos semelhantes realizados com núcleos de hepatocitos produziram resultados parecidos mas de menor intensidade, o que faz pensar que o etanol não desencadeie um stress oxidativo no núcleo<sup>22</sup>. Mais interesse parece ter o facto de se ter demonstrado que também o NADH fornece electrões ao NADPH, via citocromio b<sup>5</sup>. A importância desta desco-

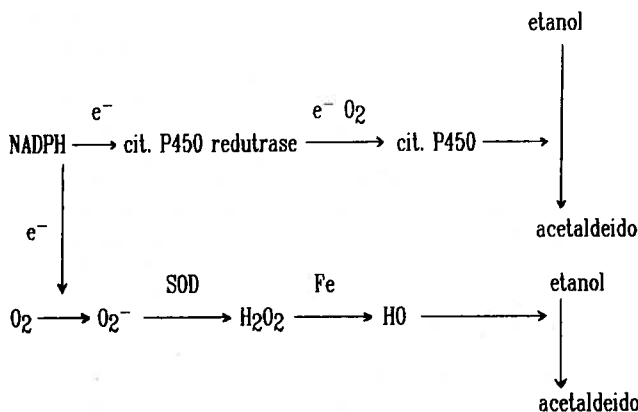
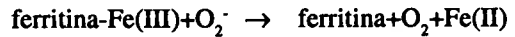


Fig. 3 — Transformação enzimática e não enzimática do etanol em acetaldeído nos microsomas hepáticos

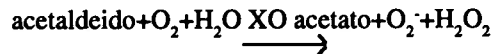
berta resulta da grande concentração de NADH após consumo de etanol, que assim potencia a acção de NADPH reductase<sup>23</sup>.

### ACÇÃO DA XANTINA OXIDASE

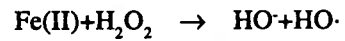
Como vimos o etanol favorece a acção da xantina oxidase, forma enzimática geradora de radicais de oxigénio. O radical superóxido vai reduzir o ferro da ferritina e libertá-lo:



Por outro lado a xantina oxidase metaboliza acetaldeído em acetato numa reacção semelhante à descrita para as oxipurinas:



Estão assim reunidas as condições para a geração de radicais livres de oxigénio pelo ferro:



O radical hidroxilo irá induzir a peroxidação dos lípidos da membranas e a clivagem do folato<sup>24,25</sup>.

### ACÇÃO DA ALDEIDO OXIDASE

No organismo existe um exima muito parecido com a xantina oxidase. É a aldeído oxidase (AO)<sup>1</sup>. Trata-se de um enzima que também contém molibdénio e cuja acção principal parece não ser a oxidação de aldeídos, mas sim a de oxidar compostos purínicos que não são transformados pela XO<sup>26</sup>. Trata-se pois de dois enzimas cuja actividade parece ser complementar<sup>27</sup>. Em relação ao acetaldeído a AO tem uma afinidade 30 vezes superior à da XO.

Este facto justifica o interesse demonstrado por diversos investigadores nestes últimos anos sobre a importância da geração de radicais livres após metabolização do acetaldeído pela AO.

O estudo diferencial da importância da XO e da AO é exequível pois existem inibidores específicos para cada enzima.

O oxipurinol inibe a XO, a menadiona a AO e o tungstato ambos. Em fígados de ratos tratados com etanol, a adição de tungstato inibe a peroxidação lipídica em 100%, a adição de oxipurinol inibe 0 a 40%, a adição de menadiona inibe de 36 a 75%. Estes dados confirmam a importância de aldeído oxidase neste processo. A adição de desferroxiamina, que retira o ferro, também causa abolição de 100% da lipoperoxidação, o que demonstra a importância deste metal<sup>28-30</sup>.

### PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E LESÃO TESTICULAR PELO ÁLCOOL

É bem conhecida a atrofia testicular dos alcóolicos. Fizemos uma revisão do assunto anteriormente e verificámos que ela era atribuída a muitas causas<sup>1</sup>.

Actualmente admite-se que a principal causa da lesão testicular dos alcóolicos seja a peroxidação lipídica, consequência de libertação de formas activadas de oxigénio.

Com efeito demonstra-se aumento de produção da malonildialdeído (MDA) nas mitocóndrias testiculares, ao mesmo tempo que os ácidos gordos polinsaturados diminuem (o MDA é produto de degradação dos ácidos gordos peroxidados). Por outro lado aumentam de concentração os ácidos gordos saturados, não peroxidáveis (ácido palmítico, ácido esteárico).

O glutatião reduzido sofre diminuições importantes de concentração.

Em ratos tratados com etanol a vitamina A diminuiu a lipoperoxidação<sup>31</sup>.

## METABOLIZAÇÃO DO ÁLCOOL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Estudos recentes fazem pensar na importância da catalase na metabolização do etanol no SNC.

Homogenatos de cérebro de rato foram incubados com etanol e medido o acetaldeído formado. Juntando um inibidor de ADH, o pirazol, ou um inibidor do MEOS, a metirapona, não se afecta a produção de acetaldeído.

Porém a adição de inibidores de catalase (azida, cianamida, aminotriazol) bloqueia a produção de acetaldeído<sup>3</sup>. Por outro lado adicionando ao sistema glucose e glucose oxidase (geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aumenta a produção de acetaldeído<sup>4</sup>.

Estes factos sugerem a importância da catalase no sistema nervoso central como principal metabolizador do etanol.

Dado que a catalase não gera formas activadas de oxigénio este facto tem grande importância num órgão extremamente rico em lípidos polinsaturados podendo pensar-se num mecanismo protector. Contudo é bom pensar que pode haver inconvenientes. Com efeito a catalase é extremamente activa, sendo provável que a transformação de etanol em acetaldeído seja mais rápida que a remoção deste. A consequência seria um aumento de concentração de acetaldeído no SNC, que teria graves consequências.

Não é apenas no cérebro que a catalase metaboliza etanol. Com efeito verificou-se recentemente que a catalase hepática pode ter grande importância no metabolismo do etanol em duas situações: o jejum e a ingestão de grande quantidade de gordura. Em ambos os casos os ácidos gordos são metabolizados pelos peroxisomas gerando peróxido de hidrogénio. Desde que este se encontre presente a catalase actua com a sua característica rapidez. Daqui o aforismo dos bebedores de *whisky*: *se bebes whisky, come manteiga*<sup>34,36</sup>.

O acetaldeído une-se a numerosas moléculas, tais como cisteína, albumina, proteínas de membrana, hemoglobina, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Por um lado pode inactivar estes compostos, por outro ser responsável pela indução de fenómenos imunológicos, actuando como hapteno. Também origina adutos estáveis com tubulinas de que resulta inibição da formação de microtúbulos<sup>37,38</sup>.

Finalmente há que lembrar que o acetaldeído se liga a catecolaminas e outros compostos gerando compostos de adição, os TIQs e as carbolinas, que são responsáveis pela habituação ao álcool<sup>1</sup>.

## DISCUSSÃO

O mecanismo de toxicidade do etanol inclui diversos componentes: o metabolismo redutor, a hipoglicemia, a hiperlipémia, alterações da síntese proteica, síntese de compostos tóxicos no sistema nervoso central, etc. Curiosamente o acetaldeído desempenhava um papel secundário, pois a sua concentração circulante não se tornava muito elevada. A estas causas juntava-se a desnutrição e suas consequências: avitaminoses, carência de metais, em especial zinco, que no seu conjunto eram apontadas como responsáveis pelas complicações crónicas do alcoolismo, em especial a cirrose hepática. Contudo era pouco clara a etiopatogenia desta, tendo como base as alterações descritas.

Dado que os álcoois são bons captadores de radicais livres de oxigénio, durante muito tempo esta hipótese patogénica não teve grande número de seguidores. Contudo nos últimos anos a hipótese: ingestão de etanol → radicais livres → lipoperoxidação → cirrose e outras alterações, vem tomando forma, baseada numa grande quantidade de trabalho experimental, em que o rato é o principal animal de estudo.

Sabe-se muito mais sobre a acção do álcool no rato (que não tem apetência para ele) do que sobre a acção das bebidas alcoólicas no homem.

E para já convém mencionar que etanol puro e bebida alcoólica não são a mesma coisa.

Vejam os pois qual a evidência de que radicais livres de oxigénio são produzidos em quantidade suficiente para serem lesivos para o rato e, a partir deste inferir da sua acção lesiva no ser humano.

Foram apontadas duas origens para os radicais livres, primeiro o etanol depois o acetaldeído.

No que respeita ao etanol como gerador de oxigénio activado, surge-nos um problema que está sendo analisado em diversas situações patológicas que tem aparentemente pouco de comum, como seja a lesão de reperfusão, a artrite reumatóide e o alcoolismo. Trata-se da alteração xantina desidrogenase/oxidase (XD ↔ XO).

Hoje admite-se que o fígado humano e outros órgãos possam ter activas estas duas formas enzimáticas, a XD regulável por NADH, que a inibe, e a XO não regulável e geradora de oxigénio activo.

Numa situação de intoxicação pelo etanol, a redução do coenzima iria inibir toda a XD, pelo que a degradação das oxipurinas em ácido úrico se faria pela XO.

Qual a verdadeira importância deste processo é difícil de avaliar, pois existem numerosos mecanismos controladores da síntese e degradação das purinas que entrariam em jogo e não apenas o mecanismo XD ↔ XO.

Ainda relacionado com este mecanismo temos o excesso de produção de AMP resultante da formação de acetato activo. Este AMP poderá ser recuperado em ADP e ATP ou então ser degradado até urato pela xantina oxidase. Contudo que razões existem para garantir que a degradação predomina? Parece-nos mais provável a recuperação do AMP através de diversos sistemas enzimáticos conhecidos.

Até prova em contrário pensamos que este mecanismo deve ter um significado diminuto.

A segunda forma de metabolizar etanol em radicais livres baseia-se na acção do MEOS. Este é formado por um conjunto de isoenzimas parecidos, dos quais um é especialmente afim do etanol no hepatócito, é responsável pela destoxificação de uma percentagem elevada deste; talvez 30 a 40%.

Que evidência existe de que a metabolização por esta via gere radicais livres de oxigénio? Apenas experiências com microsomas de fígado de rato ultracentrifugados e sujeitos à adição de doses elevadas de ferro quelatado numa forma que provavelmente não existe no organismo. Se o ferro for retirado por desferroxamina não se geram radicais livres. Admite-se que a NADPH-citocromio P450 redutase envie os seus electrões para este citocromio que, na presença de oxigénio fica habilitado a transformar etanol em acetaldeído por uma via oxidante e não pela via redutora da ADH. Uma certa percentagem de electrões não atingiria o citocromio, reagiria directamente com oxigénio, gerando

superóxido. Este seria transformado em peróxido de hidrogénio pela SOD. O peróxido na presença de ferro (II) seria transformado em radical hidroxilo pela bem conhecida reacção de Fenton.

Este sistema é interessante para estudos experimentais. O mecanismo de acção dos quelatos de ferro não está bem explicado e varia com o quelato usado.

Todavia no momento actual é apenas um bom modelo para experiências no rato.

Nós próprios o utilizámos em trabalhos publicados<sup>37,38</sup>.

Chegamos assim à geração de radicais a partir do acetaldeído, onde se nos deparam duas hipóteses: metabolização pela nossa conhecida xantina oxidase, ou pela aldeído oxidase (AO). A metabolização pela xantina oxidase é possível mas, dada a baixa afinidade de acetaldeído, é improvável.

A AO tem uma afinidade 30 vezes superior e existe em elevadas concentrações no fígado, será ela o principal gerador de radicais livres de oxigénio?

A evidência até agora é pequena e apenas em situações experimentais com sistemas reconstituídos.

Recentemente verificámos que a aldeído oxidase é capaz de oxidar NADH.

Por outro lado verificámos que a indução de peroxidação lipídica é maior a partir do etanol do que a partir do acetaldeído. Este facto levou-nos a sugerir a existência de um ciclo vicioso gerador de radical superóxido (Fig. 4). Procuramos neste momento confirmar a existência deste ciclo, através de trabalhos realizados com enzimas purificados. Caso ele se confirme, poderá constituir um sistema amplificador para a geração de radicais livres de oxigénio a partir do etanol<sup>39-41</sup>.

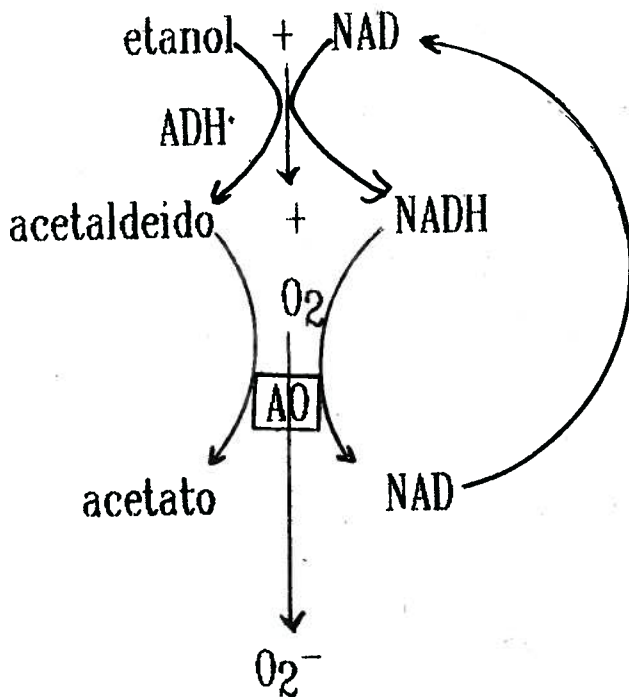


Fig. 4 — Ciclo vicioso sugerido para a geração de radical superóxido pelo sistema etanol/ADH/AO

## BIBLIOGRAFIA

1. MANSO C.: O álcool em fisiopatologia. *O Médico*, 1989; 121, 239-248.
2. LIEBER C.: biochemical and molecular basis of alcohol induced injury to liver and other tissues. *N.E.J.M.*, 1988; 319, 1639-1650.
3. ARAGON C., ROGAN F., AMIT Z.: Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochem Pharmacol*, 1992 44, 93-98.
4. GILL K., MENEZ J., LUCAS D., DEITRICH R.: Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcoholism. Clin. Exp. Research* 1992; 16, 910-915.
5. NORDMAN R., RIBIÈRE C., ROUACH H.: Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Rad. Biol. Med*, 1992, 12, 219-240.
6. CEDERBAUM A.: Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *Free Rad. Biol. Med.*, 1989, 7, 559-567.
7. SHAW S.: Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Rad Biol*, 1989, 7, 537-539.
8. CEDERBAUM A.: Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Rad Biol Med*, 1989, 7, 537-539.
9. SHAW S. Jayatilleke E., ERBERT V., COLMAN N.: Cleavage of folates during ethanol metabolism. *Biochem J.* 1989, 257, 277-280.
10. RAFAZINGHE H., JAYATILLEKE, E., SHAW S.: DNA cleavage during ethanol metabolism. *Life Sciences*, 1990, 47, 807-814.
11. SOHALL R., MAZZABADI M., BRUNK N.: Effect of ethanol on lipofuscin accumulation in cultered rat cardiac myocytes. *Free Rad. Biol. Med*, 1989, 7, 611-616
12. SULTATOS L.: Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase system in the rat. *J. Pharmac Exp Ther*, 1988 246, 946-949.
13. ABONDANZA A., BATELLI M., SOFFRITTI M., CESSI.: Xanthine oxidase status in ethanol intoxicated rat liver alcoholism. *Clinical and Exp Res* 1989, 13, 841-844.
14. FALLER J., FOX I.: Ethanol induced hyperuricemia. *NEJM*, 1982, 307, 1598-1601.
15. YOUNES M., STRUBELT o.: Enhancement of hypoxic liver damage by ethanol. *Biochem Pharmacol*, 1987, 36 2973-2977.
16. KATO S., KAWASE T., ALDERMAN J., LIEBER C.: Role of xanthine oxidase in ethanol induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology*, 1990, 98, 203-210.
17. MIRA M.L.: Geração de radicais livres de oxigénio pelos álcoois. *Arq. Port. Ciências Biológicas*, 1991, 25, 149-153.
18. EKSTROM G., CRONHOLM T., SUNDBERG M.: Hydroxyl radical production and ethanol oxidation by liver microsomes isolated from ethanol treated rats. *Biochem J.* 1986, 233, 755-761.
19. REINKE L., KOTAKE Y., MACKAY P., JANZEN E.: Spintrapping studies of hepatic free radicals formed following the acute administration of ethanol to rats: in vivo detection of 1-hydroxyethyl radicals with PBN. *Free Rad. Biol Med* 1991, 11, 31-39.
20. MACKAY P., REINKE L., RAN J.: Hydroxy radicals are generated by hepatic microsomes during NADPH oxidation: relationship to ethanol metabolism. *Free Rad Res Comm* 5; 1992, 335-346.
21. FEIERMAN D., WINSTON G., CEDERBAUM A.: Ethanol oxidation by hydroxyl radicals: role of iron chelates, superoxide and hydrogen peroxide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 9, 95-102, 1985.
22. KUKIEKKA E., CEDERBAUM A.: The effect of chronic ethanol consumption of NADH and NADPH dependent generation of reactive oxygen intermediates by isolated rat liver nuclei. *Alcohol and Alcoholism* 1992, 27, 233-239
23. DICKER E., CEDERBAUM A.: Generation of active oxygen

species and reduction of ferric chelates by microsomes in the presence of a reconstituted system containing ethanol, NAD<sup>+</sup>, and ADH. *Alcoholism Clin Exp Research*, 1990, 14 238-244.

24. SHAW S., JAYATILLEKE E.: Acetaldehyde mediated hepatic lipid peroxidation: role of superoxide and ferritin. *Biochem Biophys Res Comm*, 1987, 143, 948-990

25. SHAW S.: Lipid peroxidation, iron metabolism and radical generation induced by alcohol. *Free Rad Biol Med*, 1989, 7, 541-547

26. RAPAGOPALAN K., FRIDOVICH I., HANDLER P.: Hepatic aldehyde oxidase, *J Biol Chem* 1962, 237, 922-928.

27. KRENITSKY T., NEIL S., ELION G., HITCHINGS G.: A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 1972, 150, 585-599.

28. SHAW S., JAYATILLEKE E.: The role of aldehyde oxidase in ethanol induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochem. J.* 1990, 268, 579-583.

29 SHAW S. JAYATILLEKE E.: Ethanol induced iron mobilization: role of acetaldehyde oxidase generated superoxide. *Free Rad Biol Med* 1190, 9, 11-17

30. SHAW S. JAYATILLEKE E.: The role of cellular oxidases and catalytic iron in the pathogenesis of ethanol induced liver injury. *Life Sciences*, 1992, 50, 2045-2052.

31. ROSENBLUM E. GAVALER J., VAN THIEL D: Lipid peroxidation. A mechanism for alcohol induced testicular injury. *Free Rad Biol Med*, 1989, 7, 569-577

32 HANDLER J., THURMAN R.: Catalase dependent ethanol oxidation in perfused rat liver. Requirement for fattyacid stimu-

lated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by peroxisomes. *Eur J Biochem* 1988, 176, 477-484

33. THURMAN R., HANDLER J.: New perspectives in catalase dependent ethanol metabolism. *Drug Metab Rev*, 1989, 20 679-688.

34. HANDLER J., THURMAN R.: Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. *J Biol Chem*, 1990, 265, 1510-1515.

35. LANTERBURG B., BILZER M.: Mechanisms of acetaldehyde hepatotoxicity. *J. Hepatology*, 1988, 7, 384-390.

36. SMITH S., JUMETT R., SORRELL M., TUMAD D.: Substoichiometric inhibition of microtubule formation by acetaldehyde-tubulin adducts. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44, 65-72.

37. MIRA M. L., LOPES J., MANSO C. F.: Toxicidade do etanol e geração de radicais livres. 3.ª Sessão Científica de 1990 da Soc. Port. de Biologia de Lisboa.

38. MIRA M. L., BARREIRA L. V., MANSO C. F.: Role of NADH in ethanol induced microsomal lipid peroxidation. *Congr. Society for Free Rad Res*, Paris, 1992, 26-28.

39. MIRA M.L., BARREIRA L. V., MANSO C. F.: O papel do NADH na lipoperoxidação pelo etanol. reunião Soc Port. Fisiologia. Porto, 1992.

41. MANSO C. F., MIRA M. L., BARREIRA L. V.: The importance of NADH on microsomal lipid peroxidation induced by ethanol. *Int. Conference on Critical Aspects of Free Radicals in Chemistry and Medicine*. Viena, Austria, 1993, 14-17.



Prof. Egas Moniz.  
Prémio Nobel de Medicina Portuguesa.