

302827  
16

UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.



ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

ESTADO DEL GLUTATION SANGUINEO  
EN ENFERMOS CON HEPATOPATIA  
ALCOHOLICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARTHA GLAFIRA NAHOUL ZAYAS

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

### CAPITULO I

Nº de Pag.

#### INTRODUCCION

<u>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	1
<u>1.2 OBJETIVOS</u>	2
<u>1.3 HIPOTESIS</u>	2

### CAPITULO II

#### ANTECEDENTES

<u>2.1 GENERALIDADES</u>	3
2.1.1 FUNCIONES DEL HIGADO	3
2.1.2 SUSTANCIAS QUE INDUCEN DAÑO HEPATICO	5
2.1.3 METABOLISMO DEL ETANOL	6
2.1.4 ALTERACIONES BIOQUIMICAS HEPATICAS PRODUCIDAS POR LA INGESTION DEL ETANOL	16

### CAPITULO III

#### PARTE EXPERIMENTAL

<u>3.1 DIAGRAMA DE FLUJO</u>	19
<u>3.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS</u>	20
3.2.1 MATERIAL	20
3.2.2 REACTIVOS	24

3.2.3 EQUIPO	24
3.2.4 PREPARACION DE REACTIVOS	25
<b>3.3 METODOLOGIA</b>	<b>26</b>

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

<b>4.1 RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>4.2 DISCUSION</b>	<b>30</b>

## CAPITULO V

CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFIA	41

# **CAPITULO**

**I**

## INTRODUCCION

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El abuso en la ingestión de bebidas alcohólicas, se ha incrementado en la sociedad a nivel mundial, causando alteraciones, que han sido divididas en: psicológicas, médicas y sociológicas. Uno de los principales problemas psicológicos del alcohólico son los cambios de conducta, pudiendo pasar de un estado de euforia, al de agresividad, o del de angustia a la depresión, y de lo cual con frecuencia son conscientes de que tal acción puede resultarles con alteraciones de su integridad física y psicológica para él y su familia. Las alteraciones médicas pueden ir desde una gastritis simple, hasta la cirrosis hepática complicada, siendo esta la alteración más grave que frecuentemente los lleva a la muerte. Aún no es posible, a nivel molecular, describir los cambios que se originan por la ingestión de etanol, que progresivamente conducen a una cirrosis; los siguientes factores se han considerado asociados al proceso degenerativo: ( 23 )

1.- Una predisposición, mal definida, asociada a algún marcador genético no identificado y que explique que únicamente el 20% de los bebedores crónicos desarrollan un cuadro de cirrosis. ( 1 )

2.- La tolerancia al etanol que aparece en el bebedor crónico se correlaciona con un aumento en la actividad del Sistema Microsomal de Oxidación del Etanol (MEOS), para degradar etanol. ( 14 )

3.- Mayor consumo de NADPH a través del sistema MEOS disminuye la disponibilidad del NADPH en los sistemas microsomales que también se utiliza en la degradación de drogas y contaminantes del medio ambiente.

4.- La mayor actividad del MEOS aumenta la producción del  $H_2O_2$ , a partir de la cual se generan en mayor concentración algunos radicales libres. ( 14 )

5.- La presencia crónica de concentraciones elevadas de acetaldehído, en el hígado, también se ha asociado a la cirrosis hepática, ya que el acetaldehído es una molécula con gran reactividad, y sus concentraciones en el hígado son mayores que en la sangre circulante. ( 17 )

El etanol es muy soluble en agua y solventes orgánicos y puede cruzar las membranas celulares, atravesando así la barrera hemato-encefálica afectando el sistema nervioso central. ( 24 )

Se conoce la diferente susceptibilidad de las personas a la ingestión del etanol. Hay bebedores que su comportamiento se modifica con la ingestión de pequeñas cantidades de etanol a diferencia de otros que no lo modifican a pesar de ingestiones mayores. ( 15 )

### **1.2.OBJETIVOS:**

Determinar la utilidad de los niveles del glutatión sanguíneo en la valoración del estado funcional del hígado.

### **1.3.HIPOTESIS:**

Si los niveles de glutatión pueden reflejar el estado funcional del tejido hepático entonces será un parámetro útil para sustituir la valoración mediante la biopsia.

# **CAPITULO**

**II**



## ANTECEDENTES

### 2.1 GENERALIDADES

#### 2.1.1 FUNCIONES DEL HÍGADO:

El hígado es el mayor y más importante órgano de biosíntesis, catabolismo, y detoxificación en todo el cuerpo. Todas las sustancias absorbidas de los alimentos, en el tubo digestivo, ( salvo las que pasan por la linfa al conducto torácico directamente ) llegan al hígado, donde en general, son modificadas o utilizadas para sintetizar moléculas esenciales, que después se distribuyen por la sangre a los tejidos que las necesiten.

El resto de las sustancias de los alimentos, pueden ser almacenados en el hígado, o preparadas por él con vista a su almacenamiento en tejidos periféricos. La sangre arterial lleva al hígado muchas sustancias biológicas y productos de desecho de otros tejidos. ( 22 )

Las funciones del hígado se pueden clasificar en:

#### 1.- Metabolismo de carbohidratos.

El hígado es el principal órgano para la síntesis y almacenamiento de la energía de carbohidratos, bajo forma de glucógeno. Puede almacenar hasta 6 ó 7 por 100 de su propio peso como glucógeno, que vuelve a transformar en glucosa según las necesidades tisulares.

#### 2.- Metabolismo de lípidos

El hígado sintetiza ácidos grasos y colesterol a partir de acetil CoA. De esta manera, transforma el exceso de energía de los alimentos en la variedad más económica para el almacenamiento a largo plazo de energía: la grasa.

#### 3 - Metabolismo de proteínas

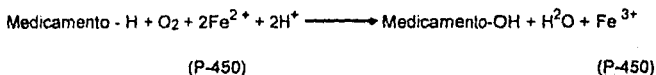
Además de producir la enorme variedad de proteínas y enzimas, que se necesitan en sus células y en otros tejidos, produce casi todos los factores de la coagulación y también prácticamente todas las proteínas plasmáticas, con excepción de las globulinas gamma ( 21 ) ( 22 )

#### 4.- Funciones de detoxificación:

La destrucción de sustancias nocivas, se aplica a la inactivación de compuestos fisiológicos; a veces, los productos del propio metabolismo hepático no son del todo deseables. Las principales reacciones químicas que intervienen en estos pasos son:

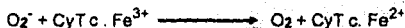
##### a) oxidación

El significado inicial de oxidación era la adición de oxígeno a un sistema, en la actualidad, estos términos tienen una aplicación más amplia. Se define la oxidación como el cambio de valencia de un átomo por pérdida de un electrón o de varios electrones. Por ejemplo:



##### b) reducción

Las reacciones de reducción es el cambio de valencia debido a la fijación de un electrón o de varios electrones. Por ejemplo:



En los ejemplos citados, podemos ver que la oxidación siempre se acompaña de una reducción. ( 24 )

##### c) hidrólisis

Es el tipo de reacciones a través de las cuales el hígado elimina los fármacos: Ejem. paso de ácido acetilsalicílico a ácidos acético y salicílico; también explica el desdoblamiento de glucósidos en azúcares y gluconas.

##### d) conjugación

Consiste en la combinación de una sustancia con un compuesto preformado en la células, dando lugar a un compuesto nuevo con propiedades más convenientes para la excreción. El efecto general consiste en enmascarar los grupos activos de la sustancia original, a menudo volviéndola más soluble, lo que facilita su transporte y excreción. ( 21 ) ( 24 )

El agente más importante de conjugación en el hombre es el ácido glucurónico.  
Ejemplo:

Conjugación en glucurónidos:

ácido glucurónico + ácido benzoico = glucurónido de benzoilo;

bilirrubina + 2 ácidos glucurónicos = diglucurónido de bilirrubina. ( 22 )

5-. Funciones hematológicas:

Factores de la coagulación. El hepatocito produce gran parte de los factores de la coagulación como son el factor I ( fibrinógeno ), factor II ( protrombina ), y las glucoproteínas dependientes de la vitamina K: los factores V, VII, IX, y X. El factor VIII, en gran parte, es sintetizado por el hígado. La vitamina K, después de su absorción intestinal, mediada por los ácidos biliares, se concentra y almacena en el hígado.

Almacenamiento que es ilimitado, y puede agotarse según el funcionamiento de la celdilla hepática. ( 21 )

Dentro de estas funciones, la que nos interesa en esta investigación es la detoxificación en sus reacciones de oxidación y reducción.

## 2.1.2. SUSTANCIAS QUE INDUCEN DAÑO HEPÁTICO.

Las sustancias que provocan daño hepático, se han clasificado de la siguiente manera:

### 1 ) Grupo hepatotóxico.

a) Sustancias que provocan degeneración grasa y necrosis centrolobulillar. Ejem.: alcohol, tetracloruro de carbono, cloroformo, metales pesados, fósforo amarillo, hongos venenosos, tetraciclinas.

b) Sustancias que producen cuadros similares a la hepatitis viral. Ejem.: cincofeno, cloranfenicol, clortetraciclina, halothane, iproniazida, novobiocina, penicilina, fenilacetilurea, fenilbutazona, pirazinamida, estreptomycin, sulfametoxipiridazina.

c) Otras sustancias que alteran la función hepática ( elevando las Transaminasas oxaloacética y la pirúvica, la Bilirrubina Total y retienen la Bromosulfaleína ) durante su administración. Ejem. anticonceptivos orales que contienen progesterona. ( 24 )

## 2) Grupo colestásico - colangiolítico.

a) Sustancias que provocan obstrucción extrahepática funcional y ocasionalmente lesiones histológicas: Ejem. arsenicales, Ac. paraminosalicílico, clorpromazina, cloropropamida, clorotiazida, etilurea, eritromicina, metimazol, metilttestosterona, noretandrolona, para-aminobenzil, fenindiona, proclorperazina, promazina, sulfadiazina, tiouracilo, tolueno ( 24 ).

### 2.1.3. METABOLISMO DEL ETANOL.

Etapas del metabolismo del etanol.

#### 2.1.3.1. Absorción

#### 2.1.3.2. Distribución en el organismo

#### 2.1.3.3. Metabolismo propiamente dicho.

#### 2.1.3.4. Productos de degradación del etanol

#### 2.1.3.5. Eliminación del etanol no degradado y de sus productos de oxidación.

#### 2.1.3.1 ABSORCIÓN DEL ETANOL:

Los carbohidratos, lípidos y proteínas de la dieta son habitualmente hidrolizados en el tubo digestivo antes de proceder a su absorción, el etanol no es hidrolizado en la luz del tubo digestivo y solo una pequeña cantidad del mismo es parcialmente oxidado por acción de una deshidrogenasa alcohólica presente en la mucosa gastro-intestinal.

La ruta de administración del etanol es determinante en la distribución y en la velocidad de su mecanismo. Generalmente la administración se hace por vía oral, así el etanol consumido, se absorbe como tal a través de las mucosas, tanto del tubo digestivo como del sistema respiratorio, y se difunde en forma rápida y uniforme hacia todo el organismo. No se ha descrito ningún sistema dependiente de energía encargado de la absorción específica del etanol, absorción que sucede por simple difusión de la concentración que alcanza en el tubo digestivo; debido a que se trata de una molécula soluble en grasas y sin propiedades electrolíticas, el etanol llega a la circulación por simple difusión a través del duodeno y yeyuno y en menor grado por el estómago y el intestino grueso ( 2 ).

Por lo tanto, la velocidad de absorción del etanol y su consecuente concentración en la sangre circulante dependerá de un conjunto de hechos como son:

#### FACTORES QUE AFECTAN LA ABSORCIÓN DEL ETANOL

- 1.- La cantidad de etanol ingerida.
- 2.- La velocidad de ingestión.
- 3.- La composición ( tipo y características ) de las bebidas alcohólicas.
- 4.- La ingestión simultánea de alimentos.
- 5.- Flujo sanguíneo en el sitio de absorción.
- 6.- La cantidad y tipo de los alimentos, etc..
- 7.- Vaciamiento gástrico.
- 8.- El sexo ( 3 ), peso, edad, raza ( 6 ), condición física del sujeto ( sobre todo la deficiencia proteica, temperatura física, ejercicio físico y ciclo menstrual )( Mod. de Wagner NY )( 9 ).

El modelo simple de absorción del etanol se basa en una cinética de primer orden donde la absorción a un tiempo dado es proporcional a la cantidad de etanol que aún queda por absorberse.

Como la velocidad de absorción del etanol es diferente en el estómago y en el duodeno, deberán de incluirse en los cálculos, la rapidez del vaciamiento gástrico. En el modelo actual, para la absorción del etanol, se consideran dos constantes de absorción diferentes, una para el estómago y otra para el duodeno, además de una constante de vaciamiento gástrico ( 7 )

Es claro que la concentración de etanol es mayor en la vena porta que en la circulación general, este hecho es de interés práctico puesto que parte del alcohol es oxidado por el hígado antes de alcanzar la circulación general. Esto debe ser tomado en cuenta, porque en apariencia, ocurre una absorción incompleta del etanol al analizar su curva de concentración en sangre periférica la cual aparece disminuida. ( 10 )

### 2.1.3.2. DISTRIBUCIÓN:

La distribución de etanol en el organismo ocurre en proporción al contenido de agua en los tejidos.

El hombre posee un mayor volumen total de agua corporal que la mujer, lo que explica una mayor concentración de etanol en sangre de las mujeres después de ingerir la misma cantidad de etanol que el hombre ( 3 ).

Otro factor a considerar es la edad, ya que el agua corporal disminuye proporcionalmente con la edad.

A medida que ocurre la absorción del etanol y se distribuye en el cuerpo se observa que los niveles de alcohol son más altos en la sangre arterial que en la venosa debido a su paso por los tejidos parte del etanol difunde del compartimiento intravascular al extravascular. Durante la fase de oxidación del etanol la difusión transcápilar se hace en dirección opuesta, de manera que en esta fase las concentraciones venosas de etanol son ligeramente mayores que las arteriales.

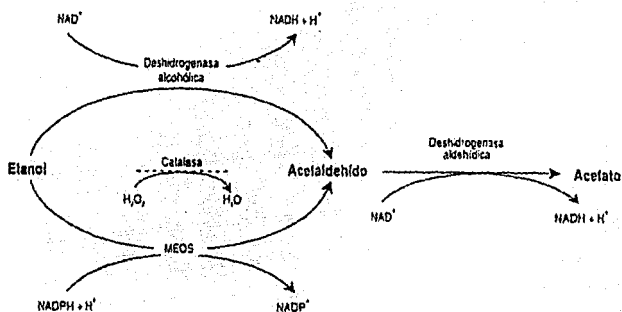
### 2.1.3.3. METABOLISMO

Oxidación del etanol ( 5, 8, 9, 12, 13 y 15 ).

La oxidación inicial del etanol a acetaldehído se realiza principalmente en el hígado por medio de tres sistemas enzimáticos:

- a) el de la deshidrogenasa alcohólica,
- b) el sistema microsomal oxidante del etanol o MEOS, de acuerdo con sus siglas en inglés
- c) el de la catalasa. ( Fig. 1 )

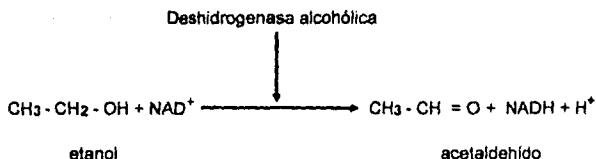
Figura 1 : Rutas hepáticas de la oxidación in vitro del etanol y el acetaldehído.



Fuente : Zentella de Piña y cols. : Metabolismo del alcohol. Rev. Med. Hosp. Gral. de Méx. 1993,58(3):117.

a) La deshidrogenasa alcohólica:

Es la principal enzima responsable del metabolismo inicial del etanol en los seres humanos. El etanol es oxidado a acetaldehído en una reacción acoplada con la transferencia del hidrógeno del sustrato al cofactor que es la coenzima nicotinamida adeninucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), que se convierte en su forma reducida,  $\text{NADH}$ .



La reacción sucede en el citosol del hepatocito. Durante las fases iniciales de absorción del etanol en el tracto gastro intestinal, la reoxidación del NADH en el citosol de la célula hepática es suficiente para la conversión del etanol en acetaldehído, hasta que el almacén de  $\text{NAD}^+$  disminuye progresivamente y se forma cada vez más NADH, por lo tanto se alcanza un nuevo equilibrio en un estado cada vez más reducido, es decir (cada vez hay más NADH y menos  $\text{NAD}^+$ ), a medida que más etanol se convierte en acetaldehído por medio de la deshidrogenasa alcohólica. ( 25 )

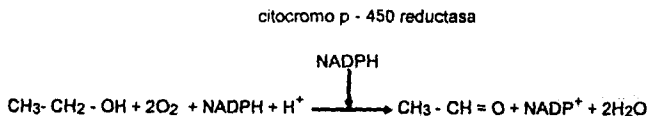
Se sabe que los bebedores consuetudinarios aumentan su tolerancia al etanol ya que aceleran su depuración sanguínea. En el pasado se indicó que la inducción de la deshidrogenasa alcohólica era el factor responsable de la mencionada aceleración. Ahora se sabe que dicha enzima llega a disminuir su capacidad como respuesta al consumo exagerado y crónico de etanol.

Otros dos factores se han responsabilizado del incremento en el metabolismo del etanol:

1.- la hepatomegalia observable en el bebedor crónico, ya que ésta refleja un aumento de la masa tisular activa y

b) El sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS):

Se trata de un sistema presente en los microsomas, que requiere de NADPH ( dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, reducido ) y  $\text{O}_2$ , oxida al etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena larga y forma acetaldehído, NADP (el dinucleótido anterior en forma oxidada ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . ( 14 )



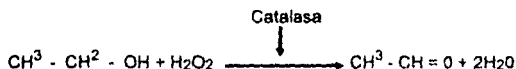


Un componente importante del sistema MEOS es el citocromo p-450, mismo que se ha preparado en forma pura. La existencia de este citocromo explica en parte la mayor susceptibilidad de los alcohólicos a algunos agentes del medio ambiente como solventes industriales y fármacos del tipo de la clorpromazina, la cocaína o la vitamina A.

La mayor actividad del MEOS, conferida por la exposición prolongada al etanol, conlleva un aumento en el metabolismo de diferentes drogas, con un descenso en su vida media, y también, a la manifestación del aumento en la producción de metabolitos tóxicos generados a partir de ciertas drogas ( 14 ).

### c ) Catalasa:

La participación de la catalasa en el metabolismo del etanol in vivo se ha considerado de menor importancia. Tal conclusión se derivó después de haber administrado un potente inhibidor de la catalasa, el 3-amino-1,2,4 triazol, lo cuál no modificó el metabolismo del etanol, mismo que, en esas condiciones, es degradado por los otros dos sistemas enzimáticos. La oxidación del etanol en una reacción tipo peroxidasa.



La mayor parte de la actividad de la catalasa en el hígado está localizada en los peroxisomas que contienen además otras sustancias como el glicolato, aminoácidos y urato-oxidasa, etc.. La limitante para la actividad de la catalasa es la disponibilidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Su importancia sigue aún en controversia. ( 16 )

### 2.1.3.4. PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL ETANOL:

#### ACETALDEHIDO Y CORRELACION DEL MEOS CON LOS SISTEMAS CELULARES PROTECCION CONTRA OXIDANTES:

De todas las moléculas formadas a partir del etanol, el acetaldehído ha acaparado la atención en los años recientes. Es un producto común formado por cualquiera de los tres sistemas enzimáticos que oxidan el etanol. La degradación del acetaldehído se realiza en una reacción catalizada por la deshidrogenasa aldehídica, que tiene como coenzima al NAD :

Deshidrogenasa aldehídica.



Se sabe que existen varias formas moleculares de esta deshidrogenasa y que muestra una variabilidad genética tan grande como la que se ha descrito para la deshidrogenasa alcohólica.

Un dato que orienta sobre las potencialidades del acetaldehído como un tóxico importante se refiere a las manifestaciones registradas en individuos normales al recibir inhibidores de la deshidrogenasa acetaldehídica, como el disulfuran ( Antabuse ) y el Metronidazol, que producen los siguientes síntomas: fuerte enrojecimiento facial, taquicardia, hipotensión, dolor de cabeza, vómito, náuseas, debilidad muscular, somnolencia, etc. La intensidad del cuadro depende de la concentración sérica de acetaldehído y es tan molesto que llega a crear aversión al etanol.

La oxidación del acetaldehído y su eliminación del organismo depende parcialmente de la disponibilidad de NAD, coenzima que al no bastar para la propia oxidación del etanol, abate la oxidación del acetaldehído y se manifiestan sus acciones tóxicas. Algunos de los efectos del acetaldehído son antagónicos a los efectos directos del etanol así libera catecolaminas y contrarresta algunos efectos sedantes del etanol. ( 17 )

Se ha demostrado que el acetaldehído, formado por la oxidación del etanol, produce a nivel de las mitocondrias de hígado de rata, una inhibición del sitio de la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa.

También se ha postulado que el acetaldehído altera la homeostasia del calcio.

#### CORRELACION DEL MEOS CON LOS SISTEMAS CELULARES DE PROTECCION CONTRA OXIDANTES:

Por lo menos existen cuatro mecanismos que juegan un papel en la reducción de los efectos nocivos de estos oxidantes en la célula. En condiciones normales las concentraciones celulares de ellos eliminan el problema de manejo de oxidantes enteramente ( 14 ).

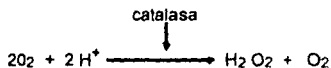
1.- Reacción de la superóxido dismutasa, en los laboratorios de experimentación, donde varios estudiosos se dedican a lograr avances sobre el conocimiento de la toxicidad del alcohol, se han obtenido los siguientes datos:

Algunos sistemas protectores antioxidantes se ven comprometidos cuando se administra una cantidad excesiva de etanol a las ratas, tal es el caso de la superóxido dismutasa ( SOD ) cuya actividad disminuye en un 25% en homogenados de cerebro de rata intoxicada con etanol, incluso puede producirse un mayor descenso si se repite la dosis de etanol. En cultivos de células neuronales o gliales de ratón, cuyas ratas y pollos, disminuye la actividad de la SOD cuando se incuban en soluciones de etanol 100 nm.

No se ha precisado aún, si el descenso en la SOD es suficiente para causar daños biológicos serios. Otro grupo de científicos ha reportado un aumento en la actividad de la SOD en animales tratados con etanol en forma crónica.

Dosis pequeñas y grandes de etanol administradas repetidamente, determinan un aumento de la lipoperoxidación en el hígado de ratas y mandriles, indicada por: la acumulación de dienos conjugados, la producción de etanol mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico ( TBA ).

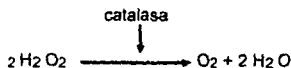
La enzima de oxido reducción de superóxidos cataliza la destrucción del radical del superóxido de acuerdo a la siguiente ecuación:



Esta enzima esta presente en varios tejidos y tiende ha mantenerse normal dentro de la célula, la concentración de aniones de superóxidos tiene valores extremadamente bajos ( 10 - 11 M ).

El peróxido de hidrógeno producido es removido por la acción de la catalasa.

2.- La reacción de la catalasa. El papel protector de la catalasa esta bien reconocido, se debe tanto a su amplia distribución tisular, como a la alta actividad de la enzima, la reacción que cataliza es la siguiente



Existen algunos pacientes con un raro desorden hereditario, la **acatalasemia**, en la cuál la actividad de la catalasa en todos los tejidos, está muy baja, mostrando varios o ningún síntoma. Probablemente, en tales casos, en otras enzimas, particularmente la del glutatión peroxidasa, compensan la baja actividad de la catalasa.

3.- **Reacción de reducción del glutatión por la glutatión peroxidasa.** La enzima glutatión peroxidasa cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno en una reacción en la cuál se oxida el glutatión. ( 18 )



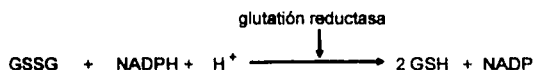
Esta enzima va a tener tres papeles.

a ) Primero la conversión del peróxido de hidrógeno a agua, así se mantiene su concentración muy baja.

b ) Segundo, la conversión de ácidos grasos a hidroxiácidos.

c ) Tercero, la oxidación inversa de grupos sulfidrilos de las proteínas.

El glutatión oxidado es reducido por NADPH en una reacción catalizada por la glutatión reductasa.



Disminuye el glutatión reducido ( GSH ) o aumenta el glutatión oxidado ( GSSG ) en el hígado y el riñón de ratas intoxicadas con etanol, pero no se han reportado cambios en otros tejidos.

Caidas comparables de GSH se observan en los hígados de ratones y mandriles también intoxicados con etanol, lo cuál aparentemente obedece a que el glutatión se emplea para controlar el exceso de peroxidación de los ácidos grasos.

Tal caída de GSH puede a su vez ocasionar más peroxidación de los lípidos o únicamente ser consecuencia de la misma. ( 18 )

En cualquiera de las dos alternativas el mecanismo de daño hepático es la inducción de la lipoperoxidación aumentada que esta presente con mucha frecuencia en el establecimiento de daño tisular aunque el agente causal sea otro diferente del etanol. Aquí es necesario comentar que más que el etanol la agresión puede ser originada por el acetaldehído. Este es metabolizado principalmente por la aldehído deshidrogenasa, enzima que lo convierte en un metabolito celular común, el ácido acético o etanoico.

Otro sistema que se ve perturbado cuando se dan cantidades elevadas de etanol y es el que nos interesa por el momento, es el sistema del glutatión.

El glutatión es un tripéptido atípico en el cuál el glutamato N-terminal está unido a la cisteína a través de un enlace peptídico, no se encuentra en todas las formas de vida. En el hombre y en otros animales el glutatión se requiere para la actividad de varias enzimas. Se cree que el glutatión y la enzima glutatión reductasa participan en la formación de los enlaces bisulfuro correctos de muchas formas proteínicas y polipeptídicas. ( 24 )

### 2.3 5.-- ELIMINACIÓN DEL ETANOL NO DEGRADADO Y DE SUS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN:

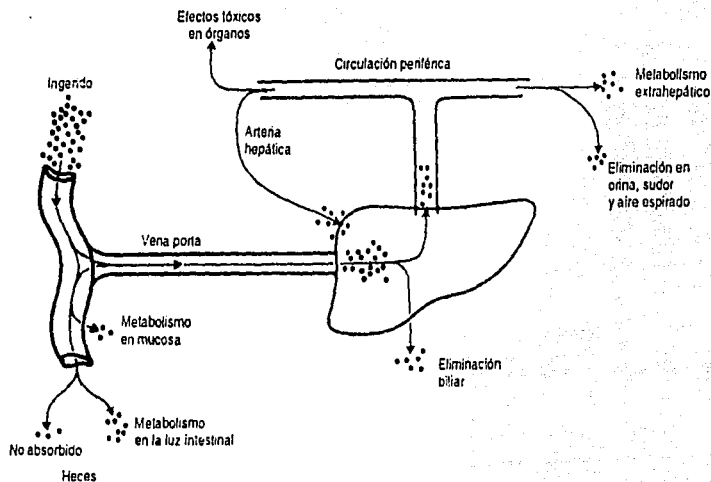
La fase de eliminación del etanol se caracteriza por un descenso progresivo de su concentración sanguínea. El 90 % del alcohol que desaparece de la sangre se oxida en forma compleja hasta  $H_2O$  Y  $CO_2$  , pequeñas cantidades de etanol se excretan como tal por los pulmones, la orina y el sudor ( fig. 2 )

En 1973 Wagner ( 7 ) desarrolló un modelo matemático sobre la farmacocinética del etanol, que permite el análisis experimental de las curvas de alcohol en sangre definidas por las fases de absorción, difusión y eliminación. Con tales datos pueden calcularse parámetros tales como la constante de Michaelis (  $K_m$  ) y la velocidad máxima (  $V_{max}$  ) de las enzimas que intervienen directamente en la oxidación del etanol.

Con toda esta información, ahora se acepta, que la velocidad de eliminación del etanol, es dependiente de la dosis ingerida y del pico máximo de concentración alcanzado en sangre, es decir sigue una cinética clásica tipo Michaelis.

Otros autores han además establecido un ritmo circádico de la oxidación del etanol y su relación con las hormonas ( 10 )

Fig. 2 : Sitios de eliminación y metabolismo del etanol ( Mod. de Von Wartburg Jp y cols) ( 11 )



#### 2.1.4 ALTERACIONES BIOQUIMICAS HEPATICAS PRODUCIDAS POR LA INGESTION CRONICA DE ETANOL ( 16 y 17 ):

Son múltiples las modificaciones moleculares que aparecen en los bebedores crónicos. Su instalación de ordinario es insidiosa y crece paulatinamente. Solo revisaremos las alteraciones más comunes y graves.

Para su estudio, las modificaciones crónicas que ocasiona el etanol pueden agruparse de acuerdo con el principal órgano afectado el hígado, el sistema nervioso central o en general, todo el organismo ( 13 ).

La alteración más grave que aparece en el hígado por la ingestión crónica de etanol es la cirrosis.

Aún no es posible, a nivel molecular, describir los cambios que se originan por la ingestión de etanol que progresivamente conducen en una cirrosis, los siguientes factores se han considerado asociados al proceso degenerativo.

1.- Una predisposición, mal definida, asociada a algún marcador genético no identificado y que tiende a explicar que únicamente el 20% de los bebedores crónicos desarrollan un cuadro de cirrosis. No pueden excluirse los factores psicosociales como parcialmente responsables de la situación descrita. (1)

2.- La tolerancia al etanol que aparece en el bebedor crónico se correlaciona con un aumento en la actividad del MEOS para degradar etanol ( 14 )

Este MEOS consume oxígeno y NADPH y produce  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y acetaldehído. Por lo tanto, en el bebedor crónico existe una mayor demanda de oxígeno al hígado, que se encuentra comprometido, por una fibrosis por ejemplo, se hace más lenta la oxidación del etanol por la vía del MEOS. El problema es más grave mientras mayor sea la hipoxia para proceder a degradar el etanol, que a su vez será mayor a medida que aumente la fibrosis, la cual, de alguna manera progresa al no degradarse oportunamente el etanol.

3.- El mayor consumo de NADPH a través del sistema MEOS disminuye la disponibilidad del NADPH en los sistemas microsomaes que también se utiliza en la degradación de drogas y contaminantes del medio ambiente. ( 14 )

La fibrosis hepática y el cuadro patológico de cirrosis podría progresar más rápidamente por el efecto, sólo o combinado, de alguno de estos tóxicos, que persistirían por más tiempo en el hígado al estar retardada su degradación ( 24 )

4.- La mayor actividad del MEOS aumenta la producción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a partir de la cual se generan en mayor concentración algunos radicales libres, como el superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) ó el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) metabolitos normales, con vidas medias muy cortas y extraordinariamente reactivo. Se sabe que favorecen la peroxidación de los ácidos grasos y al producirse en mayor cantidad se les asocia a procesos oxidativos de las moléculas celulares, que eventualmente desembocan en la cirrosis. ( 14 )

5.- La presencia crónica de concentraciones elevadas de acetaldehído en el hígado también se ha asociado a la cirrosis hepática. Se ha demostrado que a las concentraciones que se encuentra circulante el acetaldehído, después de la ingestión moderada de etanol, forma productos con la molécula de hemoglobina presente en los glóbulos rojos. Se postula que en el hígado se forman productos entre el acetaldehído y diversas proteínas hepáticas dado que:

a) el acetaldehído es una molécula con gran reactividad,

b) la formación de aductos acetaldehído - proteína es una reacción química no catalizada por enzimas y que sucede a bajas concentraciones del acetaldehído y

c) la concentración de acetaldehído en el hígado es mayor que en la sangre circulante. Los productos acetaldehído-proteínas pueden ser el sustrato molecular de la cirrosis. Cuando las uniones covalentes del acetaldehído se establecen con proteínas del citoesqueleto hepatocelular, por Ejem., con los microtubulos suceden las siguientes alteraciones: ( 17 )

a .- Disminución relativa de lo microtubulos.

b .- Disminución de la capacidad secretora de las proteínas de exportación.

c .- Retención de las mismas en células.

d .- Edema de los hepatocitos y crecimiento del Hígado ( hepatomegalia ).

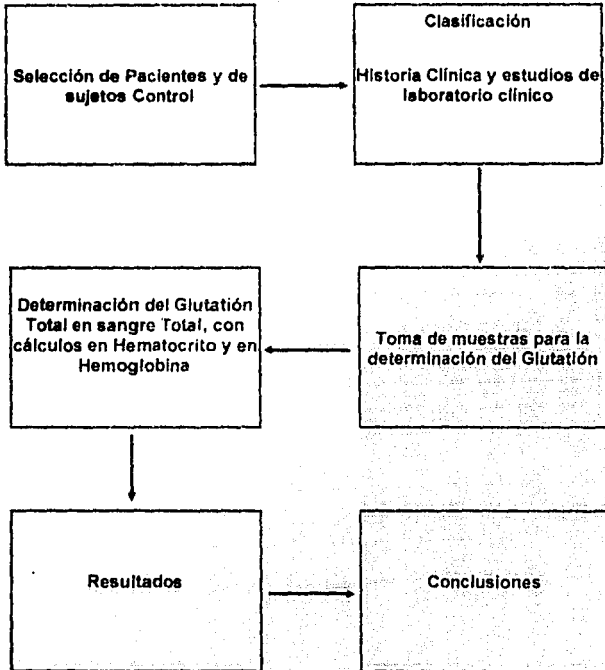


# ***CAPITULO***

***III***

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 DIAGRAMA DE FLUJO:



### 3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

#### 3.2.1 MATERIAL

#### 3.2.2 REACTIVOS

#### 3.2.3 EQUIPO.

### 3.2.1 MATERIAL

#### 3.2.1.1 Material Biológico

El estudio se realizó en dos grupos de sujetos:

1.- Sujetos sanos ( clínicamente y por exámenes de laboratorio ), que sirvieron como grupo control.

2.- Sujetos con ingestión crónica de alcohol, tomados al azar, de acuerdo a su asistencia al Servicio del Centro de Atención a Problemas Relacionados con el Alcoholismo ( CAPRA ) del Hospital General de México S.S.A.

Los cuales fueron clasificados de la siguientes manera, de acuerdo a los criterios establecidos por el servicio de CAPRA del Hospital General de México ( ver clasificación 1 y 2 ):

Grupo " 0 " Control: Sujetos clínicamente sanos, con resultados de sus estudios de laboratorio dentro de los valores de referencia.

Grupo " I " que presentaban alteraciones en grado leve.

Grupo " II " que presentaban alteraciones en grado moderado.

Grupo " III " que presentaban alteraciones en grado severo.

A todos los sujetos ( Controles y Pacientes ) se les efectuaron diversas pruebas de función hepática, para poder clasificarlos tanto clínicamente como por las pruebas de laboratorio.

**CLASIFICACION I**  
**MANIFESTACIONES CLINICAS**

	O	I	II	III
<b>Astenia</b>	Neg	+	++	+++
<b>Adinamia</b>	Neg	+	++	+++
<b>Edema</b>	Neg	+	++	+++
<b>Ascitis</b>	Neg	+	++	+++
<b>Hepatomegalia</b>	Neg	+	++	+++
<b>Esplenomegalia</b>	Neg	+	++	+++
<b>Circulación colateral</b>	Neg	+	++	+++
<b>Teleangiectasias</b>	Neg	+	++	+++
<b>Eritema palmar</b>	Neg	+	++	+++
<b>Tendencia hemorrágica</b>	Neg	+	++	+++
<b>Encefalopatía</b>	Neg	+	++	+++

## CLASIFICACION 2

### MANIFESTACIONES DE LABORATORIO CLINICO

	UNIDADES	0	I	II	III
Proteínas totales	g / dl	5 - 7	< 10-20%	<20-30%	< 30 %
Albumina	g / dl	3 - 5	< 10-20%	<20-30%	< 30 %
Bilirrubina total	mg / dl	< 1.0	>10-20%	>20-30%	> 30 %
T.G.O.(A.S.T.)	U/l	8 - 18	>10-20%	>20-30%	> 30 %
T.G.P.(A.L.T.)	U/l	8 - 18	>10-20%	>20-30%	> 30 %
Fosfatasa alcalina	U/l	17 - 60	>10-20%	>20-30%	> 30 %
γ G.G.T.	U / l	100 - 200	> 10-20%	>20-30%	> 30 %
Tiempo de Protrombina	%	80 - 100	< 80	< 60	< 40
Hematocrito	%	45 - 47	< 43	< 41	< 39
Hemoglobina	g / dl	13 - 15	< 13	< 11	< 9
Leucocitos	cel / ml	8000-10000	> 10-20%	>20-30%	>30 %

### 3.2.1.2 Material de toma de productos y laboratorio.

**Agujas de toma de muestra sanguínea para tubos al vacío de 21X38 mm para muestra múltiple.**

**Tubos al vacío de 10 ml con anticoagulante ( heparina ), para colección de muestras de sangre.**

**Adaptador de aguja para toma de muestras del sistema de tubos al vacío.**

**Recipientes para transportar tubos al vacío con muestras de sangre a baja temperatura.**

**Pipetas automáticas de 5 ml, 1 ml, 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, Marca Pipetman Marca Gilson Medical Electronics ( France ) S.A. mod. p 5000, p 1000, p 200 y p 20.**

**Puntas desechables para pipetas automáticas.**

**Tubos de plástico de 12 x 75 con tapón de hule.**

**Vasos de precipitados de 80 ml** Pyrex

**Vasos de precipitados de 25 ml** Pyrex

**Matraces aforados de 100 ml** Pyrex

**Pipetas volumétricas de 1 ml** Pyrex

**Pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml** Pyrex

**Gradilla metálica para 36 tubos.**

**Algodón**

**Gasa**

**Celdillas de cuarzo con paso de luz de 10 mm con volumen de 3 ml marca Sigma Chemical Co. Lote 30H0739 para Espectrofotómetro Beckman Mod. 34.**

### 3.2.2. REACTIVOS:

Tiras Porta-reactivas para Equipo Reflotrón Cat. 745065 Boehringer Mannheim.

Acido perclórico 2 M, 70-72 % GR Marca Merck.

Bicarbonato de Sodio al 0.5. %

Etilen-Diamino-Tetra-Acético ( EDTA ). Marca Merck.

Cristales de Fosfato de Potasio monobásico 0.1 M J.T. Baker .

Cristales de Fosfato de Potasio Dibásico 0.1M J.T. Baker.

5-5- Dithiobis-2,Nitrobenzol acid ( 3 carboxi, 4, nitrofenildisulfuro ) ( DTNB ).

B-Nicotinamida Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced form B-NADPH, TPNH  
Triphosphopiridine Tetrasodium salt Sigma Chemical Company Lot.792 7130.

Glutathione Reductasa ( G R. Ec 1.6 4.2 ) type IV ph 7 Sigma Chemical Company. 2500  
units / mg proteína.

### 3.2.3. EQUIPO.

Agitador Vortex / Genie Scientific Industries Inc. Bohemia N.Y..

Centrífuga Refrgerante Damon / IEC Division IEC B-20A Centrifuge.

Espectrofotómetro Beckman Mod. 34.

Fotómetro de Reflexión Reflotrón Boehringer Mannheim.

Balanza Analítica Mettler. E. Mettler Zürich.

Balanza granataria Sartorius.

### 3.2.4. PREPARACION DE REACTIVOS.

Solución amortiguadora de fosfatos para 100 ml :

1.- 0.1 M de fosfato de potasio y 0.001 M de EDTA a pH 7.0: preparar diariamente de la solución stock de 0.1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , cada uno contiene 1mM de EDTA.

2.- 5,5- Ditiobos ( ácido 2-nitrobenzoico ) 1,5 mg/ml: Prepararlo diariamente, disolviendo DTNB en una solución de  $\text{NaHCO}_3$ , al 0.5%, almacenar en obscuridad.

3.-  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  P.M. 136.0, 0.1M, pesar 1.36 g y disolver en 1 dl.

4.-  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  P.M. 174.18, 0.1M, pesar 1.74 g y disolver en 1 dl.

5.- EDTA P.M. 292, 1 mM 29.2 mg/dl.

6.- EDTA debe pesarse 29.2 mg por duplicado, para agregarse a cada solución amortiguadora de fosfatos.

7.- NADPH, 4 mg/ml: Disolver la NADPH en una solución de  $\text{NaHCO}_3$  y almacenarla a 4° C.

8.- Glutatión reductasa: 6 unidades / ml. Disolver la enzima comercial diariamente. Diluir la enzima comercial en la solución amortiguadora recién preparada ( diariamente ).

9.- Disulfuro de Glutatión ( GSSG ), 10 micromolar. El standard prepararlo diariamente, a partir de la solución stock ( 1 mM ).

Mezclar 10 ml de cada una de las soluciones amortiguadora.

1.- Solución de DTNB 1.5 mg por cada ml de  $\text{HCO}_3$  al 0.5 %.

2.- Solución de NADPH 2 mg por cada 0.5 ml de  $\text{HCO}_3$  al 0.5 %.

### 3.2.5. TOMA DE MUESTRAS

A todos los sujetos ( controles y pacientes ) se les colectó una muestra de sangre en tubos al vacío heparinizados se mezcló inmediatamente con un volumen igual de ácido perclórico enfriados previamente.



### 3.3. METODO ANALITICO PARA EL GLUTATION.

#### Preparación de la muestra:

- 1.- De la muestra de sangre total heparinizada, recién extraída, se toma 1 ml se añade 1 ml de ácido perclórico ( frío ) ( no debe de haber pasado más de 1 minuto).
- 2.- Mezclar en el Vortex durante 2 minutos.
- 3.- Centrifugar en frío durante 5 minutos a 1500 rpm.. El sobrenadante se utiliza para la determinación del Glutación total.

#### Determinación del Glutación Total en las muestras de los pacientes:

- 1.- Colocar 1 ml de la solución amortiguadora de fosfatos a la celdilla de lectura.
- 2.- Ajustar el espectrofotómetro a " 0 " de absorbancia a 340 nm.
- 3.- Agregar 100  $\mu$ l del sobrenadante, agitar, agregar 50  $\mu$ l de NADPH, agregar 20  $\mu$ l de glutatión reductasa y agitar, agregar 20  $\mu$ l de DTNB, agitar y
- 4.- Volver a leer de inmediato a 412 nm a los 30, 60, 120, 180, 240 y 300 segundos.

#### Preparación del blanco:

- 1.- Colocar 1 ml de la solución amortiguadora de fosfatos a la celdilla de lectura.
- 2.- Ajustar el espectrofotómetro a " 0 " de absorbancia a 340 nm.
- 3.- Agregar 100  $\mu$ l de agua, agitar, agregar 50  $\mu$ l de NADPH, agregar 20  $\mu$ l de glutatión reductasa y agitar, agregar 20  $\mu$ l de DTNB, agitar y
- 4.- Volver a leer de inmediato a 412 nm a los 30, 60, 120, 180, 240 y 300 segundos.

#### Preparación del estandard.

- 1.- Colocar 1  $\mu$ l de la solución amortiguadora de fosfatos a 3 celdillas de lectura, marcando cada uno como 10, 20 y 40  $\mu$ l.

2.- Ajustar el espectrofotómetro a " 0 " de absorbancia a 340 nm.

3.- Agregar 10, 20 y 40 µl de estándar de glutatión oxidado, a cada una de las celdillas respectivamente, agitar, agregar 20 µl de NADPH, agregar 20 µl de glutatión reductasa, agitar, agregar 20 µl de DTNB, agitar y

4.- Volver a leer a 412 nm a los 30, 60, 120, 180, 240 y 300 segundos.

Determinación del Glutatión total:

Principio : La determinación del glutatión reducido y oxidado puede efectuarse usando un ensayo cinético, en la cuál la cantidad catalítica de la cantidad de ambos con la glutatión reductasa provoca una continua reducción del 5,5- dithiobis ( ácido 2-nitrobenzoico ) abreviado DTNB en presencia de NADPH, de acuerdo a la siguiente reacción. ( 18 )

no enzimático



GSSG reductasa



---

GSH / GSSG



GSSG reductasa

La velocidad de la reacción es proporcional a la concentración del glutatión a valores de 2 micromolas. La formación de 5-thio-2-nitrobenzoato ( TNB ) ( 19 ) es seguido espectrofotométricamente a 412 nm ( o a 405 nm en fotómetros de mercurio ). La sensibilidad de la determinación puede aumentarse si se mide el NADPH fuorométricamente ( 20 ).

Procedimiento original de Akerrboon y Siess ( 18 ): Pipetear en una cubeta: 0.1 ml de buffer, la muestra de los sujetos, 100 microlitros que contiene 0.5-2 nmol de glutatión, 50 microlitros de NADPH, 20 microlitros de DTNB, 20 microlitros de glutatión reductasa. Después de mezclarlos dentro de la cubeta de reacción, registrar el incremento de la línea de absorbancia a 412 nm. Se corre paralelamente un blanco, sin glutatión. Para la calibración, se repite el procedimiento usando 100 microlitros de GSSG(10 micromoles ) en lugar de la muestra. La temperatura de la reacción fue de 25° C. ( 18 )

Procedimiento modificado: Igual al anterior, solo que no se neutralizaron las muestras, ya que, los ácidos perclóricos no neutralizados, arrojan resultados semejantes, por lo que se diluyó la alícuota de 10 microlitros, en 2 ml de buffer de fosfatos pH 7.4.

# **CAPITULO**

## **IV**

## RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS.

Se les determinó glutatión total a 64 sujetos ( GSH + GSSG ), que asistieron al Hospital General de México, al servicio de CAPRA ( Centro de Atención a Problemas Relacionados al Alcoholismo ).

De ellos, 16 eran sanos y 48 con diversos grados de daño hepático.

Los pacientes con daño hepático se agruparon en tres grados de acuerdo a la severidad de la lesión, evaluado clínicamente y por parámetros bioquímicos.

Se les determinó a todos los sujetos hemoglobina y hematocrito, de manera que los resultados, se expresaron como micro mol de glutatión total ( GT ) por mililitro de eritrocitos ( hematocrito ), por gramos de hemoglobina y por mililitro de sangre total.

A continuación se detallan los resultados en las tablas I, II y III se encuentran los valores de glutatión total expresados en micromol de glutatión total por ml de sangre, ml de eritrocitos ( hematocrito ) y gramos de hemoglobina, respectivamente, en los diferentes grupos de sujetos control y pacientes.

Para facilitar la información, los resultados de los sujetos se clasificaron en :

" 0 " grupo control

" I " grupo con daño hepático leve

" II " grupo con daño hepático moderado

" III " grupo con daño hepático severo

TABLA I

VALORES INDIVIDUALES DE GLUTATION TOTAL ( G T ) EXPRESADOS EN MICROMOL DE GLUTATION TOTAL POR ml DE SANGRE EN LOS DIFERENTES GRUPOS CONTROL Y DE PACIENTES CON DAÑO HEPATICO

GT CONTROLES	GT " I " DAÑO LEVE	GT " II " DAÑO MODERADO	GT " III " DAÑO SEVERO
1.16	1.12	0.512	0.474
1.045	1.12	0.530	0.324
1.083	1.062	0.858	0.702
0.063	0.832	0.668	0.630
1.063	0.673	0.588	0.647
---	0.736	0.652	0.360
---	0.810	---	0.928
1.16	0.858	0.603	0.432
1.045	---	0.742	0.582
1.085	0.621	---	---
1.063	0.909	0.546	---
---	0.686	---	---
1.25	1.18	---	---
---	---	---	---
1.1	1.062	---	---
1.207	---	---	---
1.22	0.736	---	---
---	---	---	---
0.904	0.858	---	---
1.037	---	---	---
1.294	0.731	---	---
n = 16	n = 16	n = 9	n = 9
$\bar{x}$ = 1.0486	$\bar{x}$ = 0.875	$\bar{x}$ = 0.633	$\bar{x}$ = 0.564
D.E. = 0.280	D.E. = 0.180	D.E. = 0.111	D.E. = 0.190

**TABLA II**

**VALORES INDIVIDUALES DE GLUTATION TOTAL ( G T ) EXPRESADOS EN MICROMOL DE GLUTATION TOTAL POR ml DE ERITROCITOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS CONTROL Y DE PACIENTES CON DAÑO HEPATICO**

<b>GT CONTROLES</b>	<b>GT " I " DAÑO LEVE</b>	<b>GT " II " DAÑO MODERADO</b>	<b>GT " III " DAÑO SEVERO</b>
2.33	2.280	1.65	1.89
2.49	2.420	1.66	1.48
2.00	2.250	---	1.60
---	1.540	1.91	---
2.26	1.270	1.40	1.30
---	1.360	---	3.82
---	1.370	---	---
2.33	1.190	2.00	---
2.49	---	1.45	2.09
2.00	1.090	1.80	---
2.26	2.110	1.13	---
---	1.490	---	---
2.50	2.150	---	---
---	2.080	---	---
2.40	2.370	---	---
2.62	---	---	---
2.65	1.360	---	---
---	1.130	---	---
1.84	1.190	---	---
2.98	1.200	---	---
2.35	1.480	---	---
<b>n = 15 <math>\bar{x}</math> = 2.367 D.E. = 0.286</b>	<b>n = 19 <math>\bar{x}</math> = 1.648 D.E. = 0.482</b>	<b>n = 8 <math>\bar{x}</math> = 1.625 D.E. = 0.288</b>	<b>n = 6 <math>\bar{x}</math> = 1.996 D.E. = 0.931</b>

TABLA III

VALORES INDIVIDUALES DE GLUTATION TOTAL ( G T ) EXPRESADOS EN MICROMOL DE GLUTATION TOTAL POR g DE HEMOGLOBINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS CONTROL Y DE PACIENTES CON DAÑO HEPATICO

GT CONTROLES	GT " I " DAÑO LEVE	GT " II " DAÑO MODERADO	GT " III " DAÑO SEVERO
6.90	6.88	4.30	4.69
6.66	—	5.04	3.74
5.40	6.43	—	—
5.48	4.22	4.67	4.96
6.52	3.50	4.20	7.40
—	—	5.43	1.20
—	—	—	4.50
6.90	4.74	—	1.54
6.66	—	4.36	5.90
5.40	—	6.18	—
6.62	—	3.41	—
—	5.00	—	—
6.99	6.29	—	—
—	5.21	—	—
6.00	6.72	—	—
7.14	—	—	—
7.26	—	—	—
—	3.41	—	—
—	4.74	—	—
6.69	3.80	—	—
7.16	—	—	—
n = 15 $\bar{x}$ = 6.520 D.E. = 0.643	n = 12 $\bar{x}$ = 5.078 D.E. = 1.247	n = 8 $\bar{x}$ = 4.699 D.E. = 0.847	n = 8 $\bar{x}$ = 4.241 D.E. = 2.080



Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente, por medio de la " t " de student, encontrándose que existe significancia estadística en los resultados.

La " p " estadística de los valores de los grupos ( I, II y III ) contra los valores del grupo control ( 0 ) están representados en las figuras 6, 7 y 8.

SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATION TOTAL POR g DE SANGRE( FIG. 6 )

### SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATION TOTAL POR ml DE SANGRE ( FIG. 6 )

	0		
I	t = 3.89 gl = 25 p < 0.001		I
II	t = 5.8 gl = 21 p < 0.001	t = 0.75 gl = 18 p < 0.001	II
III	t = 3.97 gl = 21 p < 0.001	t = 1.13 gl = 18 p < 0.001	t = 0.58 gl = 18 p < 0.001

**SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE LAS  
CONCENTRACIONES DE GLUTATION TOTAL POR ml  
DE ERITROCITOS ( FIG. 7 )**

	0		
I	t = 4.90 gl = 32 p < 0.001	I	
II	t = 5.92 gl = 21 p < 0.001	t = 0.12 gl = 25 p < 0.001	II
III	t = 4.58 gl = 19 p < 0.001	t = 0.29 gl = 23 p < 0.001	t = 0.52 gl = 12 p < 0.001

**SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE LAS  
CONCENTRACIONES DE GLUTATION TOTAL POR g  
DE HEMOGLOBINA( FIG.8 )**

	0		
I	t = 4.17 gl = 30 p < 0.001	I	
II	t = 9.77 gl = 23 p < 0.001	t = 3.80 gl = 23 p < 0.005	II
III	t = 8.80 gl = 23 p < 0.001	t = 3.76 gl = 23 p < 0.005	t = 0.94 gl = 16 p < 0.40

## DISCUSION

### 4.2.- DISCUSION.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de los pacientes con daño hepático vs. sujetos sanos se observó que el glutatión total disminuye con el daño hepático de acuerdo a la lesión.

El análisis estadístico de los datos contenidos en las tablas I, II y III, se graficaron en las figuras 6, 7 y 8. La " t " de Student, los " gl " grados de libertad y la " p " de significancia estadística. En la figura 3 se graficaron las micro mol de glutatión total (GT) por mililitro de sangre, contra los grupos de los sujetos estudiados. Los grupos (I, II y III) muestran una clara disminución de los niveles de glutatión total expresados por mililitro de sangre. La disminución es directamente proporcional a la severidad del daño hepático.

En la figura 4, se graficaron las micro mol de glutatión total ( GT ) por ml. de eritrocitos, contra los grupos de sujetos estudiados. En esta figura puede observarse que los valores del grupo " I y II " son menores que los del grupo control " 0 ", sin embargo el grupo " III " muestra concentraciones de glutatión total ligeramente superiores a las del grupo control " 0 ". Cabe aclarar que en estos pacientes los valores de hematocrito se encontraron en su mayoría muy por abajo de lo normal.

En la figura 5, se presentan las micro mol de glutatión total ( GT ) por gramo de hemoglobina, contra los grupos de sujetos estudiados. Puede observarse que los grupos de pacientes ( I, II, III ), muestran valores de glutatión total menores que el grupo control ( 0 ).

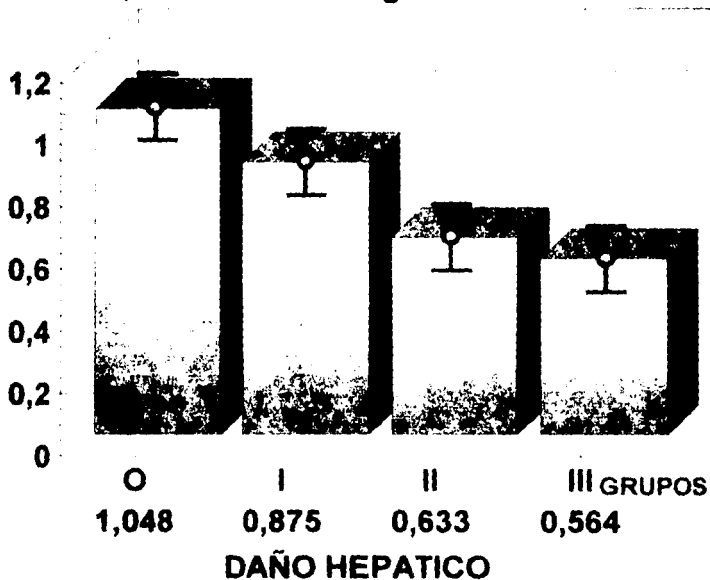
En las figuras 3, 4 y 5 se encuentran graficados los valores promedio de cada grupo ( control , I, II, y III ), de acuerdo a los valores individuales de Glutatión Total ( GT ) expresados en micromols de Glutatión total por ml de sangre, de eritrocitos ( hematocrito ) y de hemoglobina.

# GLUTATION TOTAL

por mililitro de Sangre

Figura 3

$\mu$  mol / ml de Sangre

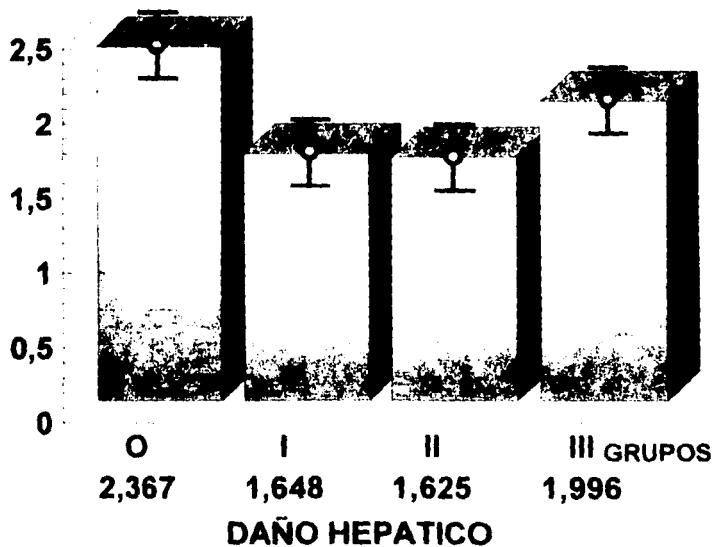


# GLUTATION TOTAL

por mililitro de Eritrocitos

Figura 4

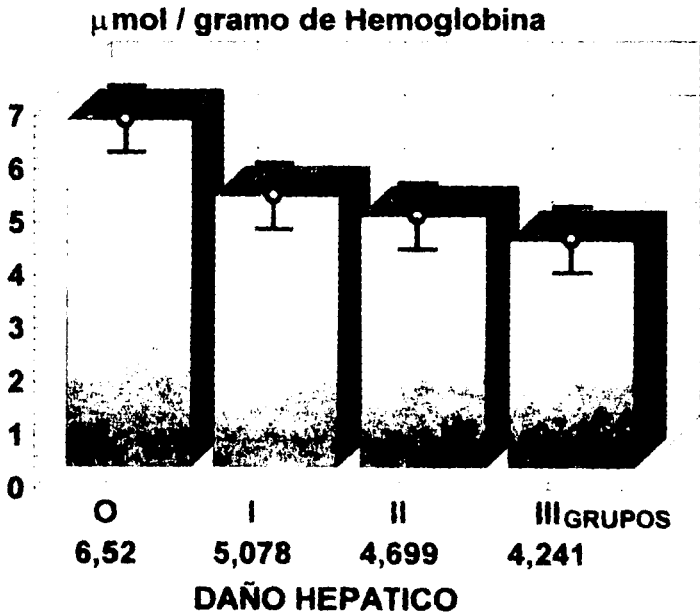
$\mu$  mol / ml de Eritrocitos



# GLUTATION TOTAL

por gramo de Hemoglobina

Figura 5



# **CAPITULO**

# **V**



## CONCLUSIONES

- 1.- Dadas las condiciones de los pacientes en relación al tipo de bebida, tiempo de ingestión, cantidad, etc. es muy difícil medir con exactitud un daño hepático I - II y II- III.
- 2.- El Glutatión total disminuye con el daño hepático
- 3.- La determinación de los niveles del Glutatión total por ml de sangre, ofrece la ventaja de dar una idea cercana sobre el estado funcional hepático de pacientes con cirrosis alcohólica, sin presentar las complicaciones técnicas que representa la determinación del Glutatión oxidado / reducido.
- 4.- En necesario conocer otros parametros de los pacientes en relación al tipo de bebida, tiempo de ingestión, cantidad, sexo, edad, etc., para poder correlacionar mejor la determinación del Glutatión total.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Shiff L and Schiff ER: Diseases of the liver. Philadelphia: JBLippincott 1987.
- 2.- Kalant H: Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol. Effects on biological membranes, in Kissin B Begleiter H. (eds) The Biology of Alcoholism. Vol. 1 New York: Plenum Press, 1971,1-162.3.- Jones BM, Jones MK: Effects of moderate dose of alcohol on female social drinkers at different times in the menstrual cycle. *Chronobiologia* 1975, Supp 1:34 (abstr).
- 3.- Jones BM, Jones MK: Effects of moderate dose of alcohol on female social drinkers at different times in the in the menstrual cycle. *Chronobiologia* 1975, Supp 1:34 (abstr).
- 4.- Masey E, Oesterling JE, Potter JJ: influence of male hormones on rates of ethanol elimination in man. *Hepatology* 1988;8:742-744.
- 5.- Edwards JA, Price Evans DA: Ethanol metabolism in subjects possessing typical liver alcohol dehydrogenase *Clin Pharmacol Therapeut* 1976;8:824-829.
- 6.- Fenna D, Mix L, Shaefer O, Gilbert JAL: Ethanol metabolism in various racial groups. *Can Med Assoc J* 1971;105:472-75.
- 7.- Wagner JY: Properties of the Michaelis-Menten equation and its integrated form which are useful in pharmacokinetics. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1973;1:103-110.
- 8.- Kricka LL, Clark PMS: Biochemistry of alcohol and alcoholism. Chichester. Great Britain. Ellis Horwood Ltd, 1979.
- 9.- Minor DS, Waterhouse JM: Ethanol pharmacokinetics in healthy man : Michaelis Menten parameters and the canadian rythm. *Chronobiologia* 1985;12:137-145
- 10.- Risto JK, Julkunen C, Di Padova C, Lieber SC: First pass metabolism of ethanol - a gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol. *Lic. Sci* 1985;37:567-573.
- 11.- Von Wartburg JP, Buhler R: Biology of disease alcoholism and aldehydism. *New Biomedical Concepts. Lab invest* 1984;50:5-15.
- 12.- Jomvall H, Hempel J, Vallee BI: Structures of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Enzyme* 1987;37:1-17.

- 13.- Lieber CS Metabolism of ethanol in CS, Lieber (ed) Metabolic Aspects of Alcoholism, Baltimore: University Park Press, 1977;1-29
- 14.- Teshke R, Moreno F, Petredes AS: Hepatic Microsomal ethanol oxidizing system (MEOS); Respective roles of ethanol and carbohydrates for the enhanced activity after chronic ethanol consumption. *Biochem Pharmacol* 1981;30:1745-1751.
- 15.- Lieber CS: Metabolism and metabolic effects of alcohol *Medical Clinics North America* 1984;68:3-31.
- 16.- Lieber CS: Effect of chronic alcohol consumption on the metabolism of ethanol. Goedde HW, Anwar DP (eds). *Genetic and Alcoholism*. New York: Alan R Liss Inc, 1987:161-172.
- 17.- Salaspuro M, Lindros K: Metabolism and toxicity of acetaldehyde, in Seitz MK, Kommerell B (eds) *Alcohol Related Diseases in Gastroenterology*, Berlin: Heidelberg Springer Verlag 1985:706-123.
- 18.- Akerboom T. and Sies H.: Assay of Glutathione, Glutathione disulfide and Glutathione mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology*. Vol.77 1981. pag. 373 - 381.
- 19.- Ellman. *Arch. Biochem Biophys* 82 70 (1959).
- 20.- Brehe J.E. and Burch. *Anal. Biochem* 74. 189 (1976)
- 21.- Martin-Abreu L. Clínica para el Estudio de las Enfermedades del Hígado. Hospital General de México S.S.. 1988
- 22.- Lynch M.J. *Métodos de Laboratorio* Vol.1, 2. Ed. Interamericana. 1988.
- 23.- Zentella M. Importancia del Pleomorfismo en el Metabolismo del Etanol. *Rev.Med. del Hosp. Gral. de México S.S.*. Vol. 56. N°3/Jul-Sept., pags.113-124.1993
- 24.- Harrison's. *Principles of Internal Medicine*, Eighth Edition. Ed. McGrawHill Book Co. 1977.
- 25.- Ikuta T, Szeto S, Yoshida A; Three human alcohol dehydrogenase subunits: cDNA molecular and evolutionary divergence *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986;83:634-638.