



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS "IZTACALA"

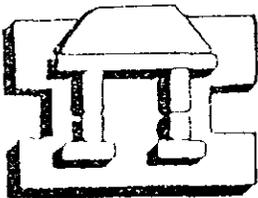
"MODIFICACION DE LOS NIVELES DE GLUTATION
REDUCIDO (GSH) Y OXIDADO (GSSG) EN HIGADO
DE RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES
FUENTES DE LIPIDOS EN UNA DIETA
SEMIPURIFICADA".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R I S E N T A :
AARON AVILA ZAMARRIPA

ASESOR. BIOL. HECTOR VAZQUEZ MEZA

283728



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Agradecimientos

A mis padres, Nohemi Zamarripa C. y Luis Avila I. por todo el amor, el cariño, la paciencia, pero sobre todo, por la confianza que siempre me han brindado y por estar siempre a mi lado. Porque todo lo que soy, es gracias a Ustedes, los amo.

A mis hermanos Luis Ariel, Saul, Edgar y Noemi, por su gran apoyo, amor y cariño, además de los grandes momentos que hemos pasado juntos.

A mis sobrinos Erick, Tania Paola, Joana y Rodrigo, porque cada sonrisa suya es un gran aliciente superarme día a día.

A Lupita, porque gracias a ti, a tu amor, tu fe, tu cariño y a tu apoyo sigo adelante, juntos, hacia un gran futuro.

A la Dra. Martha Zentella, por todo su gran apoyo y confianza, observaciones y consejos para la elaboración de esta tesis, pero sobre todo, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, en su laboratorio, y así permitirme seguir adelante.

Al Dr. Enrique Piña, por el gran apoyo académico que me ha brindado.

A mi compañero y amigo, Biólogo Héctor Vázquez Meza, encargado de la dirección de mi tesis.

A mis compañeros del laboratorio 5: MVZ Enrique Moreno Hernández, por su cooperación en el manejo de los animales; a la M. en C. Ivonne Caballero, por el material de apoyo brindado; a la Dra. Yolanda Saldaña, Biol. Adrian Sandoval, y a la P. de B Nora Monserrat Alarcon; por su amistad y apoyo.

A los Doctores: Armando Mansilla, Alonso Peña, Dolores González y Gabriela Morali, Mariví y Cristina por haberme apoyado en el inicio de mi desarrollo profesional.

A mis amigos y compañeros de toda la vida, Araceli, Rocio, Adriana, Yolanda Eduardo, Francisco, Tomas, Fernando, Noe, Rodolfo y Max.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de la beca otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI), por conducto del Dr. Enrique Piña Garza, expediente número 4594.

DEPENDE DE TI...

Eres tú quien debe decidir
si actúas o no;
si sigues adelante o vuelves atrás;
si caminas valerosamente
hacia metas lejanas
o te contentas
con permanecer donde estás.
Depende de ti...

Gracias, a todos los que me han apoyado, a lo largo de todo este camino.

INDICE

Indice:	I
Lista de cuadros y tablas:	II
Lista de figuras:	III
Resumen:	IV
1. Introducción	1
1.1 Lípidos	
1.2 Radicales libres y peroxidación de lípidos	
1.3 Protección celular contra agentes oxidantes	
1.4 Peroxidación de lípidos y glutatión	
1.5 Alcoholismo: antecedentes	
1.6 Mecanismos protectores antioxidantes del etanol	
1.7 Acetaldehído, acetaldehído deshidrogenasa y acetato.	
1.8 Nutrición, lípidos y alcoholismo	
2. Planteamiento del problema	19
3. Hipótesis	19
4. Objetivo	19
4.1 Objetivo particular	
4.2 Objetivos específicos	
5. Metodología	20
5.1 Material químico	
5.2 Material biológico	
5.3 Diseño experimental	
5.4 Obtención y procesamiento del hígado	
5.5 Derivación de la muestra	
5.6 Medición de GSH y GSSG	
6. Resultados	23
6.1 Identificación de los tiempos de retención para GSH y GSSG por HPLC	
6.2 Determinación de GSH en hígado de rata	
6.3 Determinación de GSSG en hígado de rata	
6.4 Relación GSH/GSSG en hígado de rata	
7. Discusión	30
8. Conclusiones	33
9. Perspectivas	33
10. Comentario final	33
11. Bibliografía	35
Anexo I: HPLC	V
Anexo II: Cuadro de los componentes de las dietas utilizadas.	VII

Lista de cuadros y tablas

Cuadro 1: Ácidos grasos saturados pares

Cuadro 2: Puntos de insaturación de algunos ácidos grasos

Cuadro 3: Distribución porcentual de ácidos grasos en algunas grasas neutras

Cuadro 4: Consumo anual *per capita* de etanol total (calculado como etanol absoluto), vino, cervezas y bebidas destiladas en algunos países con mayor consumo

Figura 1: Peroxidación lipídica

Figura 2: Síntesis y transporte de glutatión

Figura 3: Formación del ácido mercaptúrico

Figura 4: Ciclo del glutatión

Figura 5: Vía de acción de la ADH

Figura 6: Vía de acción del MEOS

Figura 7: Identificación de tiempos de retención para GSH; GSSG y γ -glu-glu en el HPLC

Gráfica 1: Curva estandar de calibración de GSH

Gráfica 2: Curva estandar de calibración de GSSG

Gráfica 3: Comportamiento de GSH en hígado de rata

Gráfica 4: Comportamiento de GSSG en hígado de rata

Gráfica 5: Relación GSH/GSSG en hígado de ratas sin intoxicación e intoxicadas con etanol

Resumen

El glutatión es el tiol libre más abundante en la mayoría de las células y participa en procesos de protección antioxidante durante el estrés oxidativo para mantener el balance redox de la célula (Akerboom y Sies, 1981; Asensi y Sartre, 1994). El órgano que más sintetiza y libera glutatión es el hígado (Akerboom y Sies, 1989). Se ha demostrado que el alcohol es uno de los principales xenobióticos que produce estrés en el hígado (Comporti, 1985). Además varios estudios han demostrado que el tipo de grasa ingerida en la dieta, aunado al consumo de alcohol, puede potenciar el incremento en los niveles de radicales libres induciendo modificaciones en los niveles de defensas antioxidantes y por ende, enfermedades hepáticas (Gonzales y Gray, 1992). En este trabajo se analizaron los cambios en las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), por el método de Asensi y colaboradores (1994) en hígado de ratas macho, cepa Wistar, con destete tardío, alimentadas durante 30 días con diferentes fuentes de lípidos en la dieta e intoxicadas con alcohol en forma aguda. Los resultados indican que hay una disminución en los niveles de glutatión debido al estrés oxidativo inducido por la intoxicación aguda con alcohol y que estos cambios son potenciados por el tipo de grasa que se ingiere en la dieta; además la relación GSH/GSSG disminuye en forma notable en las ratas que consumen aceite de maíz y manteca de cerdo, mientras que con aceite de cártamo y sebo de res los cambios son mínimos con respecto a las no intoxicadas. Basándose en los resultados obtenidos se concluye que algunos tipos de lípidos o el etanol, pueden potenciar el daño hepático.

1. Introducción

1.1 Lípidos

Los lípidos son muy importantes en la alimentación, aunque su consumo es muy variable, pues mientras los campesinos asiáticos y de muchos países latinoamericanos suele ser de unos 30 gramos al día, los esquimales o los pastores masai de África ingieren más de 150 gramos diarios. Bajo una dieta "occidental" balanceada, un adulto normal ingiere unos 80 gramos de lípidos al día, lo que representa aproximadamente el 30% de las calorías de una dieta equilibrada.

Los lípidos se dividen en 4 grandes grupos: lípidos simples, lípidos compuestos, glicolípidos y lípidos derivados. Los lípidos simples son los que contienen ácidos grasos y algún tipo de alcohol con el cual se esterifican. Los lípidos compuestos tienen, aparte del alcohol y los ácidos grasos, otras sustancias, como ácido fosfórico y alcoholes, muchas veces aminados. Los glicolípidos forman compuestos con azúcares y, finalmente, los lípidos derivados incluyen aquellas sustancias que se obtienen por hidrólisis de los lípidos simples o de los compuestos.

La mayor parte de los ácidos grasos forman parte de los lípidos simples; son ácidos monocarboxílicos, cuyo radical alquílico representa una estructura de hidrocarburo que generalmente es lineal. En los animales abundan los ácidos grasos con número par de carbonos, ya que los que tienen número impar, como el fórmico y otros solo existen excepcionalmente y de manera fugaz en ciertos pasos del metabolismo intermedio. Los ácidos grasos saturados corresponden a la fórmula general $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$. Los más importantes se encuentran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Ácidos grasos saturados pares.

Fórmula estructural	Numero de C	Nombre común
CH_3COOH	2	Acido acético
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	4	Acido butírico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	6	Acido caproico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	8	Acido caprílico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	10	Acido cáprico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12	Acido láurico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14	Acido mirístico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16	Acido palmítico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18	Acido esteárico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20	Acido araquídico

Tomado de Laguna-Piña (1988).

La serie mostrada en el cuadro anterior es la de los ácidos grasos saturados. Esta se caracteriza por tener una cadena de carbonos unidos entre sí por una sola valencia, lo cual deja libre a las otras 2 valencias restantes para los hidrógenos correspondientes.

Cuando entre 2 ácidos grasos adyacentes existe una doble ligadura, la pérdida de los 2 hidrógenos crea una situación de insaturación: se trata en este

caso de los ácidos grasos no saturados. Como puede verse en el cuadro 2, los sitios de insaturación muestran cierta constancia.

Cuadro 2. Puntos de insaturación de algunos ácidos grasos (señalados como Δ).

Formúla	Número de C	Nombre
CH ₃ CH ₂ ...Δ9:10...CH ₂ COOH	16	Palmitoleico (16:1)
CH ₃ CH ₂ ...Δ9:10...CH ₂ COOH	18	Oleico (18:1)
CH ₃ CH ₂ ...Δ9:10,12:13...CH ₂ COOH	18	Linoleico (18:2)
CH ₃ CH ₂ ...Δ9:10,12:13,15:16...CH ₂ COOH	18	Linolénico (18:3)
CH ₃ CH ₂ ...Δ5:6,8:9,11:12,14:15...CH ₂ COOH	20	Araquidónico (20:4)

Tomado de Laguna-Piña (1988).

El ácido linoleico, con 2 dobles ligaduras y el linolénico, de 3 dobles ligaduras, por no ser sintetizados por el organismo de animales superiores, se llaman genéricamente "esenciales". Estos 2 ácidos, más el araquidónico de 4 dobles ligaduras, sintetizado a partir de linoleico, se denominan a menudo poliinsaturados. La introducción de la doble ligadura a lo largo de las moléculas del ácido graso crea un lugar rígido de manera que los 2 lados de la molécula a partir de la doble ligadura adquieren una posición fija en el espacio.

La abundancia de los distintos ácidos grasos en algunas grasas naturales se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3: Distribución porcentual de ácidos grasos en algunas grasas neutras.

Especie	Ac. de maíz	Manteca de cerdo	Hígado
Saturados totales	62	43	41
Ac. de 4 a 10C	11	-	-
Mirístico	10	1	3
Palmítico	39	30	32
Esteárico	2	12	6
No saturados totales	38	57	59
Palmitoleico	-	-	9
Oleico	33	46	38
Linoleico	-	10	8
Araquídico	-	-	-
Araquidónico	3	1	-
Otros	2	-	4

Tomado de Laguna-Piña (1988).

Se ha observado que los ácidos grasos más abundantes en la naturaleza son los de 16 y 18 átomos de carbono y que de entre ellos predominan el palmítico y el esteárico entre los saturados, y el oleico, el linoleico y en menor proporción, el araquidónico, entre los insaturados.

Los puntos de insaturación de las moléculas de ácidos grasos son sitios más reactivos que las regiones de los lípidos con estructuras saturadas. Muchas de las propiedades (y los daños) de los ácidos grasos poliinsaturados dependen de las propiedades de los dobles enlaces, como las reacciones oxidación e hidrogenación. En todos los casos el elemento participante se incorpora al ácido graso en el sitio de la insaturación (Laguna y Piña, 1988).

1.2 Radicales libres y peroxidación de lípidos.

Un radical libre es cualquier especie química ya sea átomo o molécula, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados (Pryor, 1986). Pueden producirse cuando sucede la ruptura homolítica de una molécula, en la cual, cada elemento de la misma comprometido en la unión covalente migra con su propio electrón.

Los radicales libres pueden obtenerse por la ganancia de un electrón, por un no radical, como por ejemplo cuando una molécula de oxígeno gana un electrón y forma un radical libre superóxido:

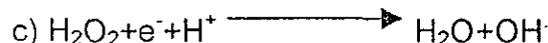


También la pérdida de un electrón de un no radical puede formar radicales libres (RL), por ejemplo, la oxidación del ácido ascórbico (AH_2) a su forma dehidrica (A), pasa por un intermediario que es el radical libre (AH^\cdot):



La molécula de O_2 es altamente reactiva debido a sus características atómicas; interviene en varios procesos patológicos que son resultado de la formación de RL, los cuales pueden actuar como agentes oxidantes y reductores (Di Guiseppi y Fridovich, 1984). Cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical, pueden formarse otros (RL) ya que induce una reacción en cadena que amplifica el fenómeno miles de veces.

La toxicidad del O_2 posiblemente es el resultado de la producción exagerada de especies muy reactivas a partir de él, como los RL superóxido (O_2^-), u otros que se pueden formar en vías comunes a su metabolismo, como el peróxido de hidrógeno, que aunque no es un radical libre, es el principal promotor de otros RL como el radical hidroxilo (OH^\cdot). Durante la fosforilación oxidativa, el radical hidroxilo se obtiene por la reacción de peróxido de hidrógeno con un electrón y un protón;



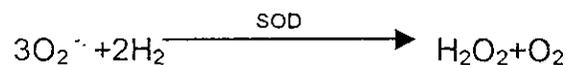
El radical hidroxilo reacciona a una velocidad muy alta con casi todas las moléculas: azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y ácidos orgánicos, permitiendo con ello que se formen radicales libres de aquellas moléculas con las que reaccionó (Turrens, y cols., 1982). Tal es el caso de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (peroxidación lipídica) en la que, aunque el radical libre produce solo efectos locales, el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa producen RL que pueden tener efectos a

distancia del sitio donde se formó el primer radical libre. En general cuando 2 RL reaccionan entre sí, se forma una molécula estable y en el caso particular de la peroxidación de lípidos es la manera como se da por terminada la reacción en cadena (Zentella de Piña y cols, 1994).

1.3 Protección celular contra agentes oxidantes

Puede considerarse que existen 2 tipos de protección celular contra los radicales libres. El primero, comprende a la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa; el segundo abarca a los mecanismos no enzimáticos, que son las vitaminas y el glutatión.

La enzima superóxido dismutasa, cataliza la destrucción del radical superóxido conforme a la siguiente reacción:

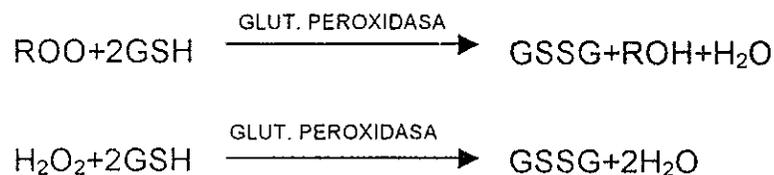


Un papel protector ha sido proporcionado de antemano a la alta actividad de la enzima catalasa, la cual cataliza la reacción:



Los antioxidantes, como la vitamina E, pueden actuar con los radicales libres, sin producir radicales posteriores

Finalmente, la glutatión peroxidasa puede catalizar la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxidos de hidrógeno en una reacción que involucra al glutatión:



Esta enzima puede cumplir 3 roles:

- Convertir el peróxido de hidrógeno a agua para que su concentración se mantenga baja.
- Convertir ácidos grasos preoxidados a hidroxi ácidos grasos.
- Revertir la oxidación de los grupos sulfihídricos de las proteínas.

(Newsholme y Leech. 1983).

1.4 Peroxidación de lípidos y glutatión

Aún cuando los lípidos constituyen un importante material de reserva energética y actúan como amortiguadores físicos y aisladores de la temperatura corporal, su función más distintiva es la de participar, asociados a proteínas y carbohidratos, en la composición de las membranas celulares y subcelulares (Laguna y Piña., 1988) La misma abundancia de lípidos insaturados determina que las membranas sean el sitio preferente del daño conocido como lipoperoxidación o peroxidación de lípidos.

Durante la peroxidación de lípidos (figura 1), el radical libre iniciador (que podría ser el hidroxilo), remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos poliinsaturados (A). Esto conduce a que un electrón quede desapareado en el carbono de donde salió el hidrógeno, creando con ello un radical de ácido graso (B). Este último realiza un rearrreglo molecular interno, y forma un dieno conjugado (C), que a su vez reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical lipoperóxido (D) capaz de sustraer un hidrógeno del ácido graso vecino para formar el hidroperóxido (E) y continuar la reacción en cadena hasta que eventualmente reaccionen 2 RL y con ello se llegue a la terminación del proceso. Una alternativa es que a partir de los lipoperóxidos se formen los peróxidos cíclicos (F), los que pueden, por un lado, conducir a la formación de endoperóxidos cíclicos por acción de una prostaglandina endoperoxidasa sintetasa (ciclooxigenasa) (G) y con esta se abre la posibilidad ya sea de dar lugar a prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos o bien de continuar hacia la vía de la degradación para dar lugar a la formación de malondialdehído (MDA) (H) entre otros productos terminales, como son varios aldehídos, algunos hidrocarburos como el etano y el pentano y otros residuos orgánicos.

Estas sustancias pueden difundirse a cierta distancia del sitio de producción y originar edema celular y cambiar la permeabilidad vascular, producir inflamación y quimiotaxis (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Para evitar el daño causado por los radicales libres la célula cuenta con varios sistemas de defensa; de ellos, uno de los más importantes es el glutatión (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina). Aunque este tripéptido se conoce desde hace varias décadas, es, en años recientes que ha sido expuesto a estudios más intensivos, trayendo a luz nueva información sobre su actividad metabólica (Akerboon y Sies, 1989).

El glutatión participa en diversos procesos biológicos, tales como la protección de las células al ataque de radicales libres e intermediarios reactivos del oxígeno (por ejemplo peróxidos) (figura 2), manteniendo el balance celular de óxido-reducción (redox), la destoxicación de xenobióticos, que incluyen un amplio rango de químicos, un gran número de drogas, y los metabolitos de ciertos compuestos endógenos, tales como estrógenos, prostaglandinas y leucotrienos; (Erick, 1985); la síntesis de precursores del DNA y la regulación o activación genética; protección contra efectos de radiación por ionización, conservación del equilibrio de sulfhidrilos por la reducción de disulfuros de proteínas, así como la modulación de la actividad enzimática y otras moléculas. También está involucrado en la vía para la reducción de ribonucleósidos difosfatos a sus

correspondientes componentes 2-desoxirribose (Akerboon y Sies, 1981). Finalmente, es también coenzima para varias enzimas (Meister, 1983).

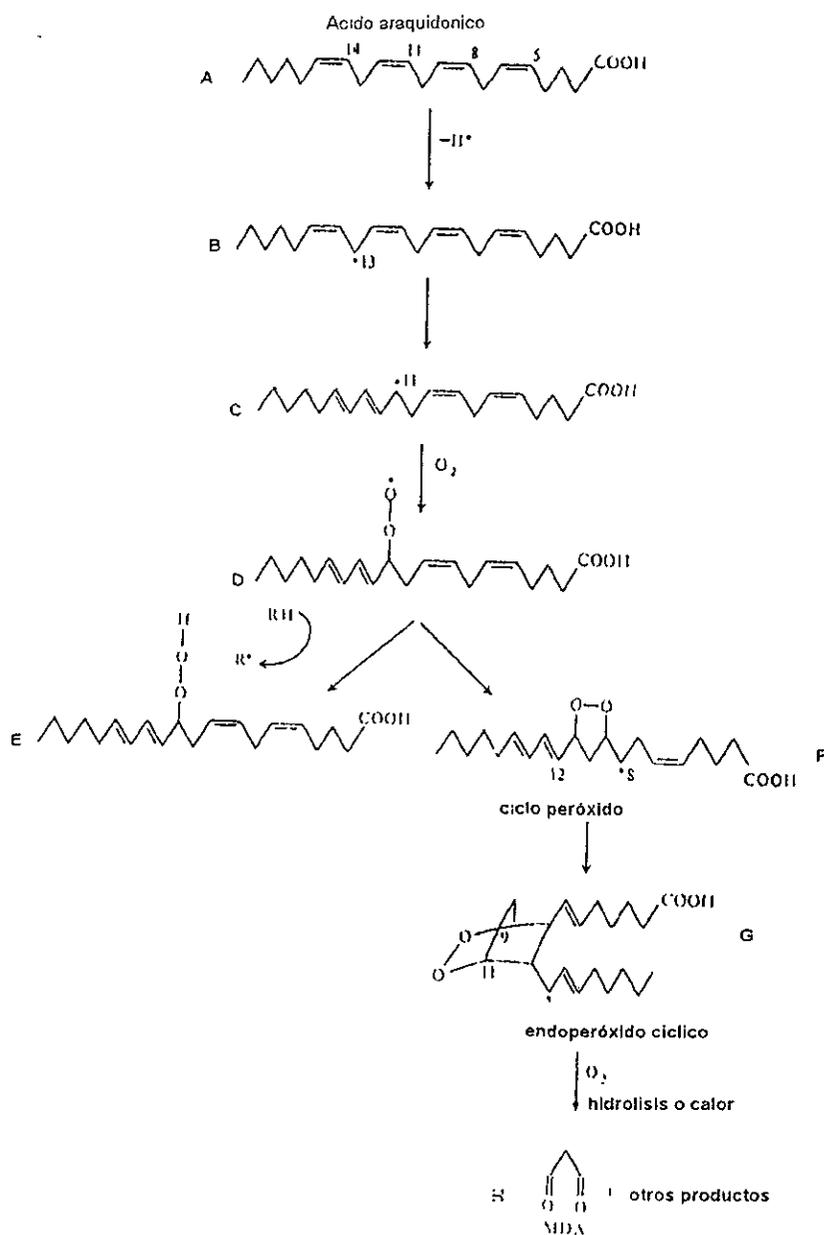


Figura 1 Esquema de la peroxidación lipídica (Tomado de Halliwell y Gutteridge, 1989)

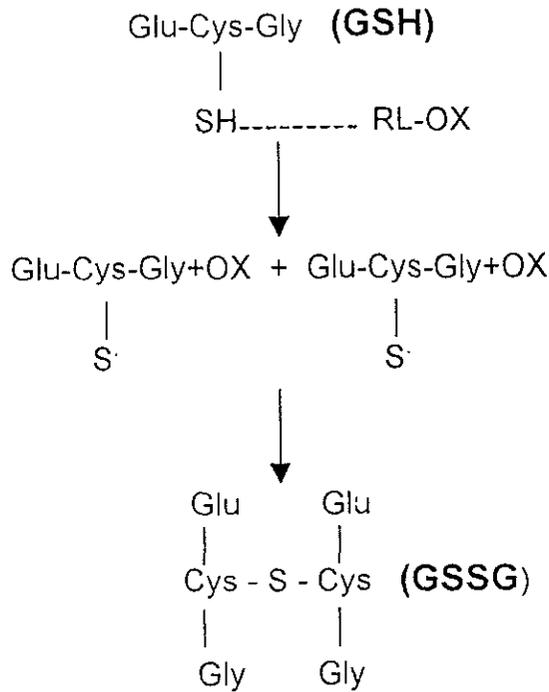


Figura 2: Modo de acción del glutatión.

La síntesis de glutatión se asocia a sistemas de transporte para aminoácidos γ -glutamil (aa γ -glu), en reacciones que involucran a la membrana celular y su medio ambiente inmediato, así como el transporte interorgánico de aminoácidos sulfurados (Akerboon y Sies, 1989).

Los avances en la comprensión del metabolismo del glutatión se han logrado por estudios en: reacciones del ciclo de γ -glutamil que involucran el transporte de éste fuera de la célula y de los aa γ -glu en la célula (figura 3) (Meister, 1981); las reacciones involucradas en la conversión reversible del glutatión reducido (GSH) al estado oxidado (GSSG) (Figura 4) (Kosower, 1978) y, la formación y transformación metabólica de conjugados GSH-X (Arias y Jacobi, 1976)

La síntesis del glutatión se realiza en 2 pasos a partir de sus 3 aminoácidos precursores: el glutamato, la cisteína y la glicina. En cada etapa se forma una unión peptídica a expensas de energía proporcionada por la hidrólisis del ATP.

El transporte de GSH al plasma sanguíneo cumple funciones en la translocación ínterorgánica de sulfuro-cisteína. Dado que este no es un mecanismo intracelular para la reducción de GSSG, el GSH debe ser continuamente sintetizado en la célula (Meister, 1983).

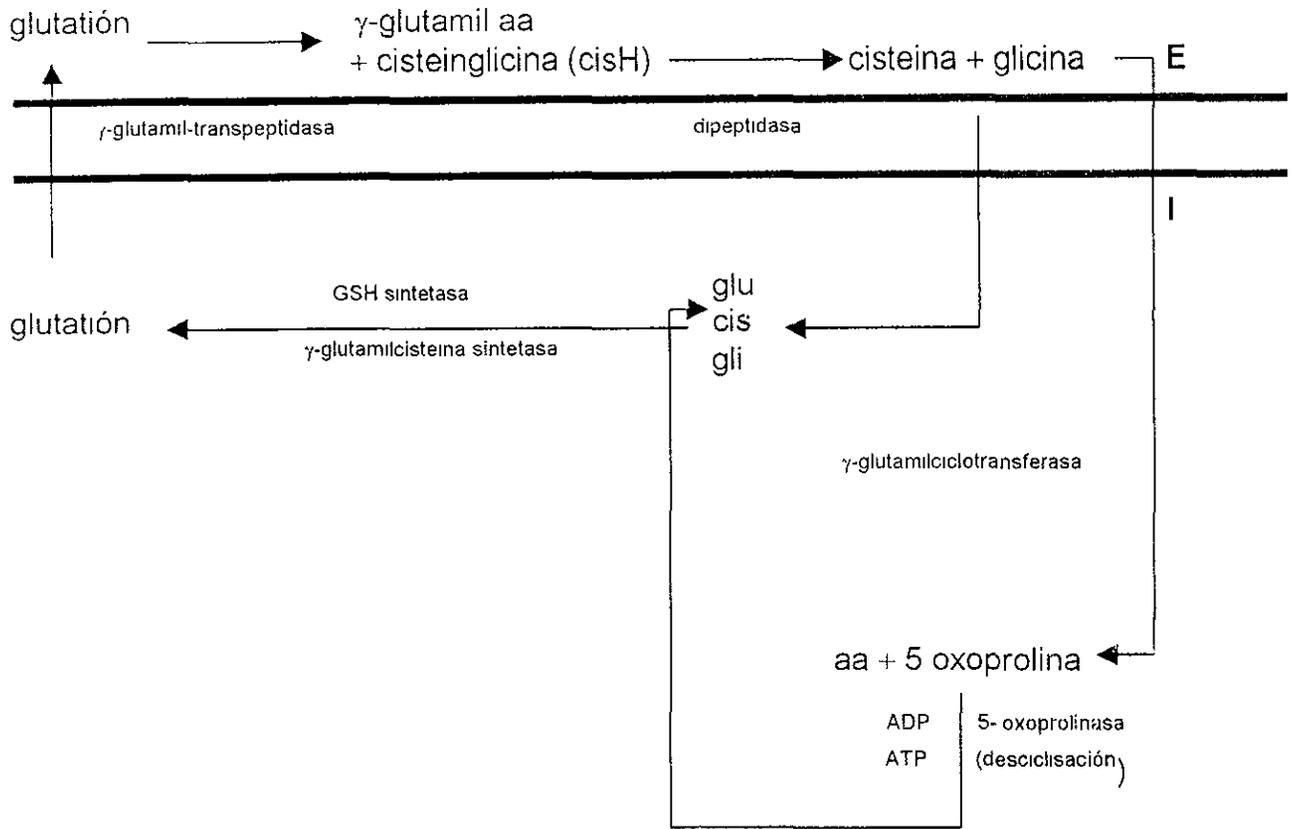


Figura 3 Síntesis y transporte del glutatión

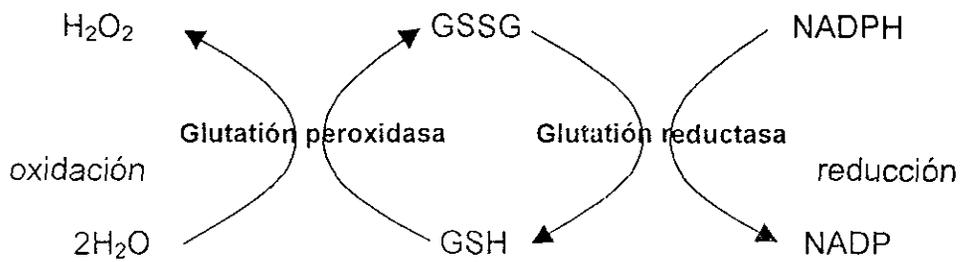


Figura 4: Ciclo del glutatión

por la actividad de la glutatión reductasa que es dependiente del NADPH, una flavoproteína ampliamente distribuida en eucariontes (Reed y Farms, 1984).

Cuando por alguna razón un tejido es expuesto a un gran flujo de H_2O_2 o radicales hidroxilo, en un punto que desequilibre la relación GSH/GSSG, se puede acumular GSSG, alterando los procesos metabólicos causando patologías o procesos necrológicos irreversibles (Halliwell y Gutteridge, 1989), produciendo enfermedad, daño o envejecimiento celular prematuro (Asensi y cols, 1994).

Como podemos ver los radicales libres derivados del oxígeno intervienen en varios procesos patológicos, entre los cuales destacan los inducidos por el abuso en el consumo de etanol, ya sea de manera aguda o crónica; el etanol, aunque es una droga psicoactiva, también es rico en energía. Cuando ocurre un daño durante el estrés oxidativo provocado por el consumo exagerado, este se presenta posiblemente debido a que los sistemas de protección son rebasados o bien se encuentran deteriorados. Durante este proceso hay un aumento en la degradación oxidativa de los lípidos de las membranas o bien se afectan otros componentes celulares importantes como son las proteínas, los carbohidratos y el DNA. Se ha propuesto que el alcohol o sus metabolitos alteran el balance de óxido-reducción celular, así como el de GSH/GSSG de las células hepáticas, actuando como prooxidante o disminuyendo los niveles celulares de antioxidantes (Comporti, 1985).

1.5 Alcoholismo: antecedentes

El etanol es un componente no habitual en la dieta humana; aunque es producido endógenamente por la flora intestinal a bajas concentraciones, es el aporte exógeno el más importante. Como mencionamos anteriormente, el etanol tiene un valor calórico muy alto (de aproximadamente 7.5 kilocalorías por gramo), superior al de los carbohidratos y discretamente inferior al de los lípidos. Con este valor se puede calcular que el consumo normal de etanol produce hasta el 10% de las calorías en la dieta humana normal (evidentemente este valor se ve afectado por factores culturales y varía de acuerdo a la población estudiada) y puede representar del 30 al 35% del aporte energético del alcohólico dotándolo solamente de "calorías vacías", es decir, que no está compuesto por elementos esenciales en una dieta normal. Esto, aunado a los trastornos gastrointestinales que produce el consumo de alcohol, conduce a la desnutrición observada frecuentemente en el alcohólico (Piña-Garza y cols, 1983).

Estudios realizados en los años 70's y 80's, en voluntarios, mostraron que una lesión hepática inicial, como es el hígado graso, puede producirse por consumo de etanol en ausencia de dietas deficientes o enriquecidas en calorías (Lieber y cols, 1965; Lieber y Rubin, 1968). También se demostró que los individuos a los que se les restringió la proteína en la dieta muestran un decremento hasta del 50% en las defensas ante el estrés oxidativo, producido por el metabolismo del etanol (Kritka y cols, 1969). En base a estos antecedentes, se hicieron experimentos en primates, así como en ratas, y revelaron que tanto a nivel bioquímico, como celular, ambos efectos (causados por el etanol o por la desnutrición) interactuaban e intervenían en el daño hepático.

Sabemos que la alteración hepática más grave causada por la ingestión crónica de etanol es la cirrosis, aunque no es posible describir completamente los cambios que se originan en el ámbito molecular por esta enfermedad. El conocimiento actual nos indica que el etanol es fundamentalmente metabolizado por el hígado, quizá en una proporción superior al 90%. Esto hace que la ingesta de etanol se convierta en una avalancha energética, y para manejarla el hígado se ve obligado a modificar su metabolismo en general. Por otro lado el etanol debe ser metabolizado y no existen en el organismo mecanismos de almacenamiento ni de retroalimentación en su oxidación; esto hace que sean la actividad de las enzimas que lo manejan y la disponibilidad de sus cofactores los que regulen su metabolismo (Piña-Garza y cols, 1983). Por otro lado, la mayor actividad del metabolismo del etanol aumenta la producción de H_2O_2 , a partir de la cual se generan en mayor concentración radicales libres, como el superóxido o el radical hidroxilo, metabolitos normales con vidas medias muy cortas y extraordinariamente reactivos, que favorecen la peroxidación de ácidos grasos.

1.5.1 Absorción

En su fase de eliminación, el etanol se oxida hasta CO_2 y H_2O ; los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, 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 una deshidrogenasa alcohólica presente en las mucosas intestinales. La mayor parte del etanol consumido se absorbe como tal a través de las mucosas, tanto del tubo digestivo como del sistema respiratorio. 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 (Zentella de Piña y Piña, 1987).

De tal manera, una vez que se ingiere, comienza a ser absorbido a través de los epitelios mucosos de la boca, y en forma de vapor en los alvéolos pulmonares (Batt, 1989), sin embargo, la cantidad de etanol que se absorbe por estas vías es prácticamente despreciable, por lo que puede considerarse que la totalidad de etanol ingerido llega al estómago, ha partir del cual se absorbe por *difusión simple a través de los epitelios que recubren al propio estómago* y los intestinos similar a lo que sucede con el agua (Watson, 1989). Así el etanol, una vez que llega al estómago, se absorbe en una pequeña proporción hacia el torrente sanguíneo a través de la mucosa gástrica (20 a 30% aproximadamente), mientras que la mayor parte de este es canalizado por el mismo vaciamiento gástrico hacia el intestino delgado (Smith y cols, 1992). Es en el intestino delgado (*principalmente duodeno y yeyuno*) donde se lleva a cabo la mayor absorción del etanol, el cual es rápidamente canalizado hacia la vena porta, y de ahí llevado directamente al hígado para ser metabolizado

Finalmente, solo del 2 al el 10% del etanol consumido es eliminado como tal por vía renal, pulmonar o a través del sudor (Zentella de Piña y Piña, 1987).

1 5 2 El alcoholismo en los países de occidente.

El empleo del etanol como droga está legalmente aceptada por la mayoría de los gobiernos y religiones, a pesar de que es precisamente la sustancia enviciante más usada en el mundo. Su demanda está muy extendida en los países industrializados de occidente y por ende, en América Latina. Su consumo está tan ampliamente generalizado, que en algunos países la ingestión *per capita* de bebidas alcohólicas como cerveza, vino y destilados sobrepasa los 150 litros anuales: en la ex-República Democrática Alemana, por ejemplo el consumo *per capita* es de 1145 litros anuales, mientras que el de bebidas destiladas es 12.5 litros al año; Italia en cambio, presentan el mayor consumo *per capita* de vino, con 79 litros anuales, sin embargo, debido a los distintos tipos de bebidas alcohólicas ingeridas en diferentes naciones y sus amplias diferencias en cuanto al contenido alcohólico, la mejor manera de comparar el consumo de etanol entre diferentes poblaciones, es a través de la estimación del consumo total de alcohol *etílico puro*, considerando, por lo tanto, además del diferente tipo de bebida ingerido, el porcentaje de etanol puro presente en ésta; por ejemplo, las cervezas contienen alrededor de 3 a 6% de etanol puro, los vinos en general de 12 a 14% y las bebidas destiladas 40% (cuadro 4) (Pyorala, 1990; Skog, 1988). Así, en 1987, Francia y Luxemburgo fueron los países con mayor consumo de alcohol (13 litros anuales), seguidos de España y Suiza (con 12.7 y 11.5 litros, respectivamente).

Cuadro 4. Consumo anual *per capita* de etanol total (calculado como etanol absoluto), vino, cervezas y bebidas destiladas en algunos países con mayor consumo.

País	Litros de etanol absoluto	Vino (litros)	Bebidas destiladas (litros de etanol)	Cerveza (litros)
Francia	14.2	75.1	5.75	56.2
Luxemburgo	13	58.5	6.25	116.5
España	12.7	54	7.5	64.5
Suiza	11.1	49.5	5	69.3
Hungría	10.7	21.5	11.75	100.2
Belgica	10.7	23	5.5	121.1
Uruguay	5.5	25.7	4	27.2
Suecia	5.4	11.8	5	51.5
Grecia	5.4	31.8	3.25	40
México	5.4*			

Tomado de Pyorala (1990) y Skog (1988)

* Tomado de Souza y Machorro (1988).

Estudios clínicos han demostrado que los alcohólicos, en países desarrollados, presentan una buena alimentación, lo que contribuye a que la mortalidad producida por el alcoholismo, asociada a la desnutrición sea menor; en México, la mayoría de los alcohólicos presentan desnutrición, con lo cual se explica el incremento en la mortalidad por el etanol.

Las encuestas reportan que en México el consumo *per capita* de etanol estimado para 1984, fue alrededor de 5.4 litros anuales (Souza y Machorro, 1988), que no corresponde a un consumo muy elevado en comparación con otros países; aunque en México no existen estimaciones de la mortalidad total atribuible al

etanol, sí puede elaborarse una estimación provisional, aplicando las fracciones de mortalidad atribuibles al etanol (FAA) publicadas por Stinson y DeBakey (1992) a las principales causas de muerte en la población mexicana.

La mortalidad por cirrosis hepática en México, se ha ubicado en las últimas décadas dentro de las 10 primeras causas de muerte en la población general (Narro-Robles y cols, 1992). La estimación preliminar obtenida en este trabajo, indica que la mortalidad total atribuible al etanol en la población en general es alrededor de 55.2 por cada 100,000 habitantes colocándose solo por debajo de la mortalidad atribuida a los tumores malignos y a las enfermedades del corazón. Este valor comprende el 11.7% de los decesos ocurridos en 1992 para individuos de todas las edades.

Así, en México durante el año de 1994, la cirrosis hepática ocupó el 7º lugar siendo responsable de la muerte de 19,105 personas (Secretaría de Salud, 1994). Cabe hacer notar que este porcentaje de mortalidad atribuible al etanol en la población general de México en 1992 (Skog, 1988; Narro-Robles, 1992), fue mayor que el 5% estimado en EEUU, en 1988 (Stinson y De Baakey, 1992), el 6.1% estimado en España en 1986 (Yañes y cols, 1993) o el 9% estimado en Francia en 1985 (Pignon y Hill, 1991), que son países que presentan un consumo mayor de alcohol *per capita* mas elevado que el nuestro.

1.5.3 Alteraciones bioquímicas debidas al consumo de etanol.

Entre las alteraciones bioquímicas debidas al exceso en el consumo agudo de etanol, algunas corresponden ha acciones propias de la molécula y otras aparecen como consecuencia de su oxidación: unas moléculas consumen NAD^+ (durante la vía de la deshidrogenasa alcohólica) y el NADPH (a través de sistema de oxidación del etanol). Cuando hay disfunción en estas vías se producen en exceso de acetaldehído, NADH y H_2O_2 .

Las alteraciones del equilibrio se dan primeramente, en la velocidad de absorción y la velocidad de degradación; siendo la segunda más lenta que la primera. La actividad enzimática se considera un factor limitante para la oxidación del etanol, ya que se ve afectada por el desequilibrio que ocurre en las pozas de NAD^+ y NADH en el citosol y la mitocondria del hepatocito.

En el citoplasma la relación de NAD^+/NADH es de aproximadamente 900, bajo la acción del metabolismo del etanol disminuye a 175, por acumulación de la forma reducida. En la mitocondria, la relación NAD^+/NADH es de aproximadamente 20 y desciende con la administración de etanol hasta 8. Como es de esperarse, la administración de etanol produce marcados efectos sobre el estado redox en ambos compartimentos celulares. (Piña-Garza, 1983).

1.6 Mecanismos protectores antioxidantes del etanol

Los mecanismos protectores antioxidantes comprenden sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos (Trible y cols, 1987). Los alcohólicos presentan un mal funcionamiento de los mismos, que incluyen entre otros alteraciones del glutatión (Tanner y cols, 1985; Dworkin y cols, 1985; Korpera y

cols, 1985). Esos cambios pueden deberse directamente a los efectos del etanol o a la malnutrición asociada al alcoholismo. De tal manera, el daño en ambos puede estar correlacionado. Kawase y cols. (1989), encontró que la peroxidación hepática se incrementaba significativamente después de la ingesta crónica de etanol en ratas que recibieron bajos niveles de vitamina E en la dieta.

La oxidación inicial de etanol a acetaldehído y posteriormente a acetato, se realiza principalmente en el hígado, en el citoplasma y la mitocondria de los hepatocitos. Los 3 sistemas por los que estos procesos se efectúan son: a) el de la deshidrogenasa alcohólica, b) el de la catalasa, y c) el sistema microsomal oxidante del etanol o MEOS, de acuerdo a sus siglas en inglés (Zentella de Piña y Piña, 1987).

1.6.1 Alcohol deshidrogenasa (ADH)

La vía más común, por la que el organismo cataliza la conversión de etanol a acetaldehído es mediada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Bosron y cols. 1988).

La ADH, metaboliza prácticamente la totalidad del etanol cuando las concentraciones en sangre son moderadas y más de 70% cuando las concentraciones son altas. Esta enzima no es específica para el etanol, ya que oxida una serie de alcoholes e inclusive está asociada a la deshidrogenación de esteroides y en la ω -oxidación de los ácidos grasos. La enzima utiliza como coenzima al NAD generándose NADH



La generación y acumulación de equivalentes reductores en forma de NADH es responsable de muchas de las alteraciones metabólicas que el etanol ocasiona (Piña-Garza y cols, 1983).

La vida media de la ADH es aproximadamente de 4 horas. El ayuno prolongado o restricción proteica produce una disminución de la actividad de la ADH, porque su degradación es mayor que su síntesis. El consumo de 1000 calorías una hora después de la ingesta de etanol, produce un incremento en el metabolismo del etanol en comparación a los individuos que permanecen en ayuno (Creutzfel y Graham, 1971).

Las afinidades tan variables de las múltiples formas de la enzima por su sustrato, son en gran parte responsables de su eliminación.

1.6.2 Sistema Microsomal de Oxidación del Etanol (MEOS)

El MEOS es un sistema presente en los microsomas, que requiere de NADPH y O_2 , e involucra al citocromo P450 en la oxidación del etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena larga

Por último, existe una vía metabólica no oxidativa (Lange et al., 1981; Koop, 1989), en donde el etanol forma ésteres étilicos de acil grasos, a través de una sintetasa de ésteres de acil graso. Si bien es probable que su contribución al metabolismo total del etanol no sea significativa (Koop, 1989), queda a discusión su participación en el desarrollo de alteraciones patológicas en órganos que carecen de sistemas oxidantes del etanol con alta actividad, tales como el páncreas, corazón y cerebro (Laposata y Lange, 1986).

1.7 Acetaldehído, acetaldehído deshidrogenasa y acetato.

En todas las vías de oxidación del etanol conocidas el producto final es el acetaldehído, que a su vez es metabolizado a acetato. Se sabe que el 90% del acetaldehído producido es procesado por el hígado. El acetaldehído generado por cualquiera de estas vías de oxidación viaja a las mitocondrias, donde una acetaldehído deshidrogenasa lo convierte en acetato generando $\text{NADH} + \text{H}^+$ teniendo como coenzima al NAD^+ (Piña-Garza y cols, 1983).

En humanos el acetaldehído incrementa su concentración después de la ingesta de etanol produciendo una variedad de eventos metabólicos en el hígado (Alpers, 1987). La L-cisteína puede formar complejos con el acetaldehído y proteger contra el daño producido por este *in vivo*; a su vez, siendo la cisteína uno de los 3 aminoácidos que constituyen al glutatión, la unión del acetaldehído con la cisteína puede contribuir a la depresión del glutatión hepático, pues el empleo de la misma limita la producción *de novo* del glutatión; el glutatión también, tiene la capacidad de unirse directamente con el acetaldehído causando el mismo efecto que la cisteína (Shaw y cols, 1981). La oxidación del acetaldehído y su desaparición en el 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 este manifiesta sus acciones tóxicas. Uno de los daños más importantes es el realizado en las mitocondrias a nivel del sitio I de la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa. Koivula y Lindros (1975) y Hasamura y colaboradores (1976) encontraron que la actividad de la aldehído deshidrogenasa dependiente del NAD, caracterizada por su alta afinidad por el acetaldehído, permanecía descargada consecutivamente al consumo crónico de etanol. Se ha encontrado, también, baja actividad de la acetaldehído deshidrogenasa en alcohólicos (Palmer y Jenkins, 1982). Consecuentemente, la disminución en la capacidad de la mitocondria para oxidar acetaldehído, asociados al aumento de la oxidación del etanol (y por lo tanto de la generación de acetaldehído) (Nuutienn y cols. 1983) puede provocar un desbalance entre la producción y la distribución de acetaldehído.

El producto posterior a la formación de acetaldehído es el acetato, que es después oxidado a CO_2 y agua por los tejidos periféricos (Karlsson. 1975) y en presencia de etanol no es oxidado por el hígado (Winkler. 1969).

El papel patogénico del acetato está al menos más claro que el del acetaldehído. Así, en tejido adiposo, el acetato inhibe la lipólisis (Nilson y cols. 1978) y se le ha hecho responsable, al menos en parte, de la disminución en la liberación de ácidos grasos y la baja en la circulación de los mismos (Crouse y

cols 1968). En el hígado, el acetato es responsable de varios daños hepáticos (Morgan y Mendenhall, 1977).

1 8 Nutrición, lípidos y alcoholismo

Basándose en los antecedentes presentados, podemos ver que el estudio de los factores presentes en la dieta, en relación con numerosas enfermedades, permite hacer algunos adelantos por lo que se refiere a la evolución de ciertas patologías relacionadas con la nutrición y el alcoholismo.

Así, experimentos recientes han reportado que el tipo de grasa ingerida en la dieta, aunado al consumo de etanol (González y Gray, 1992; Meidani y Natielo, 1991; Masimo D'Aquino y Corcos, 1991; Hidezaku y Tomer, 1986; Hidezaku y French, 1985; Kuratzo y Ponce, 1991; Wisan y Ung-Soo, 1997) puede potenciar el incremento en los radicales libres, induciendo o aumentando la lipoperoxidación y por ende enfermedades hepáticas (Okananohuie y Burbije, 1982; Sánchez y Casas, 1981; Kolak-Tokek y Visal, 1985; Videla y Valenzuela, 1982; Kretzchmar y Reinhard, 1992; Jhon y Littleton, 1980; Jones y Alling, 1983; Nanji y French, 1986; Nordman y Rubiere, 1992; Špeiski y McDonald, 1985). El etanol produce una significativa reducción del glutatión hepático, que puede deberse a su oxidación o a la reacción con sus metabolitos (Sies, 1979) determinando que los hepatocitos sean más susceptibles a la peroxidación de lípidos.

A partir de los resultados obtenidos por Lieber (1984), se estableció que con una dieta completa, sin carencias proteicas, calóricas ni vitamínicas era posible producir algún daño hepático en primates, por intoxicación crónica con etanol.

Los primeros estudios de Nanji y colaboradores (1986) dieron la pauta al inicio del estudio del daño hepático asociado al consumo de etanol. El describió el índice de mortalidad derivada de la cirrosis en muchos países, asociada al consumo *per capita* de etanol, y encuentra una asociación entre el daño y la dieta de los bebedores, sugiriendo que las grasas saturadas y colesterol protegían contra el daño por cirrosis, mientras que las grasas poliinsaturadas lo promovían.

Basándose en estos resultados, se experimentó con ácidos grasos poliinsaturados. Así, los animales intoxicados en forma crónica con etanol y dietas ricas en con ácido linoléico o manteca, sufrían más daño que aquellos tratados con sebo únicamente (Nanji y cols, 1988). Continuando con sus experimentos, administró alcohol por vía intragástrica a las ratas para estudiar los efectos de las diferentes dietas en la composición de ácidos grasos en los microsomas hepáticos. Todos estos estudios, demostraban que, una dieta rica en lípidos saturados, pero baja en lípidos poliinsaturados revertía el daño hepático causado por el etanol. Estos efectos podían explicarse por la baja regulación de la peroxidación de lípidos (Nanji y cols, 1996). Posteriormente se encontró que los ácidos grasos saturados disminuían la endotoxemia y atenuaban el establecimiento de algún daño hepático (Nanji y cols, 1997). También se ha determinado el comportamiento de las proteínas hepáticas al formar aductos con el acetaldehído y su modificación por productos de la peroxidación de lípidos en animales tratados con etanol. Así, aceite de maíz producía hígado graso, con moderada necrosis e inflamación, mientras que el aceite de pescado propiciaba

severa necrosis e inflamación. Por medios inmunológicos, sé monitoreo la acción de los aductos que era más abundante en el aceite de pescado, seguido por el aceite de palma y el etanol más aceite de maíz (Cheng-Jun y cols, 1997). Los resultados experimentales indican que los alcohólicos que consumen pocos ácidos grasos saturados y antioxidantes en sus dietas pueden incrementar el riesgo de desarrollar daño hepático (Pawloski y cols, 1997).

Este es un problema muy grave, particularmente en México donde las fuentes lipídicas más usadas, debido a las características de la cocina (y las condiciones económicas de las personas), se centran en 4 tipos: aceite de maíz, aceite de cártamo (de origen vegetal), manteca de cerdo y sebo de res (de origen animal) Otros tipos de grasas y aceites (como el de pescado, de oliva o de coco) no son muy populares, en cuanto a su uso en la alimentación, por lo que su influencia en el daño por su consumo en la población, es muy baja (Doriga, 1993).

A pesar de que existen estudios sobre los efectos de la administración aguda de etanol en los niveles de GSH/GSSG en animales de laboratorio, es poco lo que se ha estudiado con relación al papel del consumo de diferentes fuentes de lípidos (sebo de res, manteca de cerdo, aceite de maíz, aceite de cártamo) sobre el glutatión hepático, aunado a un estrés oxidativo producido por la intoxicación aguda de esta bebida; por lo que al realizar este trabajo es probable que se pueda determinar cual dieta atenúa mejor el daño provocado por el desbalance de las defensas antioxidativas en sujetos experimentales ante este tipo de estrés oxidativo

2. Planteamiento del problema

A partir de los antecedentes presentados se conoce que el etanol o sus metabolitos pueden producir estrés oxidativo y afectar las defensas antioxidantes en el hígado de los sujetos experimentales. Sin embargo, son muy pocos los estudios realizados que comparan varias fuentes de lípidos de las dietas y el daño hepático causado por el consumo continuo de etanol. Aquí radica la importancia de este proyecto en el cual se analizaron los efectos de la administración aguda de etanol en ratas que fueron alimentadas durante 30 días con una de las siguientes fuentes de lípidos (de uso más común en la dieta de la cocina mexicana): manteca, sebo de res, aceite de maíz y aceite de cártamo. Posteriormente analizamos los efectos al determinar las variaciones en la relación GSH/GSSG en el hígado por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

3. Hipótesis

La variación en la fuente de lípidos de la dieta producirá un cambio en la relación GSH/GSSG en el hígado de ratas macho a las cuales se les induce estrés oxidativo mediante ingesta aguda de etanol.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar los niveles de GSH, GSSG hepáticos y la relación GSH/GSSG en ratas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos y tratadas con una dosis elevada de etanol administrado en forma aguda.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de sebo de res en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.2 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de manteca de cerdo en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.3 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de aceite de maíz en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.4 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de aceite de cártamo en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

2. Planteamiento del problema

A partir de los antecedentes presentados se conoce que el etanol o sus metabolitos pueden producir estrés oxidativo y afectar las defensas antioxidantes en el hígado de los sujetos experimentales. Sin embargo, son muy pocos los estudios realizados que comparan varias fuentes de lípidos de las dietas y el daño hepático causado por el consumo continuo de etanol. Aquí radica la importancia de este proyecto en el cual se analizaron los efectos de la administración aguda de etanol en ratas que fueron alimentadas durante 30 días con una de las siguientes fuentes de lípidos (de uso más común en la dieta de la cocina mexicana): manteca, sebo de res, aceite de maíz y aceite de cártamo. Posteriormente analizamos los efectos al determinar las variaciones en la relación GSH/GSSG en el hígado por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3. Hipótesis

La variación en la fuente de lípidos de la dieta producirá un cambio en la relación GSH/GSSG en el hígado de ratas macho a las cuales se les induce estrés oxidativo mediante ingesta aguda de etanol.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar los niveles de GSH, GSSG hepáticos y la relación GSH/GSSG en ratas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos y tratadas con una dosis elevada de etanol administrado en forma aguda.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de sebo de res en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.2 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de manteca de cerdo en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.3 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de aceite de maíz en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.4 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de aceite de cártamo en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

2. Planteamiento del problema

A partir de los antecedentes presentados se conoce que el etanol o sus metabolitos pueden producir estrés oxidativo y afectar las defensas antioxidantes en el hígado de los sujetos experimentales. Sin embargo, son muy pocos los estudios realizados que comparan varias fuentes de lípidos de las dietas y el daño hepático causado por el consumo continuo de etanol. Aquí radica la importancia de este proyecto en el cual se analizaron los efectos de la administración aguda de etanol en ratas que fueron alimentadas durante 30 días con una de las siguientes fuentes de lípidos (de uso más común en la dieta de la cocina mexicana): manteca, sebo de res, aceite de maíz y aceite de cártamo. Posteriormente analizamos los efectos al determinar las variaciones en la relación GSH/GSSG en el hígado por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3. Hipótesis

La variación en la fuente de lípidos de la dieta producirá un cambio en la relación GSH/GSSG en el hígado de ratas macho a las cuales se les induce estrés oxidativo mediante ingesta aguda de etanol.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar los niveles de GSH, GSSG hepáticos y la relación GSH/GSSG en ratas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos y tratadas con una dosis elevada de etanol administrado en forma aguda.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de sebo de res en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.2 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de manteca de cerdo en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.3 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de aceite de maíz en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

4.2.4 Medir GSH y GSSG así como la relación GSH/GSSG hepáticos, para cuantificar el efecto del consumo de aceite de cártamo en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo por la ingesta de etanol en forma aguda.

5. Metodología

5.1 Material químico.

Los aceites de maíz y cártamo, así como la manteca y el sebo fueron de uso comercial.

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos fueron: GSH, GSSG; γ -glu-glu (gama-glutación-glutamina), batofenaltrolina (BPDS), N-etilmaleimida (NEM), m-cresol purpura, ácido propanosulfónico (MOPS), 2,4 dinitrofluorobenceno (DNFB), reactivo de Sanger, y lisina de la marca Sigma, grado analítico; eter, E&M Science; ácido perclórico, Mallinckrodt Chemical e hidróxido de potasio y etanol de J.T. Baker,.

Los reactivos grado HPLC fueron: metanol de E&M Science; acetato de sodio y ácido acético de Merck.

Se empleó también agua grado HPLC filtrada en filtros Millipore de 0.2 micras

5.2 Material biológico

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar con destete tardío de aproximadamente 120g, para evitar la influencia de otro tipo de alimento. Los sujetos experimentales se mantuvieron individualmente en cajas de acrílico, con agua *ad libitum* y un ciclo de luz-obscuridad de 14 por 10 horas.

5.3 Diseño experimental

Las ratas fueron alimentadas durante 30 días con una dieta normoproteica y normolipídica (5%). Se separaron en 4 lotes, y se les alimentó con un régimen semipurificado a los cuales se les cambió la fuente de lípidos. Se trabajó con 4 fuentes: aceite de maíz, aceite de cártamo, manteca de cerdo y sebo de res. Cada grupo de ratas (6) recibió 15 gramos de dieta al día. Los alimentos fueron formulados para cumplir las necesidades que indica la NCR (National Academy of Sciences, 1986) (anexo II) y se prepararon en el laboratorio. Los experimentos se realizaron por duplicado (en ratas sin intoxicar e intoxicadas con etanol). Se mantuvieron 2 grupos: control (con nutricubos Ralstom) y los que recibieron todo el tratamiento experimental, menos la intoxicación con etanol.

5.4 Obtención y procesamiento del hígado

Después de 30 días de recibir el alimento las ratas se intoxicaron por vía orogástrica de manera aguda con etanol (5 g/ Kg de peso) para inducir el estrés oxidativo. Las ratas sin intoxicar, que recibieron solución isocalórica de sacarosa (40% p/v) también se mantuvieron durante este periodo, con la misma dieta y durante el mismo tiempo. Posteriormente fueron ligeramente anestesiadas en una cámara de eter; mediante una incisión abdominal se tomó de un trozo del hígado de aproximadamente 250mg, se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de sangre, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó en el ultracongelador

(Revco) hasta el día de su procesamiento. El manejo de la muestra se realizó a baja temperatura, utilizando hielo; se le agregó 2 ml de ácido perclórico al 6%, BPDS 1mM y NEM 20 mM. Se homogeneizó (en un máximo de 30 segundos), y el homogenado se centrifugó a 15,000 g, por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante (que fue el extracto ácido) y se desechó el precipitado.

5.5 Derivación de la muestra

Una vez obtenido el extracto se procesó las muestras para determinar GSH y GSSG por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando el método de Asensi y colaboradores (1994), con algunas modificaciones que a continuación se mencionan. Para derivar la muestra se tomaron 500 μ l del extracto, se le adicionaron 50 μ l de γ -glu-glu (como estándar interno), 10 μ l de m-cresol púrpura (como indicador de pH) y 50 a 150 μ l de KOH-MOPS 2 M (para llevar la solución de un pH de 8 a 8.5) y se centrifugó a 15,000 g por 5 minutos. Después se tomaron 200 μ l del sobrenadante agregándose 100 μ l de 2,4 DNFB al 1% en etanol. Las muestras derivadas se incubaron a temperatura ambiente y en la obscuridad durante una hora. Después del tiempo de incubación se agregaron 10 μ l de lisina 1 M para captar todo el DNFB que no reaccionó con los tioles, se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta el día del análisis.

5.6 Medición de GSH y GSSG

Para la determinación del GSH y GSSG en las muestras se empleó un equipo HPLC marca Beckman con una columna de tipo iónico Spherisorb fase inversa con un grupo NH₂, específica para los derivados formados. Se leyó a una absorbancia de 365nm.

La columna de HPLC se purgó, para evitar la formación de burbujas de aire o otra sustancia contaminante que pudiera interferir o restarle confianza a la medición de las muestras.

Se realizaron curvas de calibración de GSH y GSSG 400nM con solución de gama-glutación-glutamina (γ -glu-glu) 1mM como estandar interno. Las curvas de calibración para GSH y GSSG se repitieron un mínimo de 4 veces con la finalidad de determinar el buen funcionamiento de la columna para que así no se interfiriera con la obtención de los resultados

Las muestras se reconstituyeron con 300 μ l de metanol al 80% (fase móvil A), se inyectaron 100 μ l, con un flujo de 1ml por minuto. La fase móvil B estaba constituida por acetato de sodio 0.5M y ácido acético en metanol al 64%. Las corridas se hicieron en un gradiente lineal con los siguientes tiempos: 5 minutos de fase A 80%, fase B 20%; 10 minutos de gradiente hasta llegar a la fase A 1%, fase B 99%; 7 minutos con las mismas proporciones para que se separe cualquier derivado que se pudiera mantener unido a la columna; 6 minutos para regresar a las condiciones iniciales y 4 minutos para reequilibrar la columna. Tanto las muestras como los estándares se corrieron por duplicado.

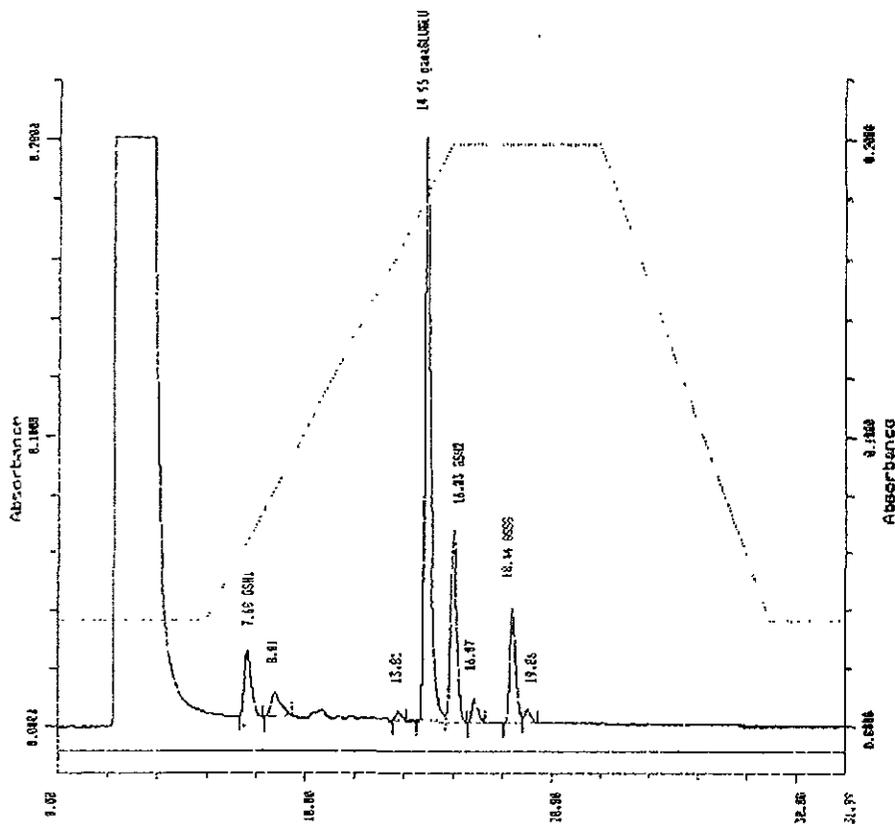
Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente a través de una prueba de ANOVA con 2 vías y una prueba aplicando el método de Student-Newman-Keuls, utilizando el programa Sigma Stat.

6. Resultados.

De los métodos empleados para la realización de los ensayos se obtuvieron los siguientes resultados.

6.1 Identificación de los tiempos de retención para GSH y GSSG por HPLC

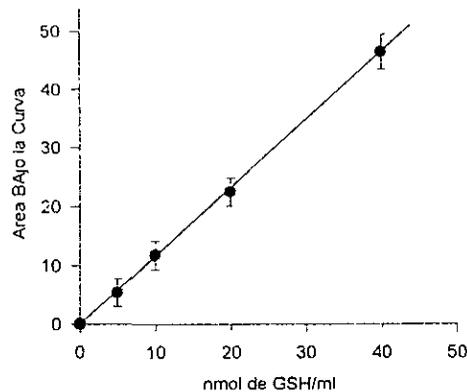
En la gráfica 1 se muestra la identificación de los tiempos de retención para GSH y GSSG determinado con estándares, y el gradiente utilizado para la obtención de estos resultados. El tiempo de retención para el γ -glu-glu (estándar interno) fué de 14.95 minutos; para GSH se presentaron 2 tiempos de retención, uno a 7.68 y otro a los 16.03 minutos, respectivamente; por último el tiempo de retención para GSSG se presentó a los 18.44 minutos. Todos estos tiempos de retención corresponden a los reportados por Asensi y colaboradores (1994). Se presentan también otros picos a diferentes tiempos que son aductos que se forman durante la derivación de las muestras, pero no interfieren con la identificación de las moléculas de este estudio.



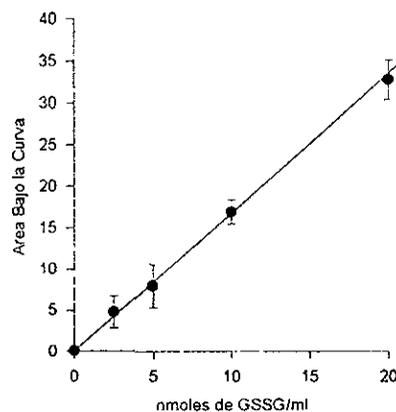
Gráfica 1. Identificación tiempos de retención para GSH, GSSG y γ -glu-glu en el HPLC.

Después de la identificación de los tiempos de retención para cada uno de los compuestos, se realizaron curvas de calibración, tanto para el GSH como para el GSSG, para validar nuestro método y observar la reproducibilidad de los resultados, además de cotejar que la columna, así como todo el equipo se encontraba en perfectas condiciones.

En la gráfica 2 se observa la curva de calibración para el GSH, donde se aprecia una linealidad conforme se incrementa la concentración del estándar. Lo mismo se obtiene para el GSSG (gráfica 3). Cada una de las curvas de calibración se realizó 4 veces.



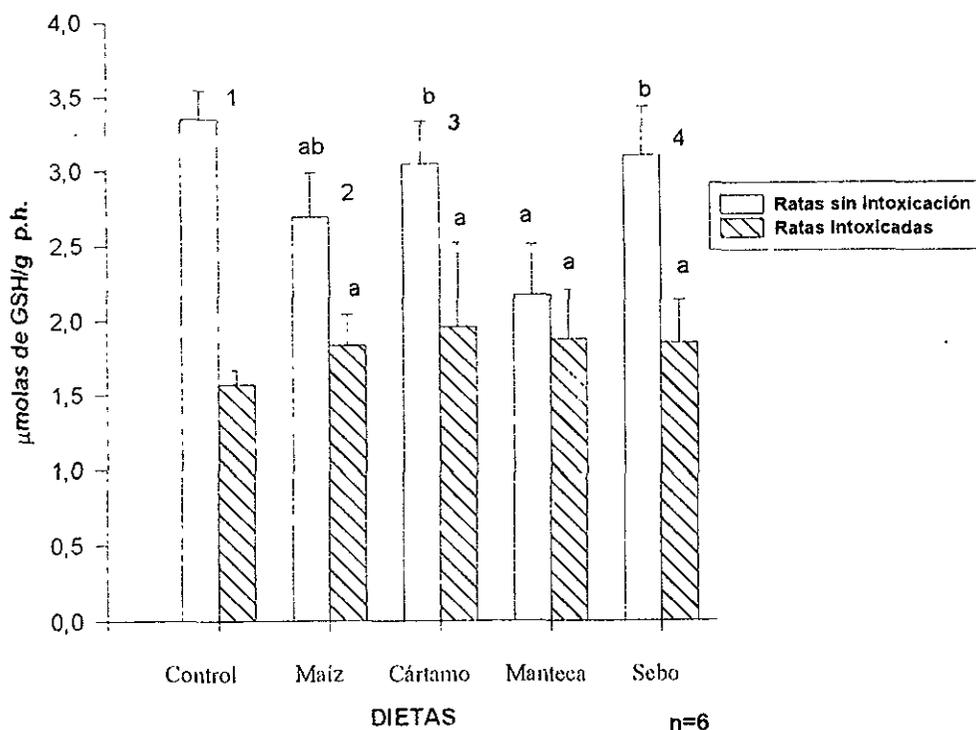
Gráfica 2. Curva estándar de calibración de GSH para determinar la reproducibilidad del método y sistema de HPLC. Las concentraciones del estándar fueron de 0, 5, 10, 20 y 40 nM de GSH.



GRAFICA 3. Curva estándar de calibración de GSSG para determinar la reproducibilidad del método y sistema de HPLC. Las concentraciones del estándar eran de 0, 5, 10, 15 y 20 nmoles/ml.

6.2 Determinación de GSH en hígado de rata.

Se determinó la concentración de GSH en homogenado de hígado de ratas alimentadas durante un mes con una dieta comercial (Ralstom); al finalizar el periodo de alimentación indicado las ratas se dividieron en 2 lotes, uno de los cuales (n=6) fue intoxicado, con etanol en forma aguda (5g/ kg de peso corporal), el otro (n=6) fue tratado con solución isocalórica de glucosa para restar además la respuesta producida por el manejo de las ratas.



- 1) Control sin Etanol vs Control con Etanol
- 2) Maíz con etanol vs maíz con etanol
- 3) Cártamo sin etanol vs Cártamo con etanol
- 4) Sebo sin Etanol vs Sebo con Etanol
- a) Tuvieron diferencia significativa con respecto al lote control sin intoxicar.
- b) Tuvieron diferencia con respecto al lote control intoxicado

GRAFICA 4: Niveles de GSH en hígado de rata; la prueba estadística empleada (ANOVA) tiene una $p=0.05$.

En la gráfica 4 se muestra el comportamiento de los grupos control y experimentales, con los que se trabajó. De entrada se presentan los valores de GSH del lote control, tanto del alimentado con la dieta comercial, como el del intoxicado con etanol, que consumió el mismo alimento. En el primer lote se obtuvo un valor de GSH de 3.34 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo, mientras que el lote intoxicado presentó un valor de 1.563 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo, es decir, tuvo una disminución del 53% en comparación al lote sin intoxicación; se observa también diferencia estadística, al comparar ambos tratamientos.

Se hizo el mismo procedimiento para los grupos experimentales ($n=6$) que fueron alimentados con dietas que contenían solo una de las siguientes fuentes de lípidos: aceite de maíz, aceite de cártamo, manteca de cerdo y sebo de res.

El lote experimental sin intoxicar que consumió aceite de maíz en la dieta tuvo un valor de 2.68 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo y en el intoxicado con etanol, alimentado bajo el mismo régimen, presentó 1.82 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo teniendo una disminución del 32% en comparación con el lote anterior. En ratas intoxicadas y sin intoxicar que consumieron aceite de maíz, se tuvo el mismo comportamiento estadístico que el lote control, y en el caso del lote que recibió esta fuente lipídica, asociada al alimento se encontró diferencia con respecto a ambos lotes control, al igual que en las ratas que ingirieron etanol en este grupo, y las del control solo.

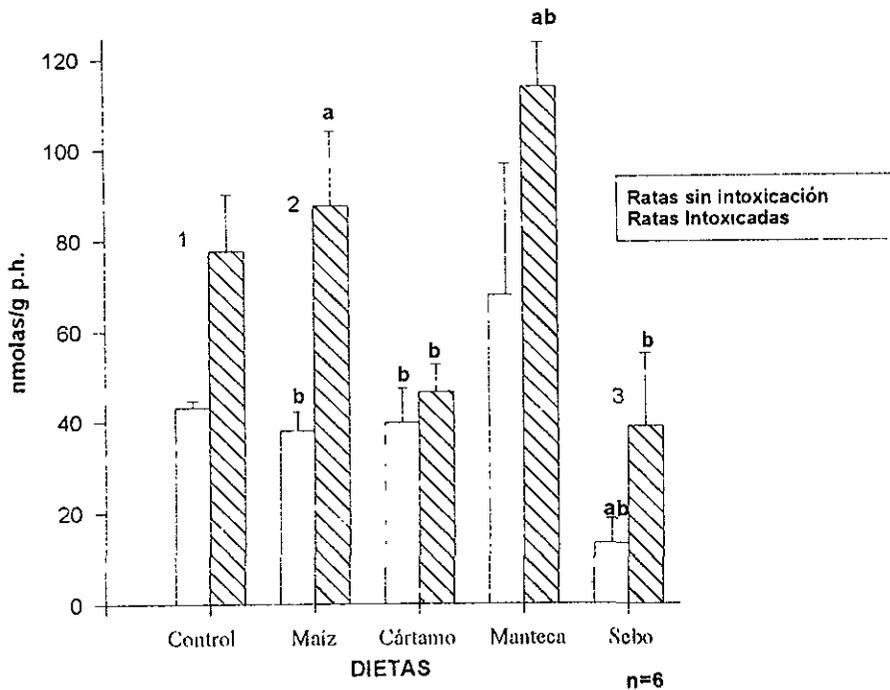
Las ratas que consumieron aceite de cártamo en la dieta tuvieron un valor de 3.04 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo en animales sin intoxicar y 1.95 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo en las intoxicadas, lo que equivale a una baja del 34%, con respecto al grupo no intoxicado que consumió aceite de cártamo en la dieta. Al realizar el análisis estadístico se encontró que el lote con aceite de cártamo, en ratas intoxicadas y sin intoxicar tuvo el mismo comportamiento estadístico que el lote control, siendo diferente para los grupos intoxicados con etanol, del aceite de cártamo y del lote control no intoxicado, así como del que consumió esta fuente de lípidos sola en el alimento y el control asociado al xenobiotico.

Las ratas que consumieron manteca de cerdo en la dieta presentaron un valor de GSH de 2.16 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo en los animales no intoxicados y 1.86 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo en los intoxicados con etanol y la fuente lipídica citada, siendo del 13% la disminución, respecto al lote anterior; ambos tratamientos (intoxicado y sin intoxicar) presentaron diferencia con respecto al lote control que no recibió etanol.

Al determinar los valores de GSH de las ratas que consumieron sebo de res en la dieta, se obtuvo un valor de 3.09 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo en los animales que no fueron intoxicados y 1.83 $\mu\text{molas/g}$ peso húmedo en los intoxicados con etanol, dando como resultado una disminución del 40%, en comparación con el lote que consumió sebo de res en la dieta y no fue intoxicado. Se tuvo un comportamiento estadístico entre tratamientos (intoxicado y sin intoxicar) parecido al del lote control; el mismo caso se presentó para las parejas formadas por el sebo asociado al etanol y el lote control sin el xenobiotico, y también entre el sebo solo y el control tratado con etanol.

Determinación de GSSG en hígado de ratas

Como citamos en los antecedentes, cuando se presenta el estrés oxidativo generalmente hay un incremento de GSSG debido a la utilización del GSH como agente antioxidante (Meister, 1983). Por esta razón se determinaron los niveles de GSSG en los hígados de rata de los mismos animales, en forma simultánea a la medición de GSH en el homogenado de hígado, del cual obtuvimos los siguientes resultados.



- 1) Control sin etanol vs Control con Etanol
 - 2) Maíz sin etanol vs maíz con etanol
 - 3) Manteca sin etanol vs Manteca con etanol
- a) Presentan diferencias con respecto al lote control no intoxicado
b) presentan diferencia con respecto al lote control intoxicado

Gráfica no. 5: Niveles de GSSG en hígado de rata la prueba estadística empleada (ANOVA) tiene una $p=0.05$.

La gráfica 5 presenta los resultados para GSSG. En el lote control sin intoxicar hay una concentración de 43.11 nmolas/g de peso húmedo y el intoxicado con etanol, 77.6 nmolas/g de peso húmedo, lo que representa un aumento del 80%, en comparación con el lote control no intoxicado; al comparar ambos tratamientos se presentó diferencia estadística.

Las ratas que consumieron aceite de maíz en la dieta y no fueron intoxicadas, presentaron un valor de GSSG de 37.84 nmolas/g de peso húmedo y las ratas intoxicadas con etanol que consumieron aceite de maíz en la dieta tuvieron un valor de GSSG de 87.42 nmolas/g de peso húmedo, que representa un aumento de 131% al compararlo con las ratas que consumieron aceite de maíz en la dieta y no fueron intoxicadas. Se obtuvo un comportamiento estadístico similar al del lote control, cuando se comparaban animales intoxicados y sin intoxicar; además, se encontró diferencia entre el aceite de maíz asociada a la dieta y el lote control con etanol, así como para esta fuente lipídica aunada al xenobiótico, y el lote control no intoxicado.

Las ratas que consumieron aceite de cártamo en la dieta y no fueron intoxicadas, presentaron un valor de GSSG de 39.62 nmolas/g de peso húmedo, a su vez, los animales que fueron intoxicados con etanol y consumieron aceite de cártamo en la dieta, tienen un valor de GSSG de 46.38 nmolas/g de peso húmedo; la comparación de los animales que consumieron aceite de cártamo en la dieta y no fueron intoxicadas contra los que fueron intoxicados con etanol y consumieron aceite de cártamo en la dieta, se obtuvo un aumento del 26% del segundo con respecto al primero; ambos lotes presentan diferencia al compararse con el lote control con etanol.

Las ratas que consumieron manteca de cerdo en la dieta y no fueron intoxicadas tienen un valor de GSSG de 67.56 de peso húmedo, y las intoxicadas con etanol que consumieron manteca de cerdo en la dieta fue de 113.21 nmolas/g de peso húmedo, lo que representa un aumento del 67%. Hubo diferencia entre la manteca asociada a la dieta cuando se administraba etanol, y los lotes control con ambos tratamientos.

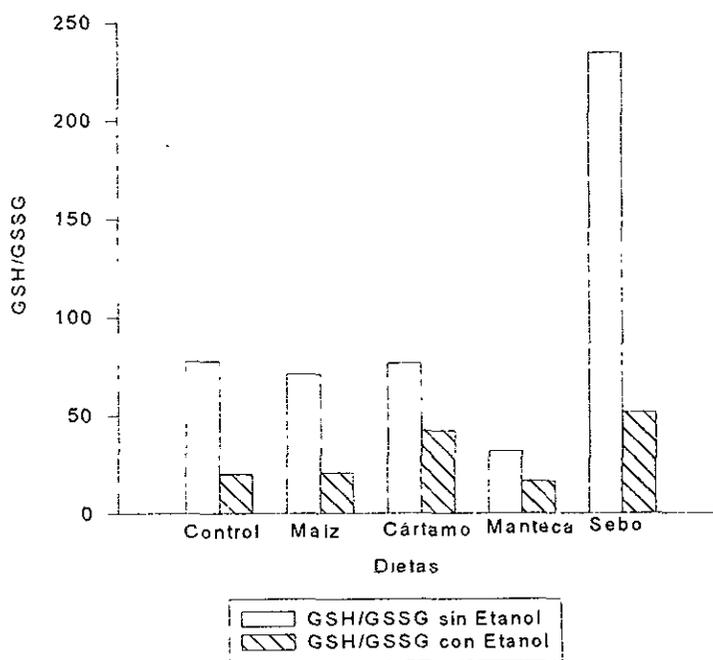
Los animales que fueron intoxicados con etanol y consumieron sebo de res en la dieta, tienen un valor de GSSG de 38.51 nmolas/g de peso húmedo que representó un aumento de 191% al compararlo con las ratas que consumieron sebo de res en la dieta y no fueron intoxicadas(13.21 nmolas/g de peso húmedo); finalmente, se tuvo un comportamiento estadístico similar al grupo control, por cuanto a los animales no intoxicados y sin intoxicar, de este grupo; se presentó también diferencia cuando se daba esta fuente lipídica (con y sin etanol) asociada a la dieta, con respecto al lote control tratado con etanol, y cuando se daba sola, al compararla con el control sin la droga.

6.4 Relación GSH/GSSG en hígado de rata.

En la gráfica 6 se presenta la relación GSH/GSSG (es decir, cuantas moléculas de GSH hay, por las de GSSG), tanto para las ratas sin intoxicación como las intoxicadas con etanol. De esta proporción se obtuvo un valor de 77.62 en ratas sin intoxicación y una disminución del 20% en las intoxicadas con etanol, con respecto al valor de las no intoxicadas

La relación GSH/GSSG ligeramente baja del grupo control, posiblemente fue a consecuencia de la dieta comercial empleada; sin embargo, este valor se encuentra alrededor de lo reportado por otros autores (Reed y Farms, 1984; Meister, 1993), lo cual valida que lo tomemos como punto de referencia para nuestros demás datos.

Al confrontar la relación GSH/GSSG de los grupos experimentales con la del lote control sin intoxicar, se observó una disminución en el aceite de maiz un 9% en ratas sin intoxicar y un 73% en ratas intoxicadas. El aceite de cártamo presenta una baja de un 1% en animales no intoxicados y un 46% en animales intoxicados con etanol. Las ratas que consumieron manteca de cerdo en la dieta, y no fueron intoxicadas presentaron un decremento en la relación GSH/GSSG en un 59% y las intoxicadas un 79%. El tratamiento con sebo de res tuvo un aumento de la proporción GSH/GSSG de más del 100% en ratas no intoxicadas y una baja de 33% en ratas intoxicadas con etanol.



Gráfica 6. Relación GSH/GSSG en hígado de ratas sin intoxicación e intoxicadas con etanol

7. Discusión

La intoxicación aguda con etanol provoca un desbalance de los niveles de glutatión, pues como lo muestran nuestros resultados, si se administra a los animales este xenobiótico, hay una disminución de GSH y aumento de GSSG, lo cual refleja el efecto negativo de esta droga sobre las barreras antióxidantes; esto ya había sido observado por otros autores (Sies, 1979; Nanji, 1986), sin embargo el uso del HPLC nos permite una detección más precisa, directa, eficaz y sensible de las 2 moléculas trabajadas (como se vé al inicio de nuestros resultados), a diferencia de otras técnicas utilizadas, que se caracterizan por ser indicadoras de tipo indirecto; de tal manera, nuestros estudios son más representativos y refuerzan aún más la afirmación de que el consumo de etanol causa daños en el metabolismo.

Como habíamos mencionado anteriormente, el estudio de los factores presentes en la dieta, como las fuentes lipídicas, en relación con el consumo de etanol, permite hacer algunos adelantos por lo que se refiere a la evolución de ciertas patologías relacionadas con la nutrición y el alcoholismo. De tal manera, aunque varios autores, habían realizado trabajos sobre este tipo de eventos (Okananohuie y Burbije, 1982; Sánchez y Casas, 1981; Kolak-Tokek y Visal, 1985; Videla y Valenzuela, 1982; Kretzchmar y Reinhard, 1992; Jhon y Littleton, 1980; Jones y Alling, 1983; Nanji y French, 1986; Nordman y Rubiere, 1992; Speiski y McDonald, 1985), ninguno de estos contó con las ventajas ya descritas al utilizar el HPLC, que nos brinda un comportamiento más real de las moléculas estudiadas.

Al analizar el comportamiento del glutatión en las ratas alimentadas con aceite de maíz asociado a la dieta, se ve un efecto similar al hallado en el aceite de cártamo, aunque se observa en el abatimiento de los niveles de GSH en presencia o ausencia del estrés provocado por la intoxicación aguda con etanol. Este aceite, es más empleado en este tipo de pruebas y nuestros resultados se suman a los reportados por otros autores (González y Gran, 1992; Median y Natielo, 1991, Masimo D'Aquino y Corcos, 1991; Hidezaku y Tomer, 1986; Hidezaku y French, 1985; Kuratzo y Ponce, 1991; Wisan y Ung-Soo, 1997) que empleando técnicas para medir estrés oxidativo, encuentran comportamientos parecidos a los obtenidos en nuestro estudio.

El aceite de cártamo, no altera los niveles de glutatión, puesto que las ratas que lo *ingirieron* en la dieta presentaron un valor de GSH similar al de lote control, asociado a una ligera disminución del GSSG; a su vez, los animales alimentados bajo el mismo régimen, pero que fueron intoxicados con etanol, presentaron poco cambio en la relación GSH/GSSG, por lo que podría decirse que este tipo de fuente lipídica le está brindando protección, al organismo, pues su consumo, ya sea sólo o asociado a este xenobiótico, no afecta en forma negativa los niveles de las barreras antioxidantes. Este efecto no había sido reportado usando la técnica que nosotros empleamos, y sólo daba aproximaciones al comportamiento, ya que otros autores basaban sus experimentos en metodología no tan sensible (Nanji, 1988) mencionando solo el comportamiento de los indicadores utilizados.

Basándose en nuestros resultados podríamos inferir que el comportamiento de ambas fuentes de lípidos en la dieta, podría deberse a los ácidos grasos que conforman a los aceites usados en nuestro estudio (cuadro 8), puesto que el

aceite de maíz tiene una cantidad de ácidos grasos insaturados y de saturados, similar a la del de cártamo, aunque el primero produce efectos más marcados sobre el GSH, que se podría reflejar en un posible aumento de la peroxidación lipídica. Otros autores (Kuratzo y Ponce, 1991; D'Aquino y Corcos, 1991; González y Gran, 1992), habían medido el grado de peroxidación de varios tipos de aceites, entre los que se incluían el de maíz, el de cártamo o de ácidos grasos insaturados, encontrando un comportamiento similar (aunque no tan preciso), al que nosotros tenemos, midiendo su efecto sobre las barreras antioxidantes, en el cual se ve el *daño provocado por la ingesta de aceite de maíz y la protección brindada por el de cártamo*. Quizá la diferencia entre los resultados de otros autores y los nuestros, pueda deberse a que nosotros empleamos al animal integro, con la intención de hacerlo más aplicativo hacia las personas afectadas por estas patologías.

Cuadro 8: Porcentaje de ácidos grasos presentes en los lípidos de la dieta.

Acido graso	Aceite de maíz	Aceite de cártamo	Manteca de cerdo	Sebo de res
14:0	-	-	-	1.40
16:0	5.53	12.3	28.09	22.07
17:0	-	-	-	0.11
18:0	2.90	1.8	70.30	72.23
18:1	16.13	11.2	-	0.225
18:2	75.44	74.3	-	0.195
19:0	-	-	-	0.180
20:0	<0.43	-	0.20	0.289
20:1	-	-	-	-

Tomado de Caballero (1998)

El sebo de res en ratas no intoxicadas presentó una alta proporción GSH/GSSG debido su baja concentración de GSSG, y su concentración de GSH similar a la del lote control; así mismo, en los animales intoxicados con etanol, alimentados con una dieta asociada a esta grasa, se presentó menor disminución de la relación GSH/GSSG, al compararlas con el lote control no intoxicado; esto nos podría indicar un cierto nivel de protección (Nanji y cols, 1988), que estaría atenuando el estrés oxidativo provocado por el etanol.

Con la manteca de cerdo obtuvimos un efecto contrario al del sebo de res, es decir, una baja en GSH y un aumento del GSSG; esto nos permite inferir que esta grasa funge como fuente propicia para la peroxidación lipídica si se le proporciona en la dieta o se le asocia a la ingesta de etanol (Nanji, y cols., 1995; Roll, y cols, 1991; Fukoi, y cols., 1990; Junqueira, y cols., 1993).

Estudios recientes (Eder, 1999) han demostrado que las grasas, al exponerse a temperaturas muy elevadas, pueden provocar el aumento de la lipoperoxidación de ácidos grasos y la formación de xenobióticos. De tal manera, la manteca de cerdo al ser extraída, estaría más expuesta a los cambios por calentamiento, que el sebo de res, por lo que sería más susceptible de peroxidarse, dada la posible transformación que pudiesen presentar los ácidos grasos y la producción de agentes tóxicos, que actuarían como xenobióticos,

formando aductos con el glutatión, que a su vez abatirían los niveles de este antioxidante.

Los procesos de refrigeración son también un factor importante, pues se ha reportado que la conservación de la manteca de cerdo provoca efectos similares a los de aceites vegetales ricos en ácidos grasos insaturados (Papavergou, 1995) y el sebo de res bajo las mismas condiciones no se ve afectado (O'Neill, 1998); así, de alguna manera, este último es menos susceptible a oxidarse, y por lo tanto presenta menos tendencia disminuir las defensas antioxidantes, proporcionando a su vez, un cierto nivel de protección, como habíamos mencionado anteriormente.

Como se puede ver, el consumo de aceite de maíz o manteca de cerdo provoca daños, que se asocian con el inicio de patologías como el hígado graso, la esteatosis o la cirrosis, cuya etología probable se dá principalmente por el desorden causado en la membrana celular del hepatocito por la peroxidación de lípidos, la cual se acentúa aún más si se consume etanol (Nanji, y cols., 1995; Roll, y cols, 1991; Fukoi, y cols., 1990; Junqueira, y cols., 1993). A su vez, en base a nuestros resultados, podría decirse que el aceite de cártamo y el sebo de res funcionan como atenuadores del estrés provocado por la administración de etanol, sin embargo, el consumo de estos 2 lípidos, por sí solos, también pueden causar problemas, quizá no hepáticos pero sí a nivel cardiovascular, por lo que su consumo en exceso tampoco es muy recomendable (Harman y cols, 1976; Lieber, 1984a; Lieber, 1984b; Narro-Robles y cols. 1992; Coyle y Puttfacken, 1993; Nanji y cols, 1994).

8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos concluimos que la concentración de glutatión, considerada como principal barrera antioxidante, puede ser modulada, tanto por algunas fuentes de lípidos, como por el consumo de etanol, o ambos, los cuales provocan un estrés oxidativo que se refleja en la disminución de los niveles de GSH y el consecuente aumento de GSSG.

Así tenemos que si se consume manteca de cerdo en la dieta hay mayor daño provocado posiblemente por la peroxidación lipídica, pudiendo ser ésta la razón del consumo de defensas antioxidantes. Este daño se potencia por consumir etanol en forma aguda.

Por otra parte, el consumir dietas con sebo de res solo provoca la disminución en los valores de GSH e incremento en los de GSSG, cuando son acompañados de la ingesta de etanol.

De tal forma, la variación en la fuente de lípidos de la dieta efectivamente produce un cambio en la relación GSH/GSSG en el hígado de ratas macho a las cuales se les induce estrés oxidativo mediante ingesta aguda de etanol.

9. Perpectivas

Una vez determinado el efecto de las fuentes lipídicas de más uso en México, asociado a la ingesta de etanol, en los niveles de glutatión hepático, podríamos complementar nuestro estudio midiendo los valores de glutatión en sangre o en hepatocitos, aislados auxiliándonos de otras técnicas, como por ejemplo, espectrofotométricas. A su vez, se podría montar una estrategia de experimentación que nos permitiera detectar estrés oxidativo, como podrían ser la determinación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS), determinación de triacilglicéridos (TAGS), o de antioxidantes como las vitaminas, en homogenado de hígado, primero y posteriormente en hepatocitos aislados

10. Comentario final

El origen de muchas enfermedades hepáticas radica en las costumbres alimenticias que se practican según el origen de las personas. En México contamos con el grave problema de la mal nutrición que nos proporciona nuestro ritmo de vida, y debido a una mala educación en la alimentación, tendemos más a consumir comidas rápidas, ricas en grasas y aceites (como la manteca de cerdo y el aceite de maíz, por ejemplo), que como hemos visto, pueden causar graves daños a la salud. Esto no significa que la comida mexicana sea poco recomendable, aunque su preparación tenga como base, en la mayoría de los casos a estas fuentes lipídicas; lo que hay que procurar es no abusar de estos alimentos, pues todo en exceso traerá consecuencias no deseables.

Podríamos decir que lo más recomendable para una dieta sana en las personas alcohólicas sería que estas se constituyeran en base a aceite de cártamo y/o sebo de res, sin embargo, su empleo también acarrea ciertas desventajas para la salud en el sistema cardiovascular.

8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos concluimos que la concentración de glutatión, considerada como principal barrera antioxidante, puede ser modulada, tanto por algunas fuentes de lípidos, como por el consumo de etanol, o ambos, los cuales provocan un estrés oxidativo que se refleja en la disminución de los niveles de GSH y el consecuente aumento de GSSG.

Así tenemos que si se consume manteca de cerdo en la dieta hay mayor daño provocado posiblemente por la peroxidación lipídica, pudiendo ser ésta la razón del consumo de defensas antioxidantes. Este daño se potencia por consumir etanol en forma aguda.

Por otra parte, el consumir dietas con sebo de res solo provoca la disminución en los valores de GSH e incremento en los de GSSG, cuando son acompañados de la ingesta de etanol.

De tal forma, la variación en la fuente de lípidos de la dieta efectivamente produce un cambio en la relación GSH/GSSG en el hígado de ratas macho a las cuales se les induce estrés oxidativo mediante ingesta aguda de etanol.

9. Perpectivas

Una vez determinado el efecto de las fuentes lipídicas de más uso en México, asociado a la ingesta de etanol, en los niveles de glutatión hepático, podríamos complementar nuestro estudio midiendo los valores de glutatión en sangre o en hepatocitos, aislados auxiliándonos de otras técnicas, como por ejemplo, espectrofotométricas. A su vez, se podría montar una estrategia de experimentación que nos permitiera detectar estrés oxidativo, como podrían ser la determinación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS), determinación de triacilglicéridos (TAGS), o de antioxidantes como las vitaminas, en homogenado de hígado, primero y posteriormente en hepatocitos aislados

10. Comentario final

El origen de muchas enfermedades hepáticas radica en las costumbres alimenticias que se practican según el origen de las personas. En México contamos con el grave problema de la mal nutrición que nos proporciona nuestro ritmo de vida, y debido a una mala educación en la alimentación, tendemos más a consumir comidas rápidas, ricas en grasas y aceites (como la manteca de cerdo y el aceite de maíz, por ejemplo), que como hemos visto, pueden causar graves daños a la salud. Esto no significa que la comida mexicana sea poco recomendable, aunque su preparación tenga como base, en la mayoría de los casos a estas fuentes lipídicas; lo que hay que procurar es no abusar de estos alimentos, pues todo en exceso traerá consecuencias no deseables.

Podríamos decir que lo más recomendable para una dieta sana en las personas alcohólicas sería que estas se constituyeran en base a aceite de cártamo y/o sebo de res, sin embargo, su empleo también acarrea ciertas desventajas para la salud en el sistema cardiovascular.

8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos concluimos que la concentración de glutatión, considerada como principal barrera antioxidante, puede ser modulada, tanto por algunas fuentes de lípidos, como por el consumo de etanol, o ambos, los cuales provocan un estrés oxidativo que se refleja en la disminución de los niveles de GSH y el consecuente aumento de GSSG.

Así tenemos que si se consume manteca de cerdo en la dieta hay mayor daño provocado posiblemente por la peroxidación lipídica, pudiendo ser ésta la razón del consumo de defensas antioxidantes. Este daño se potencia por consumir etanol en forma aguda.

Por otra parte, el consumir dietas con sebo de res solo provoca la disminución en los valores de GSH e incremento en los de GSSG, cuando son acompañados de la ingesta de etanol.

De tal forma, la variación en la fuente de lípidos de la dieta efectivamente produce un cambio en la relación GSH/GSSG en el hígado de ratas macho a las cuales se les induce estrés oxidativo mediante ingesta aguda de etanol.

9. Perpesctivas

Una vez determinado el efecto de las fuentes lipídicas de más uso en México, asociado a la ingesta de etanol, en los niveles de glutatión hepático, podríamos complementar nuestro estudio midiendo los valores de glutatión en sangre o en hepatocitos, aislados auxiliándonos de otras técnicas, como por ejemplo, espectrofotométricas. A su vez, se podría montar una estrategia de experimentación que nos permitiera detectar estrés oxidativo, como podrían ser la determinación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS), determinación de triacilglicéridos (TAGS), o de antioxidantes como las vitaminas, en homogenado de hígado, primero y posteriormente en hepatocitos aislados

10. Comentario final

El origen de muchas enfermedades hepáticas radica en las costumbres alimenticias que se practican según el origen de las personas. En México contamos con el grave problema de la mal nutrición que nos proporciona nuestro ritmo de vida, y debido a una mala educación en la alimentación, tendemos más a consumir comidas rápidas, ricas en grasas y aceites (como la manteca de cerdo y el aceite de maíz, por ejemplo), que como hemos visto, pueden causar graves daños a la salud. Esto no significa que la comida mexicana sea poco recomendable, aunque su preparación tenga como base, en la mayoría de los casos a estas fuentes lipídicas; lo que hay que procurar es no abusar de estos alimentos, pues todo en exceso traerá consecuencias no deseables.

Podríamos decir que lo más recomendable para una dieta sana en las personas alcohólicas sería que estas se constituyeran en base a aceite de cártamo y/o sebo de res, sin embargo, su empleo también acarrea ciertas desventajas para la salud en el sistema cardiovascular.

No podemos borrar de golpe toda una tradición histórica de consumo de alimentos y bebidas en México; sin embargo, es prudente hacer una recomendación: no excederse en el consumo de lípidos, sea cuál fuere su tipo y tener presente que algunos tipos (aceite de maíz y manteca de cerdo) en la dieta de personas que tienen como hábito consumir etanol pueden propiciar o desencadenar una enfermedad hepática.

11. Bibliografía

1. **Akerboon, T.P.M.** y Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology*. 77: 373-382.
 2. **Akerboom, T.P.M.** y Sies, H. (1989). Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods in Enzymology*. 179: 523-533.
 3. **Arias, I.M.** y **Jacoby, W.B.** (1976). GSH: *metabolism and function*. Arias, I.M. y **Jacoby, W.B.** (Eds). Krock Foundation Series. Raven N.Y. U.S.A. Vol. 6. Pag. 1.
 4. **Asensi, M.** y **Sartre J.** (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analítica Biochemistry*. 217 323-328
 5. **Batt, R.D.** (1989). Absorption, distribution and elimination of alcohol . En: *Human metabolism of alcohol*. Crow, K.E. y **Batt, R.D.** (eds). Vol I. Pharmacokinetics, medicolegal aspects, and general interest. CRC Press. Boca Raton. Florida. pp 3-8.
 6. **Bosron, W.F.** **Lumeng, L** y **Li T.K.** (1988). Genetic polymorphisms and susceptibility to alcoholic liver disease. *Mol. Aspects. Med.* 98: 147-158
 7. **Cheng-Jun, L.** **Nanji, A.A.** **Siakotos, A.N.** y **Lin R.C.** (1997). Acetaldehyde-modified and 4-hydroxynonenal-modified proteins in the liver rats with alcoholic liver disease. *Hepatology*. Vol. 26 (3): 12-20.
 8. **Comporti, M.** (1985). Biology of disease. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Inv.* 53. (6): 599-620.
 9. **Consejo Nacional Anti Alcohólico.** (1985). Programa contra el alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas. *Secretaría de Salud. Consejo Nacional Anti Alcohólico e Instituto Nacional de Psiquiatría.*
 10. **Coyle, J.T** y **Puttfarcken, P.** (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. Vol. 262 (29) Octubre: 689-694.
 11. **Creutzfeld, W.** y **Graham, G.R.** (1971). Hemmung des Athanolabbaus durch proteinmangel beim Menschen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 96: 1576-1577.
 12. **Di Guiseppi, J.** y **Fridovich, I.** (1984) The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 12:315-342.
 13. **Doriga, M.** (1993) Historia de la cocina mexicana. **Doriga, M.** y **Yañes J.** (eds.) *Editorial Casa imagen.* México. D.F. 125 páginas.
 14. **Dworkin, B.** **Rosenthal, W.S.** **Jankoski, R.H.** **Gordon, G.G.** y **Haldea, D.** (1985). Low blood selenium levels in alcoholic with and without advanced liver disease. *Dig. Dis. Sci.* 30: 838-844.
 15. **Eder K.** (1999) The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. *Lipids*. Jul.34 (7): 717-25.
 16. **Erick, D.** (1985). Metabolism of xenobiotics: xenobiochemistry. En: *Biochemical basis of medicine*. **Wright Bristol** Editor. Editorial Bristol. Inglaterra. pp 445-465.
 17. **Fita, I.** **Silva, A.M.** **Murthy, M.R.N.** y **Rossmann, M.G.** (1986). The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Acta Cryst.* 42:497-515
 18. **Gonzalez, M.J.** y **Gray Y.** (1992). Lipid peroxidation products are elevated in fish oil even in presence of added anti-oxidants. *J. Nutt.* 122: 2190-2205.
-

- 19 Gonzalez, F.J. (1992) Human cytochromes P450: problems and perospects. *Trends Pharmacol Sci.* 13:346-352.
- 20 Halliwell B. y Guteridge., (1989) Lipid peroxidation. En: *Free radicals in biology and medicine.* Barry Halliwell y Jhon Guteridge (eds). Claredon Press. Oxford. USA 188-204.
- 21 Hassumura Y, Tenshke R, Lieber C., (1976). Characteristic of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chemical* 251:4908-4913.
- 22 Hidezaku, T. y French, S. (1985). Severe and progresive steatosis and local necrosis in rat liver induced by continuous intragastric efusion of ethanol and low fat diet *Hepatology.* 5 (2): 224-232.
- 23 Hidezaku, T. y Tomer, S.J. (1986). Etanol induced liver fibrosis in rat fed hig fat diet. *Hepatology.* 6 (5): 814-822.
- 24 Johansson, I. e Ingelman, S.M. (1988). Bencene metabolism by ethanol-acetone, and bencene inducible citochrome P-450 (HE1) in rat and liver microsomes. *Cancer Res.* 48: 5387-5390
- 25 Johansson, I. e Ingelman, S.M. (1985). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on rabbit liver. *FEBBS Lett.* 183: 265-269.
- 26 Jhon, G.R. y Littleton, J.M. (1980) Membrane lipids and ethanol tolerance in mouse. *Life Sci.* 27: 545-555.
- 27 Jones, A.W. y Alling C. (1983). Tolerance to ethanol in rats bred on essential fatty and acid diets. *Pharmacol Biochem. Behav.* 19: 115-119.
- 28 Kaibula T, y Lindros K., (1975). Effects of long term ethanol treatment on aldehyde and alcohol deshdrogenase activities in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 24:1934-1942.
- 29 Kathrym, E.C. Richard, D Y Batt , L. (1989) *Human metabolism of alcohol.* Vol. 1. CRC. Press Boca Raton Florida. 3-9.
- 30 Kawase, T. Kato, S. y Lieber C.S. (1985). Lipid peroxidation and antioxidant defense sistems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology.* 110: 815-821.
- 31 Kolak-Toker, N. Visal, M. (1985). Influence of acute ethanol administration in hepatic glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in rat. *Pharmacoll. Ress. Commun.* 17(3): 3233-3239.
- 32 Koop, D.R. y Casazza, J.P. (1985) Identification of ethanol inducible P-450 isozyme 3^a as the acetone and acetol monoxigenase of rabbit microsomes. *J. Biol. Chem.* 260:13607-13612
- 33 Koop, D.R. (1989) Minor patways of ethanol methabolism. En: Krow, K.E. y Batt, R.D. (eds). *Human metabolism of alcohol,* Vol II: Regulation, enzimology and metabolites of ethanol. CRC Press. Boca Raton Florida. pp 133-145.
- 34 Korten M, Matzuzaki S, Feinman L, Lieber C., (1975). Hig blood acetaldehyde levels following ethanol administration: diferences between alcoholic and no alcoholic subjets. *N. Engl. J. Med.* 292:386-389.
- 35 Korpera, H. Kumpulainen, J. Louma, P.V. Arranto, A.J. y Sotaniemi, E.A. (1989). Decreased serum selenium in alcoholic as related to liver structure and function. *Am. J Clin. Nutr.* 42: 147-151.
- 36 Kowoser, E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Inter. Rev. Citology.* 54: 109-113

- 37 Kretzchmar, M. y Reinhard, D. (1992). Glutathione homeostasis in rats chronically treated with ethanol. *Exp. Toxic. Pathol.* 44: 344-348.
 - 38 Kuratzo, C. y Ponce, B.C. (1991). Rat colonic anti-oxidants status: interaction of dietary fat with 1,2 dimethylhydrazine challenge. *J. Nutr.* 122: 278-282.
 - 39 Laguna, J. y Piña, G.E. (1988). Química de lípidos. En: *Bioquímica*. Jose Laguna y Enrique Piña Garza (Eds). La prensa Medica Mexicana. México D.F. pp 225-230
 - 40 Laguna, J. y Piña, G.E. (1988). Química de los lípidos. En: *Bioquímica*. Jose Laguna y Enrique Piña Garza (Eds). La prensa Medica Mexicana. México D.F. paginas: 325-358.
 - 41 Lane, B.P. y Lieber, C.S. (1966). Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Amer. J. Pathol.* 49: 593-603.
 - 42 Lange L.G., Bergman, S.G., Sobel, B.E., (1981) Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J. Biol. Chem.* 256: 12968-12973
 - 43 Laposata, L.G. y Lange, L.G., (1986). Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science.* 231: 497-499
 - 44 Lasker, J.M. Raucy, J. y Kubota, S. (1987) Purification and characterization of human liver cytochrome P-450-ALC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 232-238
 - 45 Lasker, J.M. Tsusumi, M. Blockwick, B.P. y Lieber, C.S. (1987). Characterization of benzoflavone-inducible hamster cytochrome P-450 isozyme. *Hepatology.* 7: 432.
 - 46 Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1968). Ethanol oxidation by hepatic microsomes. *Science.* 162: 917-918.
 - 47 Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1970). Hepatic-microsomal-oxidizing system. *J. Biol. Chem.* 245: 2505-2512.
 - 48 Lieber, C. S. (1972). Metabolism of ethanol and alcoholism. Racial and acquired factors. *Ann. Intern. Med.* 76:326-327.
 - 49 Lieber, C.S. (1984). Alcohol and the liver: uptake. *Hepatology.* Vol.4 pp.11243-11260
 - 50 Lieber C.S., (1991). Alcohol induced hepatotoxicity. En: *Hepatotoxicology*. Robert G. Meeck y Steadman D. Harrison (eds). Editorial CRC. USA. pp 481-487
 - 51 Lieber, C.S. (1992) Metabolism of ethanol. En *Medical and nutritional complication of alcoholism. Mechanisms and management*. N.Y.: Plenum Medical Book Co. 1-32.
 - 52 Lieber, C.S. (1994) Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterol.* 106:11085-1105.
 - 53 Massimo D'Aquino, J. y Corcos, B.P. (1991). Effects of fish oil and coconut oil on anti-oxidant defense system and lipid peroxidation on rat liver. *Free Rad. Res. Com.* 12-13: 147-152.
 - 54 Meidani, M. y Natielo, F. (1991). Effects of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *J. Nutr.* 121: 484-21.
 - 55 Meister, A. (1981). On the cycles of glutathione metabolism and transport. *Curr. Top. Cell. Regul.* 18: 21-58
 - 56 Meister, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science.* Vol 220 (29) abril : 472-477.
-

57. **Mezey, E.** Potter, J.J. y Redd, W.D. (1973). Ethanol oxidation by component of liver microsomes rich in citocrome P-450. *J. Biol. Chem.* 252: 7124-7131.
 58. **Miwa, G.T.** Levin, W. Thomas, P.E. y Lu, A. (1978). The direc oxidation of etanol by catalase and ADH-free reconstituted system containing citochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* 1187: 464-475.
 59. **Morgan, E.T.** Koop, D.R. y Coon, J. (1983). Comparision of six rabbit liver Cytochrome 450HJ1 izosimes and acetaminofen. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 112: 8-13.
 60. **Morton, S.** y Mitchell, M.C. (1985). Effects of chronic ethanol feeding on glutathione turnover in the rat. *Biochem Pharmacol.* 34:1559-1563.
 61. **Nanji, A.A.** y French, S.W. (1986). Dietary and alcoholic cirrosis. *Alcoholism: Clinical and Exp. Res.* 10 (3): 271-273.
 62. **Nanji, A.A.** Charles, L. y French, S.W. (1989). Beef fat prevent alcoholic liver disease in rats. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* Vol 13 (1): 131-139.
 63. **Nanji, A.A.** Zakim, D. Rahemtulla, A. Daly, T. Miao, L. Zhao, S. Khwaja, S. Tahan, S.R. y Dannenberg A.J. (1997). Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alfa and reverse fiobrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology.* Vol. 26 (6): 32-37.
 64. **Narro-Robles, J.** Gutiérrez-Avila H. López-Cervantes M. Phill, M. Borges, G. y Rovoski, H. (1992). La mortalidad por cirrosis hepatica en México II: Exceso de la mortalidad y consumo de pulque. *Salud Pública de México.* 34(4)388-403.
 65. **Nebert, D.W.** Nelson, D.R. Adesnick, M. y Coon, M.J. (1989) The P-450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal locy. *DNA Cell Biol.* 10:1-14.
 66. **Nelson, D.R.** Kamataki, T. y Waxman, D.J. (1993). The P-450 superfamily: new secuenses, gene maping and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12:1-51
 67. **Newsholme E.A.** y Leech A.R., (1983). *The oxidation of Acetil-CoA.* En: *Biochemistry for the medical sciences.* Newsholme E.A. y Leech A.R. (Eds.). Editorial Jhon Wiley & Sons. USA. Pag: 155-156
 68. **Nilson M,** y **Belfrage P,** . (1978) Effects of acetate, aldehyde aand ethaanol on lipolisis in isolaated raat adipocites. *J. Lipid. Res.* 19:737-741.
 69. **Nordman, R.** y Ribiere, C. (1992). Implication of free radical mechanisms in ethanol induced celular injury. *Free Rad. Biol. and Med.* 12 :219-240.
 70. **Nuutinen H,** y **Lindros K,**. (1983) Determinants of blood acetaldehyde levels during ethanol oxidation in chronic alcoholics. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 7: 163-168
 71. **Onanohue, T.** Burbije, E.J. (1982). The role of the Ito cells in perivascular and intralobular fibrosis in alcoholic hepatitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 107: 459-463.
 72. **O'Neill L,** **Galvin k,** **Morrissey P.A,** **Buckley D.J.** (1998) Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamine E on the quality of broiler meat and meat products. *Br. Poult Sci.* Jul; 39 (3):365-71.
 73. **Orme-Jhonson, W.** y Ziegler, D.M. (1965) Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver michrosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21: 78-82.
 74. **Oshnishi, K.** y Lieber, C.S. (1977). Reconstitution of MEOS. *J. Biol. Chem.* 252: 7124-7131.
 75. **Palmer K,** y **Jenkins W,**.(1982). Impaired acetaaldehyde oxidaation in alcoholics. *Gut.* 23: 729-733
-

- 76 Papavergou E,J. Ambrosiadis J.A, Psomas J. (1995) Storage stability of cooked sausages containing vegetable oils. *Z. Lebensm Unters Forsh* ; 200 (1) 47-51.
 - 77 Pawloski, R.J. Flynn, B.M. y Norman, S.J. (1997). The effects of low dietary levels of polyunsaturates on alcohol-induced liver disease in Rhesus monkeys. *Hepatology*. Vol 26 (6): 58-66.
 - 78 Pignon, J.P. y Hill C. (1991). Nombre de deces atribuables a l'alcool, en France, en 1985. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 15: 51-56.
 - 79 Piña-Garza, E. García-Saiz, A. y Chagoya de Sánchez, V. (1983). Simposio: "Etanol: catabolismo y efectos metabólicos". *Gaceta Médica de México*. Vol.119 (1): Enero: 1-11.
 - 80 Pryor, W.A. (1986) Oxi-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48:657-667.
 - 81 Pyorala, E. (1990). Trends in alcohol consumption in Spain, Portugal, France and Italy from the 1950's until the 1980's. *Br. J. Addict.* 85: 469-477.
 - 82 Rubin, E. Hutterer, F. y Lieber, C.S. (1968) Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drugs metabolizing enzymes. *Science*. 159: 1469- 1470.
 - 83 Ryan, D.E. Ramathan, L. Lida, S. Thomas, P.E. y Haniu, M. (1985). Characterisation of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by izisianid. *J. Biol. Chem.* 260: 6385-6393.
 - 84 Ryan, D.E. Koop, D.R. Thomas, P.E. Coon, M.J. y Levin, W. (1986). Evidence that izoniasd and ethanol induced the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, and izosime homologous to rabitt liver cytochrome P-450 Izosimes. *Ach. Biochem. Biophys.* 246: 633-644.
 - 85 Sanches, J. y Casas, M. (1988). Effects of oil chronic administration on iron metabolim in the rat. *Eur. J. Hemathol.* 41: 321-325.
 - 86 Secretaria de Salud. (1994). Mortalidad en 1992. Subsecretaria de Coordinacion y Desarrollo. *Dirección General de Estadística, Información y Evaluación*. México. 57 paginas.
 87. Shaw, S. y Jayatilleke, E. (1990).The role of acetaldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochem. J.* 268: 579-583.
 - 88 Sies, H. Kosh, O.R. Martino, E. y Boberis, A. (1979). Incresed biliary glutathion disulfide release in chronicalli ethanol-treated rats. *FEBBS lett.* 103 (287): 3411-3417.
 89. **Sistema Nacional de Encuestas de la Salud.** (1990). Encuesta nacional de adicciones: alcohol. Secretaria de Salud: Direccion General de Epidemiologia e Instituto Mexicano de Psiquiatria (Eds). México. 358 paginas.
 90. Shaw, S. Jayatilleke, E. y Lieber, C.S.(1981). Hepatic lipid peroxidation: potentiation by chronic alcohol feeding and atenuation by methionine. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 417-425.
 91. Skog, O.J. (1988). Interpreting trends in alcohol consumption and alcohol related damage. *Alcohol & Alcohol.* 23: 192-202
 92. Smith, T. DeMaster, E.G. Furne, J.K. y Levitt, M.D. (1992). First-pass gastric mucosal metabolisms of etanol is negligible in the rat. *J. Clin. Invest.* 89: 1801-1806
-

93. **Song, B.J.** Helboing, H.B. Park, S.S. y Gonsalez, F.J. (1986). Complementary DNA and protein sequences of ethanol inducible rat and human cytochrome P450's. *J. Biol. Chem.* 261: 16689-16697.
 94. **Souza y Machorro, M.** (1988). Alcoholismo: conceptos basicos. *El manual moderno*. Mexico. 212 paginas.
 95. **Speisky, H.** MacDonald, A. Giles, G. Orrego, H. Gunasenkara, A. e Israel, Y. (1985). Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem. J.* 225: 565-572.
 96. **Stinson, F.S.** y DeBarkey, S.M. (1992). Alcohol related mortality in U.S.A. 1979-1988. *BR. J. Addict.* 87: 777-783.
 97. **Tanner, A.R.** Bantock, I. Hinks, L. Lloyd, B. Turner, N.L. y Wrigth, L. (1985). Depressed selenium and vitamin E levels in alcoholic population: posible relationship to hepatic injury through increased lipid peroxidation. *Dig. Dis. Sci.* 30: 838-844.
 98. **Teschke, R.** Hassumura, Y. Joli, J.G. y Lieber, C.S. (1972). Microsomaal ethanol oxidising sistem (MEOS). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49:1189-1193.
 99. **Teschke, R.** y Guellert, J. (1986). Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): metabolic aspects and clinical implications. *Alcoholism: clin. Exp. Res.* 10: 20-27.
 100. **Trible, D.L.** Au, T. y Jones D.P. (1987). The pathologic significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology.* 7: 377-389.
 101. **Vandemiale, G.** Jayatilleyeke, E. Shaw, S. y Liever C.S. (1984). Depression of biliary glutathion excretion by chronic ethanol feeding in the rat. *Life Sci.* 34:1065-1073.
 102. **Videla, A.** y Valenzuela, A. (1982). Alcohol ingestion liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interactions and pathologic implications. *Life Sci.* 31: 2395-2407
 103. **Videla, L.A.** (1985). Citotoxicidad de xenobioticos: un problema metabolico. *Boletin de Educacion Biomedica.* 4: 34.
 104. **Watson, P.E.** (1989). Total body water and blood alcohol levels: updating the fundamentals. En: *Human metabolism of alcohol.* Crow, K.E. y Batt, R.D. (eds). Vol 1. Pharmacokinetics, medicolegal aspects, and general interest. CRC Press. Boca Raton Florida. pp 41-56.
 105. **Winkler K, Lumquist F, Typstrup N.** (1969) The hepatic metaabolism of ethanol in patients whit cirrosis of the liver. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 23: 59-69
 106. **Wisan, W.** y Ung-Soo, L. (1997). Oxidative stress and status in mause liver; effects of dietary lipid, Vitamine E and iron. *J. Nutt.* 127: 1401-1406.
 107. **Yang, C.S.** Tu, Y. Koop, D.R. y Coon, M.J. (1985). Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 izosimes. *Cancer Res.* 45:1140-1145.
 108. **Yañes, J.L.** Del Rio, M.C. y Alvarez F.J. (1993). Alcohol-related mortality in Spain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17. 253-255.
 109. **Zentella de Piña, M.** y Piña-Garza, E. (1987). Metabolitos del etanol. En *Mensaje bioquímico.* Saldaña, Y. y Fernandez, L. (eds) Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autonoma de México. pp 143-176.
-

110. **Zentella de Piña, M. Corona, G.S. y Saldaña, B.Y.** (1994). Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *Boletín de Educación Bioquímica (BEB)*. Septiembre. 13 (3): 87-93.
-

Anexo I: Principios de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Componentes de un cromatógrafo de líquidos.

Los componentes esenciales encontrados en un cromatógrafo de HPLC incluyen: una bomba, inyector, columna, detector y registrador. La columna esta considerada el corazón del sistema, la cual se encuentra rellena de la fase estacionaria compuesta por partículas del tamaño de micras (10 a 6 μ), para lo cual es necesario una bomba de alta presión, para transportar la fase móvil a través de la columna.

La separación ocurre al bombear la fase móvil y el soluto a través de la columna, cada compuesto que eluye de la columna es detectado, ya sea por un detector universal o selectivo, dependiendo de las propiedades del componente a medir.

Ventajas del método.

La cromatografía de líquidos de alta resolución puede ser considerada como complementaria a la cromatografía de gases.

Para aquellos materiales que son termolabiles o no volátiles, HPLC es la selección, mas recomendable, pues ofrece las siguientes ventajas sobre la cromatografía de líquidos: rapidez, resolución, sensibilidad, columnas reutilizables, ideal para moléculas grandes y especies iónicas, muestras fáciles de recuperar, etc.

Tipos de cromatografía

Según el tipo de interacción existente entre los solutos a separar y el lecho cromatográfico, podemos clasificar los procesos en:

cromatografía de absorción, partición, de intercambio ionico, de fases químicamente unidas, y de exclusión. Todos estos fenómenos coexisten simultáneamente, si bien la distinta presencia de uno y de otro mecanismo de interacción vendrá básicamente determinada por la naturaleza y composición del eluyente.

Cromatografía en fase normal.

En este caso el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil es apolar. Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos de retención mayores que los materiales menos polares o apolares. Es decir, que el orden de elucion de los solutos, será proporcional directamente a su polaridad, donde los primeros en eluirse serán los menos polares y los mas polares serán los mas retenidos.

Cromatografía de fase reversa.

Es el proceso inverso a la fase normal, en el cual el lecho estacionario, es de naturaleza apolar (superficie modificada), mientras que la fase móvil es un líquido polar; cuanto mas polar sea la muestra mayor será su retención.

Métodos de la cromatografía.

- Cromatografía de intercambio iónico: retención por unión iónica reversible a grupos cargados de la fase estacionaria.
- Cromatografía de exclusión: retardo de moléculas pequeñas al pasar a los poros, exclusión estérica de moléculas mayores.
- Cromatografía de pares iónicos: moléculas iónicas de la prueba se unen por medio de un enlace iónico al reactivo de pares iónicos el cuál posee una parte de molécula apolar que puede actuar con la cadena carbonada apolar de la fase estacionaria.
- Cromatografía de fase reversa: retardo por interacción de la cadena apolar hidrocarbonada de la fase estacionaria con partes apolares de las moléculas a prueba.
- Cromatografía de afinidad: biomoléculas ligan con sus substratos específicos o ligandos inmovilizados, los cuales ajustan únicamente en una posición altamente específica en o sobre la molécula.

Anexo II: Dietas experimentales empleadas.

Ingredientes	Inclusión (%)
Caseína	25
Almidón	13
Azúcar glass	41.75
Salvado	4
Lípidos*	5
DL-metionina	0.15
Minerales	0.05
Vitaminas	0.50
Colina	1.50
Carbonato de calcio	0.27
Ortofosfato	2
Cloruro de sodio	0.30
Vehículo	6.45
Total	100

- Aceite de maíz, aceite de cártamo, sebo de res o manteca de cerdo.