

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS · IZTACALA

INFLUENCIA DE LOS LIPIDOS DE LA DIETA SOBRE
LA DEFENSA ANTIOXIDANTE EN EL HEPATOCITO
AISLADO DE RATA

T E S I S

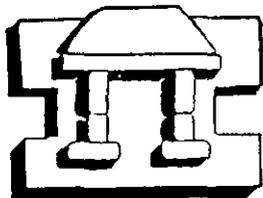
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

NORA MONSERRAT ALARCON

ASESORA: M. en C. IVONNE CABALLERO CRUZ



IZTACALA

MEXICO, D. F.

ENERO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Este trabajo se elaboró en el Laboratorio 5 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, con el apoyo de DGAPA clave

Muchas gracias al Dr. Andrés Castell del departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina por su colaboración en la realización de los cortes histológicos.

Quiero agradecer todas sus enseñanzas, apoyo, amistad y entusiasmo por la investigación a mi asesora M. en C. Ivonne Caballero Cruz con todo mi reconocimiento GRACIAS.

También agradezco a la Dra. Martha Zentella de Piña y al Dr. Enrique Piña Garza por su gran apoyo al permitirme realizar este trabajo en su laboratorio

A mi invaluable amigo Adrian por su valiosa amistad, apoyo, consejos y compañía en la realización de esta tesis.

*A Héctor por su, apoyo y amistad que me ha brindando.
A Enrique , por su gran apoyo y amistad.
A la Dra. Yolanda por su gran poyo y amistad.*

AGRADECIMIENTOS

A mi MAMACITA, la cual admiro y quiero con todo mi corazón, por su gran esfuerzo y amor que me ha permitido llegar ha esta meta.

A VERITO mi cuata, por su cariño, que siempre cuento con ella gracias.

A LETY por su cariño y ejemplo ante los retos de la vida, te quiero mucho.

A mi hermano ARTURO quien originó en mi el interés por la ciencia, te queremos.

A GREGORIO GIL por su maravilloso amor y su valiosísimo apoyo, que siempre me da fuerzas para seguir adelante te amo vida mía.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
RESUMEN	III
I. INTRODUCCIÓN	
1.1. BIOQUÍMICA DE LOS LÍPIDOS.	1
1.1.2 ÁCIDOS GRASOS.	2
1.1.3 LOS TRIACÍLGLICEROLES.	4
1.2 LOS LÍPIDOS EN LA DIETA.	5
1.3 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS.	5
1.3.2 β OXIDACIÓN.	6
1.4 EL ETANOL.	7
1.4.1 METABOLISMO DEL ETANOL	7
1.4.2 OXIDACIÓN DEL ETANOL.	8
1.4.3 OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA DEL ETANOL.	11
1.4.4 VÍA OXIDATIVA DEL ETANOL.	12
1.4.5 OXIDACIÓN DEL DE ACETALDEHÍDO.	13
1.4.6.1. ALDEHÍDO DESHIDROGENASA.	14
1.4.6.2. ALDEHIDO OXIDASA.	16
1.4.6.3. SISTEMA OXIDANTE DEL ACETALDEHÍDO (MAOS).	16
1.5 RADICALES LIBRES.	17
1.6 TENSIÓN OXIDATIVA.	20

1.7 PROCESO DE LIPOPEROXIDACIÓN.	21
1.8 LOS ANTIOXIDANTES.	23
1.9 EL GLUTATIÓN.	26
II. ANTECEDENTES.	30
III. HIPÓTESIS.	36
IV. OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVO ESPECÍFICO.	37
V. MATERIAL Y METODOS.	38
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HEPATOCITOS.	38
DETERMINACIÓN DE PESO HÚMEDO.	39
INCUBACIÓN DE LOS HEPATOCITOS.	39
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.	40
DETERMINACIÓN TRIACÍLGLICEROLES (TAGs).	40
DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITURICO(SRATB).	41
DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GT).	42
HISTOPATOLOGÍA.	43
VI. RESULTADOS.	44
GRAFICO 1. TAGs EN HEPATOCITOS AISLADOS.	45
GRAFICO 2. SRATB EN HEPATOCITOS AISLADOS.	47
GRAFICO 3. GT EN HEPATOCITOS AISLADOS.	49
GRAFICO 4. CORRELACIÓN ENTRE GLUTATIÓN TOTAL	

Y SRATB EN HEPATOCITOS AISLADOS INCUBADOS	
CON ETANOL.	50
GRAFICO 5. CORRELACIÓN ENTRE SRATB Y EL CONTENIDO	
DE ÁCIDO LINOLEICO EN LAS DIFERENTES	
FUENTES DE LÍPIDOS.	51
CORTES HISTOLOGICOS.	52
VII. ANÁLISIS Y DISCUSION.	54
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. BIBLIOGRAFIA.	63
APENDICE I.	75
APÉNDICE I.	76
APÉNDICE III.	77
APÉNDICE IV.	78

LISTA DE FIGURAS

- Fig-1. Estructura de los ácidos grasos a) saturados y b) insaturados.
- Fig-2. Estructura química del glicerol y una molécula de triacilglicerol .
- Fig-3. Obtención de energía a partir de la β -oxidación.
- Fig-4. Metabolismo del hepatocito.
- Fig-5. Reacción catalizada por ADH.
- Fig-6. Reacción catalizada por MEOS.
- Fig-7. a) Descomposición de peróxidos por la catalasa, b) oxidación del etanol en presencia de peróxidos de hidrógeno y peróxidos orgánicos.
- Fig-8. Oxidación no enzimática del etanol.
- Fig-9. Formación de ésteres etílicos de ácidos grasos.
- Fig-10. Reacción catalizada por acción de la aldehído deshidrogenasa.
- Fig-11. Reacción catalizada por la aldehído oxidasa.
- Fig-12. Vía oxidativa del acetaldehído catalizada por el MAOS.
- Fig-13. Proceso de lipoperoxidación.
- Fig-14. Acción de glutatión reductasa en eritrocito, previenen la acumulación de peróxidos y de lípidos peroxidados.
- Fig-15 Estructura química del glutatión: γ -glutamil-cisteinil-glicina (1) Tioil cisteinil (2) peptido γ - glutamil.
- Fig-16. Síntesis del glutatión.
- Fig-17. Representación esquemática del flujo de GSH, GSSG, y glutatión S-conjugados tomados de Akerboom. 1989 y Meister, 1983 modificado por Alarcón, 2000.

Fig-18. Reacción en la determinación de SRAT.

Fig-19. Reacción de reducción del DTNB, por el NADPH.

Fig-20. Corte histológico del hígado de rata, que recibió como fuente de lípidos sebo de res, presenta esteatosis moderada o ausente (20X).

Fig-21 Corte histológico del hígado de rata que recibió una dieta con aceite de maíz, presenta esteatosis periportal univesicular (20X).

Fig-22. Corte histológico del hígado de rata que recibió como fuente de lípidos manteca de cerdo, presenta esteatosis moderada a severa (20 X).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características químicas de los lípidos.

Tabla 2. Clasificación de los lípidos.

Tabla 3. Características químicas del etanol.

Tabla 4. Sitios de producción de los radicales libres.

Tabla 5. Funciones de los radicales libres.

Tabla 6. Vida media de los radicales libres.

Tabla 7. Compuestos celulares alterados por acción de los radicales libres del oxígeno.

Tabla 8. Participación de los radicales libres en enfermedades.

RESUMEN

NORA MONSERRAT ALARCÓN. Influencia de los lípidos de la dieta sobre la defensa antioxidante en el hepatocito aislado de rata. (Asesora M. en C. Ivonne Caballero Cruz).

La tensión oxidativa producida por el consumo de etanol, ha revelado una reducción en el contenido de glutatión total en el hígado, el mecanismo más importante relacionado con este daño celular es la peroxidación de los lípidos, donde los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles, esto conduce a la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB), que sirven como indicador de daño celular por radicales libres. Los triacilgliceroles (TAGs) hepáticos se elevan también por acción del etanol. Proponemos que el porcentaje de ácidos grasos como el oleico y linoleico de los lípidos de la dieta normolipídica, promueven la tensión oxidativa y no así los ácidos grasos saturados como el palmítico y esteárico.

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar, con destete tardío de 120-150g de peso, que recibieron una dieta (AIN76) controlada de (15g/Kg/día), por 40 días de tratamiento, donde la fuente de lípidos fue, manteca de cerdo, sebo de res y aceite de maíz que difieren en su contenido de ácidos grasos, los indicadores analizados fueron: proteína, TAGs, SRATB, y el glutatión total (GT) de los hepatocitos aislados incubados con etanol o lactato 50mM. Se realizaron cortes histológicos de los hígados de las ratas experimentales teñidos con hematoxilina y eosina. Las muestras de hepatocitos fueron obtenidas por el método de *Berry and Fried 1969*, la proteína por el método de *Bradford, 1976*, los triacilglicéridos por *Gottfried y Roserberg 1973*, las SRATB por *Zentella y cols; 1993*, y el glutatión como lo describe *Akerboom y cols; 1989*.

Los lípidos de la dieta modifican el daño celular promovido por agentes tóxicos como el etanol. El alcohol estimula la lipoperoxidación, lo cual se magnifica con el consumo de grasas insaturadas. La combinación de etanol y una dieta con alto contenido de ácido linoleico (aceite de maíz) promueve el aumento de triacilgliceroles en hepatocitos aislados. Las dietas normolipídicas con sebo de res mantienen las reservas antioxidantes, en hepatocitos aislados sometidos a una tensión oxidativa.

La histología mostró que los hígados de ratas alimentadas con las dietas normoproteicas controladas sin ser sometidos a una tensión oxidativa presentan diferente grado de esteatosis en función a la fuente de lípidos consumidos en donde existió esteatosis moderada a severa en con manteca de cerdo, moderada con aceite de maíz y esteatosis ausente con sebo de res.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOQUÍMICA DE LOS LÍPIDOS.

Los lípidos son un grupo de compuestos heterogéneos presentes en todos los seres vivos, sus características principales se presentan en la Tabla 1 (Murray y cols; 1998) y la clasificación en la Tabla 2 (Laguna – Piña, 1991).

Tabla 1. Características químicas de los lípidos.

CARACTERÍSTICAS DE LOS LÍPIDOS

Moléculas hidrofóbicas o alifáticas.
Son altamente reducidas y con muy poco oxígeno.
Pueden aportar 9.1 kcal/gramo
Son mensajeros (esteroides).
Sirven como reserva de energía.
Amortiguadores físicos y aislantes de temperatura.
Moléculas estructurales (asociados a proteínas y carbohidratos) en la composición de membranas celulares.

Tabla 2. Clasificación de los lípidos

CLASIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS

Lípidos simples: están formados por esterés de ácidos grasos y algún tipo de alcohol, como son los acilglicéridos, que son, resultantes de la unión del trialcohol glicerol con una, dos o tres moléculas de ácidos grasos (triacilglicéridos) y por otra parte se encuentran las ceras.

Lípidos compuestos: tienen en su molécula además de alcohol y ácido graso, ácido fosfórico y otro alcohol muchas veces aminado, se les llama fosfolípidos (entre ellos están las lecitinas, cefalina, fosfatidil inositidas, plasmálogenos, esfingomielinas, gangliósidos, sulfolípidos, y las lipoproteínas).

Lípidos derivados: sustancias obtenidas por hidrólisis.

Sustancias asociadas a los lípidos: extraíbles con solventes orgánicos (terpenos, carotenos, naftoquinonas vit K, tocoferoles vit E y serie de esteroides, ácidos biliares, hormonas corticales y sexuales etc.

1.1.2. ÁCIDOS GRASOS.

Entre los lípidos simples se encuentran los ácidos grasos que presentan una larga cadena hidrocarbonada sin ramificaciones, con un grupo terminal carboxílico. Su función fisiológica es muy importante, ya que actúan como: 1) Componentes de fosfolípidos y glicolípidos, 2) Modificadores lipofílicos de las proteínas, 3) Moléculas combustibles, 4) Hormonas mensajeras intracelulares.

En la mayoría de los seres vivos, los ácidos grasos contienen un número par de átomos de carbono, generalmente entre 14 y 24; los más frecuentes son los de 16 a 18 carbonos, sin presentar ramificaciones, y pueden ser insaturados o saturados, estos últimos tienen dobles enlaces en su estructura, la configuración de los dobles enlaces en la mayoría de los ácidos grasos insaturados es de tipo *cis*.

Entre los ácidos grasos saturados predomina el ácido palmítico 16:0 y el ácido esteárico 18:0, entre los insaturados el ácido oleico 18:1 y entre los ácidos poliinsaturados están el ácido araquidónico 20:4. Al ácido linoleico 18:2, y ácido linolenico 18:3 se les conoce como ácidos grasos indispensables porque no pueden ser sintetizados por el organismo (*Stryer, 1981*).

Los ácidos grasos saturados corresponden a la fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$; todos tiene una cadena de carbonos unidos entre sí por una sola valencia, la cual deja libre las valencias restantes para los hidrógenos correspondientes. Si entre 2 carbonos adyacentes, existen 2 hidrógenos, se establece un sitio de insaturación o una doble ligadura formándose así un ácido graso insaturado. (Fig-1)

Las propiedades físicas de los ácidos grasos y de los compuestos que los contienen están determinadas en gran parte por la longitud y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada.

Cuando más larga sea la cadena grasa y menor el número de dobles enlaces, menor es la solubilidad de los ácidos grasos en agua. Los ácidos grasos saturados desde 12:0 a 24:0 tienen una consistencia ceréa, mientras que los ácidos grasos insaturados de estas longitudes son líquidos oleosos. Los puntos de fusión de los ácidos grasos aumentan, si la longitud de carbonos se alarga y disminuye de acuerdo con el número de insaturaciones. Los ácidos poliinsaturados pueden conservarse líquidos, a temperatura relativamente baja.

Los diacilgliceroles y triacilgliceroles son altamente insolubles en agua, mientras que los monoacilglicéridos, por su carácter anfipático, llegan a dispersarse formando agregados.

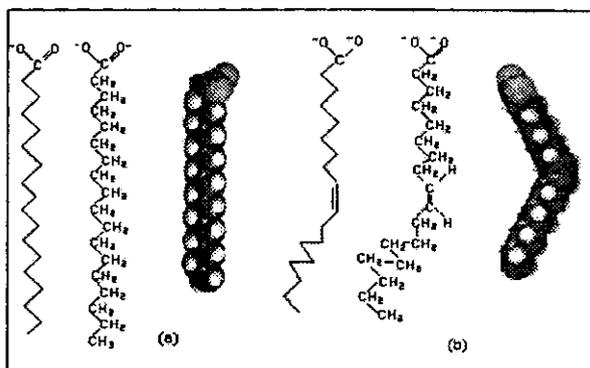


Fig-1. Estructura de los ácidos grasos a) saturado y b) insaturado (Lehninger, 1993).

1.1.3. LOS TRIACÍLGLICEROS (TAGs).

Los ácidos grasos se almacenan como triacilgliceroles y se les conoce también como grasas neutras o triacilgliceroles (Fig-2). Son ésteres del alcohol glicerol y ácidos grasos. El glicerol es formado en las células, a partir de la dihidroxiacetona fosfato que al ser reducida con NADH, se convierte en glicerolfosfato, ésta forma se utiliza en la síntesis de diversos lípidos.

Los triacilgliceroles son depósitos de energía metabólica muy concentrada, debido a que se encuentran en forma reducida y anhídrica por lo que estas moléculas se conocen como el principal reservorio de energía en la célula animal, los triacilgliceroles se acumulan principalmente en el citoplasma de las células adiposas, éstas células están especializadas en la síntesis y almacenamiento y movilización de los triacilgliceroles como moléculas combustibles. La oxidación completa de un ácido graso rinde 9.1 Kcal/g a diferencia de las 3.94 kcal/g que se obtienen de los carbohidratos y 3.12 kcal/g de las proteínas. (Laguna y Piña, 1991).

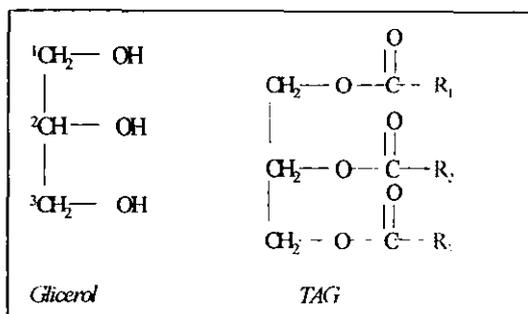


Fig- 2. Estructura química de una molécula de triacilglicerol .

1.2. LOS LÍPIDOS EN LA DIETA.

Los lípidos de la dieta juegan un importante papel en la nutrición.

El consumo diario de grasas en las comunidades industrializadas es aproximadamente de 100 g/día, los cuales aportan del 40 al 45 % de las calorías totales de la dieta. Alrededor de un tercio de ellas proviene de la carne, otro tercio de los productos grasos propiamente dichos (aceite, mantequilla y margarina), un quinto de productos lácteos y el resto de una variedad de productos manufacturados o naturales (frutos secos, chocolates, pastelería).

1.3. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS.

El hígado es el órgano que regula la síntesis y utilización de las grasas además de intervenir en la síntesis de colesterol, fosfolípidos, o bien en la formación de ácidos grasos a partir de los cuales se obtiene *energía* (Murray y cols;1988).

Aproximadamente el 40% de ácidos grasos que se emplean para la obtención de energía se desdoblan primeramente en el hígado, en forma de ácido acetoacético, el cual difunde rápidamente a través de la membrana celular transportándose a toda la sangre del cuerpo para ser oxidado en la mitocondria de manera similar a la glucosa. Para esto es necesaria la degradación de los triacilgliceroles por medio de las lipasas, de esta manera se forma una molécula de glicerol y tres ácidos grasos (Lehninger, 1993 y Strayer, 1981).

La oxidación de los ácidos grasos es un proceso que se realiza en la mitocondria, que requiere una activación que se realiza en la membrana externa de la mitocondria en presencia de acil-CoA sintetasa.

1.3.1. β Oxidación

La principal vía catabólica de los ácidos grasos se denomina β Oxidación, en ella se liberan unidades secuenciales de dos átomos de carbono, los acil-CoA se degradan mediante una secuencia repetitiva de 4 reacciones: 1) oxidación ligada a flavina adenina dinucleótido (FAD), 2) hidratación, 3) oxidación ligada al NAD^+ y 4) tiolisis por CoA., como resultado de estas reacciones, la cadena del ácido graso se acorta en dos átomos de carbono y se genera FADH_2 , NADH y acetil-CoA.

Cuando cada NADH es oxidado en la cadena respiratoria se genera 2.5 ATPs, por cada FADH_2 se forman 1.5 ATPs (entra a nivel del ubiquinol). Y la oxidación del Acetil CoA en el ciclo del ácido cítrico produce 10 ATP (Fig-3.)

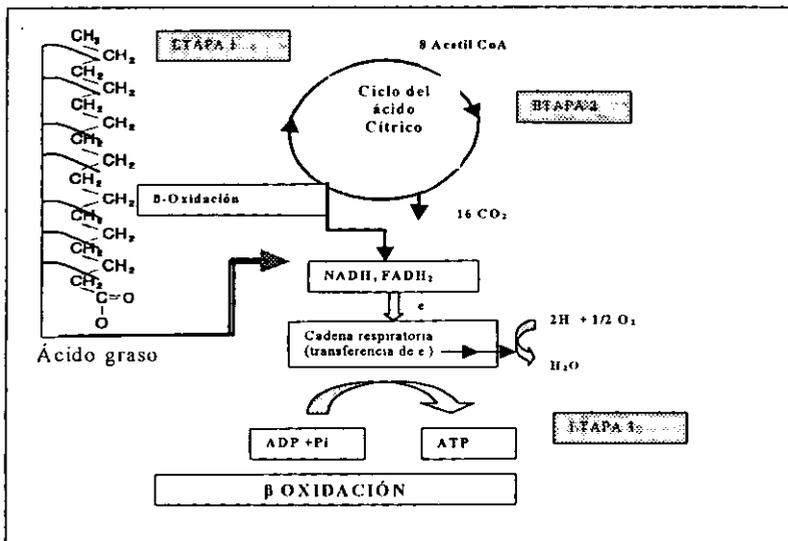


Fig-3. Obtención de energía a partir de la β oxidación.

1.4. EL ETANOL.

El término alcohol es usado invariablemente como etanol, alcohol etílico, alcohol absoluto, alcohol deshidratado, hidrato etílico, alcohol anhidro e hidroxido etílico. Su fórmula química es: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ y se produce a partir de otros alcoholes o sustancias que pueden originarlo, ej. Metanol CH_3OH ; y butanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ y sus principales características se encuentran descritas en la (Tabla 3) (*Merck index 1989*)

Tabla 3. Características químicas de etanol.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ALCOHOL

Fórmula $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$.

Peso molecular bajo 46.06 g mol^{-1} .

Líquido temperatura ambiente, volátil.

El 90 % es metabolizado por el hígado.

Soluble en agua, cloroformo y acetona.

Fuente sustancial de energía y puede aportar 7.1 Kcal/g (*Lieber 1995*)

El etanol se ha descrito como una sustancia liposoluble, lo que es falso sin embargo por su tamaño pequeño, es capaz de atravesar libremente la bicapa lipídica de la membrana y pasar por difusión pasiva (*Kricka y cols, 1979 y Zentella y cols; 1993*)

1.4.1. Metabolismo del Etanol

El metabolismo del alcohol incluye las siguientes etapas: ingestión, digestión, absorción, distribución en el organismo, metabolismo propiamente dicho, eliminación del etanol no degradado y de sus productos de oxidación (*Pardo, 1998*).

1) Deshidrogenasa alcohólica (ADH). Es un complejo enzimático localizado en el citosol de la célula, es la principal enzima responsable de oxidación *in vivo* del etanol a acetaldehído. Esta reacción requiere la presencia de la coenzima NAD⁺ (nicotin adenin dinucleótido oxidado) el cual será reducido a NADH + H⁺ (nicotin adenin dinucleótido reducido). Esta reacción es catalizada por la alcohol deshidrogenasa (Fig- 5).

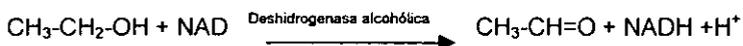


Fig- 5.Reacción catalizada por ADH

La ADH pertenece a la familia de las alcohol deshidrogenasas que presentan gran variedad de isoenzimas. Las ADH y sus enzimas son codificadas por más de siete genes diferentes (*Danielsson y cols; 1994*)

La ADH es de estructura dimerica con subunidades de aproximadamente 40 kDa y en cada subunidad hay 2 átomos de zinc unidos por cisteína que ayudan a estabilizar la estructura. Uno de los átomos de zinc forma parte del sitio activo. La ADH existe en todos los tejidos del cuerpo pero con diferente actividad (*Boleda, 1989*).

Se sabe que en los bebedores consuetudinarios aumenta su tolerancia al etanol acelerando su depuración sanguínea, y que la enzima deshidrogenasa alcohólica llega a disminuir su capacidad en respuesta al consumo exagerado o crónico del etanol.

2) El sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS). Se localiza en los microsomas, del retículo endoplasmático con la presencia del citocromo P-450. Esta vía oxidativa requiere también de NADPH (nicotín adenin dinucleótido reducido) y la reducción de una molécula de oxígeno, formando H₂O₂. Existen diferentes tipos de citocromos, pero el más eficiente para oxidar el etanol es el P 450 2E1 (CYP 2E1), que (*Nelson y cols; 1993*) puede oxidar también al butanol o pentano, y otros xenobióticos como: el acetaminofen, acetona y tetracloruro de carbono. Este citocromo posee actividad importante solo cuando la concentración de etanol es alta en individuos no alcohólicos (intoxicación aguda) ya que su afinidad por el etanol es baja con una Km de 8 -10 mM (*Lieber, 1994*)

A través del MEOS también se oxidan otros alcoholes de cadena larga, dando como resultado la formación de acetaldehído, NADP y H₂O₂ (Fig-6).

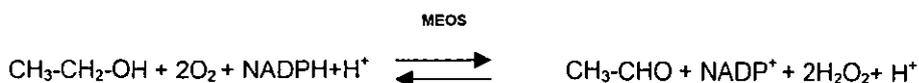


Fig-6. Reacción catalizada por MEOS.

La mayor actividad del MEOS es conferida por la exposición prolongada del etanol que conlleva a un aumento en el metabolismo de diferentes drogas, con un descenso en su vida media, así como al aumento en la producción de metabolitos tóxicos generados a partir de ciertas drogas (*Riveros y cols; 1997*).

3) El tercer sistema es el de la catalasa. La catalasa se encuentra en los peroxisomas de las células hepáticas, es una proteína oligomérica de 4 subunidades (60 kDa c/u) de arreglo tetraédrico. Cada subunidad funciona de

forma independiente y presenta como grupo prostético un protoporfirina férrica IX y una molécula de NADP^+ (Fita y cols; 1986).

Actúa descomponiendo peróxidos de hidrógeno en el proceso de oxidación del etanol, la principal limitante en la actividad de esta enzima es la presencia de peróxidos, por lo que su participación en la oxidación etílica es muy reducida (Fig-7)(Lieber, 1994)

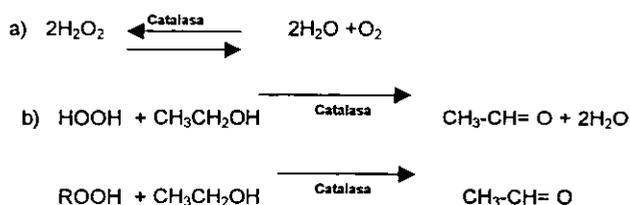


Fig-7. a) Descomposición de peróxidos por la catalasa, b) oxidación del etanol en presencia de peróxidos de hidrógeno y peróxidos orgánicos.

Algunas alteraciones bioquímicas que limitan la oxidación del etanol son el gasto de moléculas de NAD y H_2O_2 .

1.4.3. Oxidación no enzimática del etanol.

Esta oxidación se ha observado *in vitro*. La oxidación no enzimática depende de la presencia de quelatos de fierro y de la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Estos hidroxilos reaccionan con el etanol espontáneamente para formar agua y radicales alcohoxilo, el cual reacciona rápidamente con oxígeno, para formar acetaldehído más un ion superóxido protonado (HO_2^{\cdot}). El etanol es un excelente atrapador de radicales hidroxilo, por lo que una limitante de la reacción es la presencia de radicales libres hidroxilo. La presencia de radicales hidroxilo depende de la presencia de quelatos de fierro, un sistema reductor, y la

disponibilidad de peróxido de hidrógeno (Kathrym y cols; 1989).

Por lo que las reacciones que producen peróxidos de hidrógeno o ion superóxido promueven la oxidación no enzimática del etanol (Igelman y cols; 1984)

La oxidación no enzimática pudiera ser poco significativa, debido a que los complejos orgánicos de hierro son poco eficientes para oxidar el etanol, sin embargo la generación de RL a partir de la oxidación etílica explica el daño a los tejidos por el etanol (Fig-8).

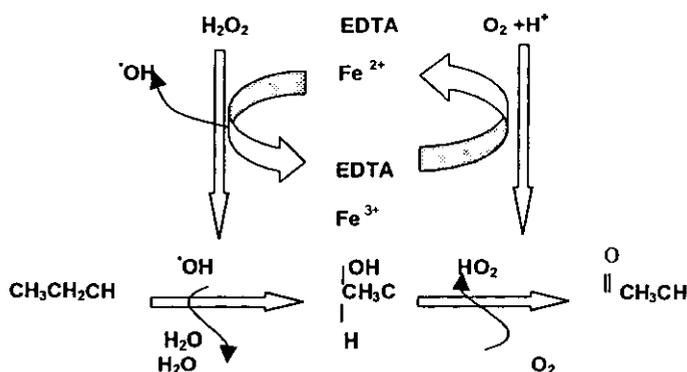


Fig-8. Oxidación no enzimática del etanol.

1.4.4. Via oxidativa del etanol

El etanol puede formar etil ésteres *in vivo* por medio de la sintetasa de ésteres etílicos de ácidos grasos (SEEAG), esta enzima es dimérica de 50 KDa, que no requiere de CoA ni de ATP para que se lleve a cabo la reacción. Su participación en el metabolismo etílico es poco significativo, sin embargo la presencia de ésteres etílico de ácidos grasos (Fig-9) en los tejidos antes

mencionados muestran que la ingesta crónica del etanol causa daños en órganos que no lo oxidan eficientemente (*Lieber 1994; Laposta y cols; 1986*).



Fig-9. Formación de ésteres etílicos de ácidos grasos. R= cadena hidrocarbonada.

Se ha reportado que en individuos intoxicados de forma aguda con etanol se presentan altas concentraciones de etilésteres de ácidos grasos en páncreas, hígado, corazón y tejido adiposo (*Laposta y Lange, 1986*).

1.4.5. Oxidación del Acetaldehído.

El acetaldehído es también llamado etanal, aldehído acético y etilaldehído. Su fórmula química condensada es $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, y su peso molecular es 44.05, en humanos el acetaldehído ejerce efectos narcóticos, y a grandes dosis puede causar la muerte por parálisis respiratoria (*Merck index, 1989*) ésta molécula es 10 a 30 veces más tóxica que el etanol, su toxicidad se relaciona con su capacidad de unirse covalentemente (forma aductos) con los fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Por lo que puede inactivar diversas moléculas biológicas, además de causar lipoperoxidación por dos mecanismos; 1) estimulando la producción de radicales libres y 2) uniéndose a la cisteína y al glutatión, contribuyendo en ambos casos a la disminución del glutatión (*Viña y cols; 1978*)

De todas las moléculas formadas a partir del etanol, el acetaldehído es el producto común resultante de las tres vías enzimáticas que oxidan al etanol, y a la

que se le han atribuido los efectos tóxicos asociados al consumo del etanol .

Un dato que orientó sobre las potencialidades del acetaldehído como tóxico importante se refiere a las manifestaciones registradas en individuos normales al recibir inhibidores de la deshidrogenasa aldehídica, como el disulfuran, algunos de los signos y síntomas ocasionados por el aumento en los niveles de acetaldehído son: fuerte enrojecimiento facial, taquicardia, hipotensión, dolor de cabeza, vómito, náuseas, debilidad muscular, y somnolencia, entre otros. La intensidad del cuadro depende de la concentración sérica del acetaldehído y es tan molesto que puede llegar a crear aversión al etanol (*Fernández y Videla , 1980*).

El acetaldehído producto de la oxidación etílica es metabolizado por la aldehído deshidrogenasa, la aldehído oxidasa y el sistema microsomal oxidante del acetaldehído (MAOS).

1.4.6.1. Aldehído deshidrogenasa (ALDH).

La degradación del acetaldehído a acetato, se realiza en una reacción catalizada por aldehído deshidrogenasa hasta un 90 %, tiene como cofactor al NAD^+ , durante la oxidación del acetaldehído sucede la transferencia de hidrógeno del sustrato al cofactor, resultando su reducción a NADH^+ (Fig-10).

Otras enzimas como las flavoproteínas aldehído oxidasa y la xantina-oxidasa, también son capaces de catalizar la oxidación del acetaldehído, pero estas enzimas son bastante inespecíficas para el sustrato y muestran muy baja afinidad por el acetaldehído (*Zentella y cols; 1992b y 1993*).

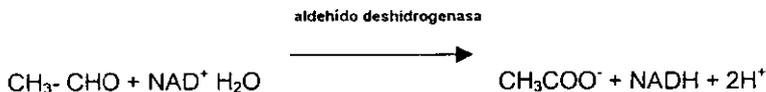


Fig-10. Reacción de catalizada por acción de la aldehído deshidrogenasa.

Algunos efectos del acetaldehído son antagónicos a los efectos directos del etanol: el acetaldehído permite la liberación de catecolaminas y contrarresta algunos efectos sedantes del etanol, también esta molécula, produce a nivel de las mitocondrias del hígado de rata, una inhibición del sitio I de la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa. (*Lehninger, 1993*).

Para que el acetato producido por aldehído deshidrogenasa pueda incorporarse a otras rutas metabólicas requiere transformarse en acetil coenzima durante una reacción catalizada por acetil Co A sintetasa. Una vez como acetil Co A, puede ser metabolizado en el ciclo de Krebs hasta CO_2 y H_2O , o bien para sintetizar ácidos grasos, como sucede en el hígado y en el tejido adiposo. Otro camino de menor importancia cuantitativa sería la formación de cuerpos cetónicos y esteroides, cuando el acetato transformado hacia acetil CoA entra al ciclo de Krebs, o bien sintetiza ácidos grasos, adquiere un papel energético importante (*Riveros y cols; 1997*)

Las concentraciones altas de acetaldehído en el hígado, forman aductos de acetaldehído con proteínas hepáticas, estableciendo uniones covalentes con las proteínas del citoesqueleto hepatocelular, por lo que disminuyen los microtúbulos, su capacidad transportadora de proteínas, reteniendo dichas proteínas en las células, ocasionando hinchamiento de los hepatócitos y crecimiento del hígado.

Por último las concentraciones elevadas de acetaldehído modifican el balance entre la síntesis y la degradación de colágena favoreciendo depósitos de proteína estructural (Rocha, 1996).

1.4.6. 2. Aldehído Oxidasa.

Esta enzima se encuentra en el citosol de la célula tiene un peso molecular de 300Kda y posee 8 átomos de fierro, 2 de molibdeno, 2 moléculas de FAD y una a dos moléculas de Q10. Cataliza la conversión de acetaldehído a acetato con una Km para el acetaldehído de 1mM, en presencia de oxígeno. La importancia de esta enzima radica en que parte de los efectos tóxicos se han asociado a la generación de RL derivados de peróxido de hidrogeno producido durante la reacción (Fig-11).

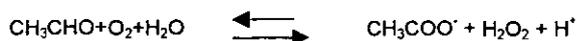


Fig-11. Reacción catalizada por la aldehído oxidasa.

1.4.6.3 Sistema oxidante del acetaldehído MAOS.

Este sistema fue descrito en 1996, se localiza en los microsomas hepáticos, es análogo del MEOS este requiere de la participación del CYP2E1, que es el más activo. En este sistema donde es oxidado el acetaldehído a acetato, se encuentra acoplada la dependencia de una molécula de NADPH a la reducción de una molécula de oxígeno que forma peróxidos de hidrógeno. La actividad de este sistema es iducible hasta 2 veces en animales tratados crónicamente con etanol (Fig- 12) (Riveros y cols; 1997).



Fig-12. Vía oxidativa del acetaldehído catalizada por el MAOS.

1.5. Radicales Libres (RL).

Como hemos visto en el metabolismo intermediario del etanol se genera gran cantidad de RL estos se identifican fisicoquímicamente como, átomos o moléculas capaces de existir independientemente y que poseen uno o más electrones no apareados girando en órbitas externas, condición que los torna sumamente reactivos puesto que el electrón solitario "busca pareja" para salir de su forma atómica inestable, por lo que sustrae un electrón a una molécula vecina lo que en química es sinónimo de oxidarlo, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en un RL (*Zentella y cols;*, 1992).

Los RL se generan en el organismo como subproductos de diversas reacciones celulares (Tabla 4), siendo las más importantes a nivel mitocondrial tales como las realizadas en la cadena transportadora de electrones. En menor grado se generan en procesos como el metabolismo del ácido araquidónico, síntesis de hormonas en la corteza suprarrenal, ciclos enzimáticos catalíticos, y por la acción de los polimorfonucleares, que producen cantidades de RL cuya función es destruir agentes bacterianos (Tabla 5). (*Zentella y cols;* 1996).

Tabla 4. Sitios de producción de radicales libres.

Retículo Endoplasmático, citocromo p450.
Citosol, moléculas proteínas y enzimas (xantina- oxidasa).
Mitocondrias, Peroxisomas.

Tabla 5. Funciones de los radicales libres

FUNCIONES DE LOS RADICALES LIBRES

1. Promotores de especies ferrilo.
 2. Oxidación del etanol por radicales libres.
 3. Reducción de ribonucleótidos.
 4. Reacciones de oxidación, carboxilación e hidroxilación.
 5. Fagocitosis.
 6. Actividad de peroxidasa y NADH oxidasa.
 7. Maduración y respuesta al daño en tejidos vegetales.
 8. Producción de eicosanoides.
 9. Factor endotelial de relajación.
-

Los radicales libres detectados en las células se agrupan de la siguiente manera: radicales libres derivados de oxígeno y 2) metales de transición.

De estos los de interés para la biología o la medicina son los derivados del oxígeno; entre ellos se pueden mencionar: los singuletes δ y σ del oxígeno (O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). El peróxido de hidrógeno, aunque no es un radical libre en sí, está estrechamente relacionado por ser el principal precursor del radical hidroxilo (*Ferreira, 1984*).

Se calcula que del oxígeno respirado del 1 al 3% es precursor del radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), tanto en la cadena transportadora de electrones dentro de la mitocondria, como en el retículo endoplasmático.

Los RL generados por el metabolismo normal existen en concentraciones bajas, que van de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} M. Estos RL no viajan lejos de los sitios en que se forman debido a que su vida media es de unos cuantos microsegundos (Tabla 6) (Zentella y cols; 1995).

Tabla 6. Vida media de los radicales libres (Riveros y cols; 1997).

Especies	Símbolo	Vida media a 37°C, s
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	1×10^{-6}
Hidroxilo	$\cdot OH$	1×10^{-9}
Alcohexilo	$RO\cdot$	1×10^{-6}
Peroxilo	$ROO\cdot$	1×10^{-2}
Singlete de oxígeno σ ó δ	O_2	1×10^{-6}
Oxígeno molecular	O_2	10^{-2}

Los RL reaccionan con polímeros estructurales de la célula como los polisacáridos, lípidos (ácidos grasos de la membrana), proteínas (grupos tioles), y ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas), alternando así su estructura y función (Tabla 7).

Tabla 7. Compuestos celulares alterados por la acción de los RL del oxígeno.

COMPUESTOS CELULARES ALTERADOS POR LA ACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO
LÍPIDOS Peroxidación de los ácidos grasos insaturados de las membranas plasmáticas de orgánulos.
PROTEÍNAS Inactivación de enzimas, que contienen grupos sulfhidrilo por oxidación de los mismos, al igual que en proteínas estructurales.
CARBOHIDRATOS Polimerización de polisacáridos.
ACIDOS NUCLEICOS Hidroxilación de bases, entrecruzamientos, escisión de las bandas del DNA que causa mutaciones e inhibición de la síntesis de proteínas.

Existen datos experimentales cada vez más numerosos que indican que los mecanismos de daño tisular son mediados por la presencia de los RL. Por otra parte existen padecimientos donde la generación de RL de oxígeno se encuentran presentes en abundancia y se rebasa la capacidad antioxidante de la célula dando lugar al daño oxidativo (Tabla 8) (*Zentella y cols;1996*).

1.6.TENSION OXIDATIVA

Cuando aumenta en exceso la producción de RL en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ineficiente, se establece la situación conocida como *tensión oxidativa*, esto es un desequilibrio entre las velocidades de producción y metabolismo de los RL. (*Comporti y Benedetti, 1985*)

Tabla 8. Participación de los radicales libres en algunas enfermedades.

ENFERMEDADES DONDE SE IMPLICAN LOS RL

- Enfermedades del envejecimiento.- Cáncer, cataratas, artritis, arteriosclerosis, Párkinson, Alzheimer.
 - Isquemia –reperusión.- Infarto del miocardio, trasplante de órganos, cirugía cardíaca, terapias trombolíticas.
 - Adicciones.- Alcoholismo y tabaquismo.
 - Sistema nervioso.- Párkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo cerebral, hiperoxia.
 - Agresiones químicas y físicas.- Radiaciones, adriamicina, contaminación ambiental.
 - Riñón.- Síndrome nefrótico autoinmune, nefrotoxicidad por metales pesados, aumento de los leucocitos, artritis, sépsis, e inflamación general.
-

Experimentalmente se puede producir estrés oxidativo, con el empleo de tóxicos que inducen la producción de RL y capaces de abatir las defensas antioxidantes. Algunos tóxicos son: tetracloruro de carbono, los herbicidas, el paraquat, el paracetamol y el etanol (*Haliwell y cols; 1987*)

1.7. PROCESO DE LIPOPEROXIDACIÓN.

Entre los daños celulares producidos por los RL se encuentra la lipoperoxidación de la membrana celular. La lipoperoxidación involucra una serie de oxidaciones consecutivas que pueden ser iniciadas por radicales hidropoxilo, hidroxilo, o por el oxígeno singulete, pero no por radicales menos reactivos, como son el superóxido y peróxido de hidrógeno (*Zentella y cols; 1992a*).

Cuando un RL reacciona con un no radical, puede favorecer la formación de otros RL, como sucede en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, es

decir un radical libre iniciador remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena de carbonos, quedando un electrón desapareado en el átomo de carbono y a su vez forma un radical de ácido graso, éste después de varios rearrreglos internos, reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical **peroxilo de lípido**, que a su vez sustrae un segundo hidrógeno de otras moléculas de ácido graso y así se establece una reacción en cadena autocatalítica, de manera que un RL iniciador produce solo efectos locales y limitados, mientras que el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa, ocasionan la formación de RL con efectos amplificados a distancia del sitio donde se formó el primer RL (*Zentella y cols; 1996*).

El daño a la membrana celular inducido por los RL, es el punto más importante donde los ácidos grasos no saturados (fosfolípidos), son el blanco principal, al ser degradados por este mecanismo conducen directa o indirectamente, a la obtención del malondialdehído (MDA) como producto final, el cual es extremadamente reactivo con los grupos amino perteneciente a las proteínas (*Videla y cols; 1980*).

La lipoperoxidación aumenta la rigidez de la membrana y ésta disminuye la presencia de enzimas unidas a la misma, éste es el daño de mayor importancia en la membrana pues conlleva a las alteraciones de las propiedades fisiológicas; como fluidez, permeabilidad, y transporte entre otros.

La peroxidación de los lípidos (lipoperoxidación) parece ser uno de los mecanismos más importante relacionado con el daño celular, durante el consumo exagerado o crónico de bebidas alcohólicas (Fig-13) (*Videla y Valenzuela 1982, Zentella y cols; 1992a*).

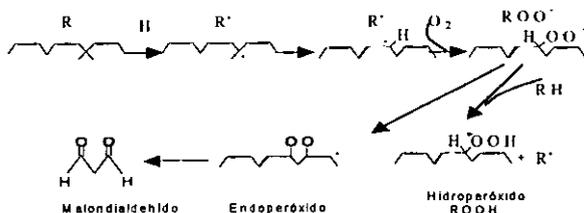


Fig-13. Proceso de lipoperoxidación. La reacción es iniciada por la luz o por los iones metálicos. El malondialdehído único compuesto formado por los ácidos grasos con tres o más dobles ligaduras y se emplean como una medida de la peroxidación de los lípidos junto con etano del carbono 2 terminal de los ácidos grasos omega 3 y el pentano del carbono 5 terminal de los ácidos grasos omega 6.

Los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas muy elaborados de protección que funcionan como atrapadores de RL, para prevenir el daño que estas pueden producir. Cuando ocurre un daño celular, muy posiblemente se deba a que los sistemas de protección son insuficientes o se encuentran deteriorados como es el caso de enfermedades como el alcoholismo.

1.8. LOS ANTIOXIDANTES (AOX).

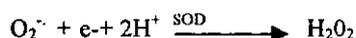
Existen moléculas de defensa contra la toxicidad del oxígeno llamados antioxidantes, que protegen a la célula de las especies reactivas. Normalmente las células del organismo, en condiciones naturales, mantienen en equilibrio la producción de RL y las defensas antioxidantes.

Entre los AOX que sintetiza la célula, existen enzimáticos y los no enzimáticos que pueden o no ser sintetizados en la célula. Al ingresar al organismo a través de los alimentos, son incorporados a la circulación y

distribuidos principalmente en las membranas celulares, blanco preferido de los RL, protegiéndolas así del proceso de oxidación (*Comporti y Benedetti, 1985*).

Se les denomina antioxidantes exógenos a, las Vitamina E (α tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) y, beta caroteno, los antioxidantes endógenos contemplan tres enzimas que son piedra angular de esta protección; la superóxido dimutasa (SOD), el glutatión peroxidasa (GSH peroxidasa) así como a la catalasa que ya hemos mencionado. (*Ferreira, 1984, Fraga, 1994*).

La superóxido dismutasa (SOD), convierte el superóxido en agua oxigenada, en la mitocondria, esta enzima es dependiente de manganeso, y la SOD citosólica tiene como cofactores al cobre o al zinc



La glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa constituyen un gran sistema antioxidante celular, la GSH peroxidasa es una enzima citosólica, que tiene como cofactor al selenio, cuya función es transformar al peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua. En esta reacción participan dos moléculas de glutatión reducido (GSH) que ceden dos hidrógenos y se forma entre ellas un enlace disulfuro originando así el glutatión oxidado (GSSG). El glutatión se regenera mediante la glutatión reductasa en presencia de NADPH. También los peróxidos y los lipopéroxidos son reducidos en presencia de glutatión (Fig-14).

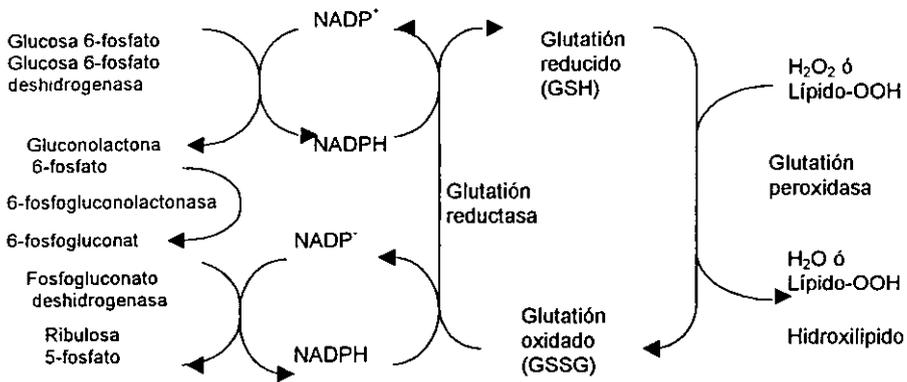


Fig 14. Acción de glutatión reductasa en eritrocito, previenen la acumulación de peróxidos y de lípidos peroxidados.

Así es como la triada de SOD, catalasa y glutatión peroxidasa, protegen los lugares expuestos al daño oxidativo, como el epitelio pulmonar y los glóbulos rojos, donde estas enzimas existen en mayor cantidad que en otras células (*Zentella y cols; 1996*).

Otro tipo de protección la brindan las moléculas capaces de eliminar a los RL, entre ellas está el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina, su acción es inespecífica y su eficacia a las concentraciones normales no es muy alta (*Haliwell y cols; 1987*).

Por si fuera poco muchos organismos cuentan con un complejo sistema de transporte y almacenamiento de iones metálicos a cargo de proteínas especializadas muy efectivas, a tal grado, que raramente se le permite a los iones

La biosíntesis del glutatión ocurre en muchos tejidos de los mamíferos, especialmente en el hígado y en el riñón. Existen dos pasos principales en la síntesis del glutatión, utilizando L-cisteína, L-glutamato y glicina así como una molécula de ATP para formar ADP + Pi por cada unión generada (Fig-16):

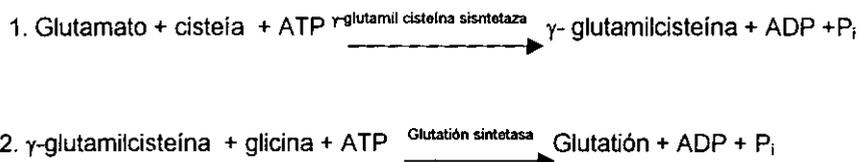


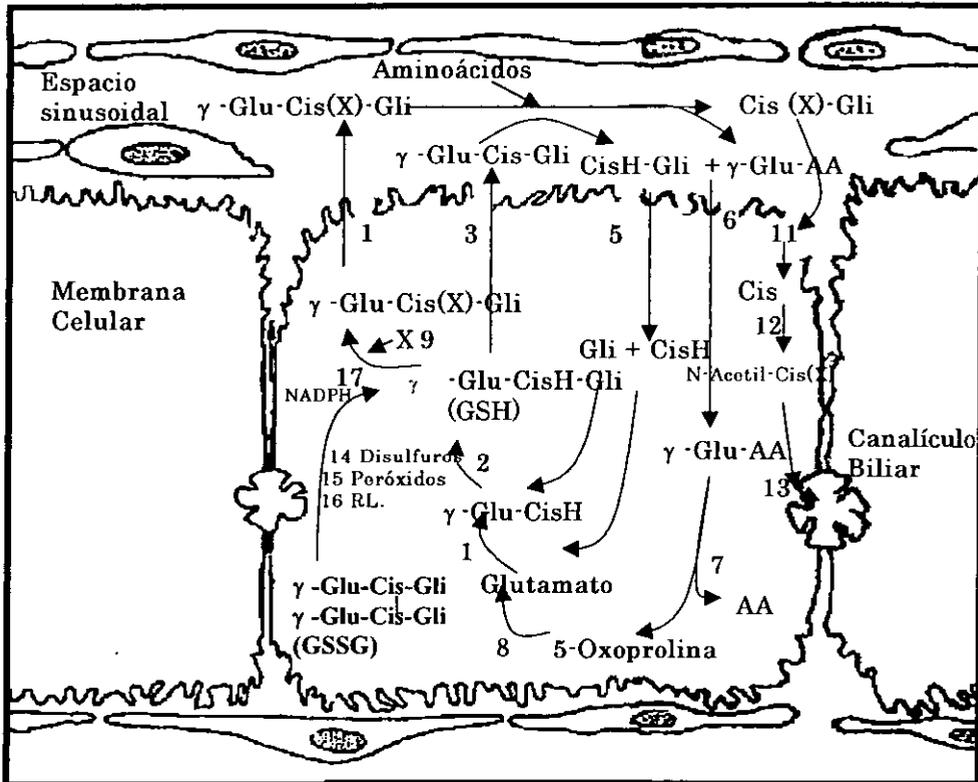
Fig-16. Síntesis del glutatión.

El papel del glutatión, en la detoxificación de metabolitos electrofílicos de xenobióticos o de especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo redox ha sido bien definido (*Zentella y cols; 1995*).

El glutatión interviene en la síntesis de las hormonas esteroides y prostaglandinas, como un activador o regulador de ciertas actividades enzimáticas y en la protección de los lípidos contra la oxidación (*Viña y Krebs; 1978*).

Una de las funciones celulares más importantes del glutatión es la proteger la integridad estructural de los ácidos grasos insaturados, evitando la lipoperoxidación y formando conjugados con los epóxidos por medio de la glutatión S–epóxido transferasa, glutatión S–alquiltransferasa y la glutatión S–transferasa modificando así a los radicales libres y descomponiendo a los hidroperóxidos. La forma reducida de glutatión juega un papel importante en la desintoxicación celular al reaccionar con el peróxido de hidrógeno y con peróxidos orgánicos (*Newsholme y Leech 1983*).

Estas reacciones de detoxificación consumen glutatión, cuyos compuestos formados son excretados como tal o como ácido mercaptúrico a través de la orina o de la bilis. La baja de GSH en tejido hepático puede deberse a su oxidación, o a su translocación al medio extra hepático, como glutatión libre o como conjugado de acetaldehído (Fig-17).



METABOLISMO DEL GLUTATIÓN

1. γ y glutamylcisteína sintetasa. 2. GSH sintetasa. 3. Transporte del GSH. 4. γ -glutamyl transpeptidasa. 5. Dipeptidasa. 6. Transporte de γ -glutamyl aminoácidos. 7. γ -glutamyl ciclotransferasa. 8. 5-oxoprolinasa (desciclización). 9. GSH S-transferasa (X=compuesto endógeno y exógeno). 10. Transporte externo (4, 6 y 11). 11. Reincorporación de la cisteína (X). 12. Acetilación para formar ácido mercaptúrico. 13. Salida del ácido mercaptúrico. 14. Transhidrogenación (GSH a GSSG). 15. Glutatión peroxidasa. 16. Reacción con RL. 17. GSSG a GSH reductasa.

Fig-19. Representación esquemática del flujo de GSH, GSSG, y glutatión S-conjugados modificado de Akerboom, 1989 y Meister, 1983 modificado por Alarcón, 1999.

II. ANTECEDENTES

El glutatión es el antioxidante intracelular más abundante. Tanto el glutatión reducido (GSH) como el glutatión oxidado (GSSG) se encuentran involucrados en el mecanismo de protección de los efectos de producto del metabolismo, cuando existe una intoxicación aguda con etanol se produce un estrés oxidativo y como consecuencia un mayor consumo de glutatión reducido, en hígado y riñón, mientras que en otros tejidos como el páncreas, intestino y estómago no se observan cambios en los niveles de GSH en animal integro (*Videla y cols; 1980*). Cuando el consumo del etanol es crónico, puede contribuir al aumento de la susceptibilidad de los efectos hepatotóxicos de otras drogas como el acetaminofén (*Bernhard y cols; 1991*).

El glutatión es un indicador de la reserva antioxidante tisular, y éste (GSH) es abatido en sangre conforme es más severo el daño hepático. El GSH en sangre es la fracción antioxidante útil que muestra una disminución paralela al glutatión total (GT), mientras que se observa un aumento de GSSG sanguíneo el cual guarda relación con la severidad del daño hepático (*Zentella y cols; 1995*).

Por otra parte el acetaldehído es el principal metabolito del etanol, con la característica de ser altamente reactiva. Cuando el acetaldehído se administró a ratas (0.3g/ Kg de peso), por vía orogástrica (7.7 % w/v) indujo una reducción en los niveles de GSH ya que esta es la principal molécula para reducir los peróxidos transformandolo el GSSG en el hígado (*Videla y cols; 1986*).

El etanol administrado en forma aguda afecta el metabolismo de lípidos, al ocasionar varios cambios, entre ellos aumento en la liberación de éstos del tejidoadiposo, semejante al que se observa en situaciones de estrés y que es mediada por la epinefrina, que a su vez es bloqueada por antagonistas alfa adrenérgicos (*Zentella, Saldaña, y cols; 1994*). El exceso de ácidos grasos liberados por el tejido adiposo contribuye a elevar los niveles séricos de triacilgliceroles, hasta 36 horas después de haber ingerido el etanol, principalmente en la fracción lipoprotéica de baja densidad (LDL), ésta mayor liberación de ácidos grasos por los tejidos y la elevación sérica de triacilgliceroles, cooperan en establecer el hígado graso en el animal íntegro (*Pimstein y Frech 1984*). Se han realizado múltiples investigaciones sobre el efecto de utilizar diferentes fuentes de lípidos como son: aceite de maíz, aceite de soya, aceite de girasol, aceite de pescado, aceite de hígado de bacalao, manteca de cerdo, y sebo de res entre otros (*Rocha, 1996*).

Se sugiere que las grasas saturadas protegen contra la cirrosis alcohólica, mientras que las grasas poliinsaturadas promueven la cirrosis (*Nanji, 1986*).

El efecto de la intoxicación aguda *in vivo* con etanol (5g/Kg) en la rata está influido por el tipo y porcentaje de lípidos consumidos. En las ratas alimentadas con 15% de aceite de maíz en una dieta a libre acceso y restringida, se registro aumento significativo del GSSG Y GT en sangre y una disminución significativa del GSH hepático, a su vez la intoxicación aguda con etanol también provocó esteatosis multivacuolar en el área alrededor de la vena central hepática, en ratas

que consumieron 15 % de aceite de maíz, en la dieta a libre acceso. En las ratas que consumieron manteca de cerdo o sebo de res no se observó esteatosis provocada por el consumo de etanol, de igual manera los hígados de las ratas que consumieron 5 o 15 % de aceite de cártamo no mostraron esteatosis, ni antes ni después de la intoxicación con etanol (*Rocha, 1996*).

En la literatura se menciona que al utilizar un alto porcentaje de aceite de maíz en la dieta de las ratas, se produce una disminución de glutatión reducido y un aumento de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico en la mucosa del colon (*Kuratko y Perce 1992*).

Se ha reportado que en ratones atímicos alimentados con dietas altas en grasas (23%) adicionado con tres diferentes cantidades de ácido linoléico (8%, 12%), el carcinoma y metástasis son significativamente mayores (en ratones) comparado con el que consumió 2% de ácido linoleico (*Rose 1993*).

El porcentaje de lípidos en la dieta regula la actividad de las proteínas de la membrana del hepatocito. Sin embargo el porcentaje de proteína en la dieta también es importante en los cambios de la célula. Al alimentar a ratas con aceite de pescado (5%) o con una dieta sin grasa, se observó que la actividad de la glutatión transferasa fue mayor en la dieta con aceite de pescado y más baja en la dieta sin grasa. La dieta con 5% de aceite de maíz condujo a una actividad intermedia de dicha enzima (*Yang y cols; 1993*).

Al administrar en el alimento de ratas en crecimiento 5% o 20% de aceite de maíz, más 5% o 20% de soya, durante 4 semanas, aumentaron significativamente

las SRATB hepáticos del grupo con soya, la concentración de GSH (glutación reducido) no mostró una correlación lineal con la dieta baja en proteína, también se reportó que al administrar colesterol (1 a 1.5 %) en la dieta de las ratas se aumento la susceptibilidad del hígado a la lipoperoxidación, disminuyo la síntesis de la glutación peroxidasa y las deshidrogenasas de la vía de las pentosas, por otro lado se ha observado una correlación positiva entre la producción de SRATB y la degradación de los ácidos grasos insaturados (*Tsaí, 1975*).

Se sugiere que la deficiencia de proteína, asociada a un alto consumo en lípidos acelera el daño peroxidativo de los tejidos al aumentar la formación de RL de oxígeno (*Huang y Fwu, 1992*). Además el efecto de un alto nivel en aceite de pescado provocó la disminución significativa de los triacélgliceroles hepáticos (*Bourre, 1990*).

El administrar una dieta, baja en lípidos y adicionada con etanol durante 2 semanas produjo menor cantidad de RL que una dieta alta en lípidos (*Pimstein y Frech., 1984*). Se ha observado que una dieta alta en grasa, aumentó el desarrollo de tejido neoplásico (*Baldwin y Parcker 1986*). Con el consumo de 1000 mg de ácido eicosanpentanoico al día, por Kg de peso, el contenido de GSH y las actividades de glutación S-transferasa, (*Kuratko y Perce, 1992. Lappenna y cols; 1992, Videla y cols; 1980*) glutación peroxidasa (*Bourre, 1990*) y de glutación reductasa aumentaron significativamente, también aumento 50% la actividad de acil-CoA-oxidasa y de la catalasa hepática (*Demoz y cols; 1991*).

Se comparó la actividad de las enzimas AOX; glutación peroxidasa, superóxido dimutasa, en el hígado, y de la catalasa, en glóbulos rojos de rata

alimentadas con 2,5,10, ó 20 % de aceite de soya, con 8 % de lactoalbúmina o bien con 5 % o 20 % de aceite de soya, con 20 % de lactoalbúmina durante 8 semanas, observándose que la actividad de las enzimas antioxidantes disminuían drásticamente al aumentar el nivel de aceite de soya en los grupos alimentados con cantidades bajas de proteína, que en aquellos con dietas normales en proteína. El aumento gradual de aceite de soya en la dieta baja en proteína, aumentó las concentraciones de los SRATB (*Huang y cols; 1992*).

Los cambios ultra estructurales provocados por consumo de etanol se caracterizan por la proliferación del retículo endoplasmático liso hepático (*Yang y cols; 1993*). El consumo crónico de etanol se asocia con la proliferación de las membranas hepáticas (microsomos) como un sistema de adaptación para la oxidación del etanol (*Lehninger, 1993*).

Al observar el efecto del consumo del etanol sobre el citocromo P450 IIE1 y al comparar el efecto de una dieta baja contra otra normal en grasa, se comprobó que la grasa de la dieta por sí sola, puede potenciar la acción de la actividad del sistema de oxidación microsomal del etanol MEOS (*Lieber (b) 1991*).

Se observó que en las ratas que consumen manteca de cerdo, el metabolismo del etanol mediante alcohol deshidrogenasa ADH y el MEOS por sus siglas en inglés, es más acelerado que en ratas que consumieron aceite de maíz o sebo de res. La ingesta de etanol por ratas que consumieron manteca de cerdo tuvo que ser más elevado para alcanzar los mismos niveles del etanol sanguíneo que en ratas que consumieron aceite de maíz o sebo de res (*Nanji, 1997*).

La lipoperoxidación juega un papel importante en el daño hepático producido por el alcohol, el aumento de la peroxidación precede a la acumulación de triacilglicéridos en el hígado, con esto aumenta la formación de malondialdehído (Comporti y Benedetti 1985).

En otro estudio *in vivo*, el piroxicam antiinflamatorio no esteroideo, administrado en una dosis de 10mg/Kg previene el aumento de TAGs en el hígado y SRATB resultantes de una intoxicación aguda de etanol (5g/Kg) (Zentella y cols; 1993).

Los datos anteriores nos llevaron a estudiar cual es el efecto del etanol sobre las células hepáticas aisladas de ratas a las que se les administró una dieta normoprotéica y normolipídica (5%), en donde la fuente de lípidos difiere en su contenido de ácidos grasos, saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. El alcohol (50mM) se empleó como una sustancia capaz de producir tensión oxidativa, lo que a su vez permitió conocer la respuesta celular, midiendo al glutatión como molécula antioxidante y cuantificar las SRATB como indicador de daño celular.

El modelo empleado con hepatocitos aislados y los parámetros propuestos permitirán interpretar de mejor forma los resultados obtenidos, ya que en los otros estudios han empleado animales íntegros, y la complejidad de éste hace difícil su interpretación.

III HIPÓTESIS

El mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados como el oleico (18:1) y linoléico (18:2) incluidos en los lípidos de una dieta normolipídica, promueven los indicadores de tensión oxidativa, en comparación con las que presentan principalmente ácidos grasos saturados como el palmítico (16:0) y el esteárico (18:0).

IV OBJETIVO GENERAL

Conocer si las dietas normolipídicas ricas en grasas saturadas como manteca de cerdo ó sebo de res, insaturadas como el aceite de maíz modifican la respuesta a la tensión oxidativa inducida con etanol en el hepatocito aislado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si las grasas saturadas (manteca de cerdo y sebo de res), monoinsaturados y poliinsaturados (aceite de maíz), modifican algunos indicadores de tensión oxidativa como el glutatión total y las sustancias reactivas al ácido tuiobarbitúrico, en presencia de sustratos oxidables como el etanol, y el lactato, en el hepatocito aislado.

III HIPÓTESIS

El mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados como el oleico (18:1) y linoléico (18:2) incluidos en los lípidos de una dieta normolipídica, promueven los indicadores de tensión oxidativa, en comparación con las que presentan principalmente ácidos grasos saturados como el palmítico (16:0) y el esteárico (18:0).

IV OBJETIVO GENERAL

Conocer si las dietas normolipídicas ricas en grasas saturadas como manteca de cerdo ó sebo de res, insaturadas como el aceite de maíz modifican la respuesta a la tensión oxidativa inducida con etanol en el hepatocito aislado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si las grasas saturadas (manteca de cerdo y sebo de res), monoinsaturados y poliinsaturados (aceite de maíz), modifican algunos indicadores de tensión oxidativa como el glutatión total y las sustancias reactivas al ácido tuiobarbitúrico, en presencia de sustratos oxidables como el etanol, y el lactato, en el hepatocito aislado.

-
2. Determinar si el tipo de grasas de la dieta, (aceite de maíz, sebo de res y manteca de cerdo) ejerce algún efecto sobre los niveles de triacilgliceroles del hepatocito aislado incubado con etanol, o lactato.

 3. Determinar por medio de cortes histológicos si el tipo de grasa de la dieta (aceite de maíz, manteca de cerdo y sebo de res) provoca algún cambio o daño en el hígado de las ratas.

V. MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 30 ratas macho cepa Wistar, con destete tardío de 120-150 g de peso corporal, que fueron alimentadas con una dieta semipurificada, normoprotéica (20% caseína) o normolipídica (5%), donde la fuente de lípidos fue de origen animal (manteca de cerdo y sebo de res) y origen vegetal (aceite de maíz), éstos lípidos difieren en su contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. La composición de las dietas fueron elaboradas por farmacéuticas ICN, de acuerdo con la fórmula AIN-76 establecida por *American Institute of Nutrition 1977* (Apéndice II).

Las ratas recibieron una alimentación controlada (15 g/día), el consumo de agua fue a libre acceso y permanecieron en jaulas individuales, con fotoperiodos de luz oscuridad de 12 horas, por un periodo de 40 días de tratamiento. También se llevó un registro de ganancia de peso semanal.

Obtención de las Muestras.

Posterior a los 40 días de tratamiento, las ratas fueron puestas en ayuno 16 horas, se les permitió agua *ad libitum*, al término de éste tiempo, fueron anestesiadas con éter en una cámara de vidrio, durante 25-40 segundos aproximadamente. Después, la rata fue colocada en decúbito dorsal y sujeta con agujas sobre una base de cera; con una tijera recta se hicieron cortes de piel y músculo en la región abdominal para dejar expuesto el hígado, y después por desplazamiento de asas intestinales, se disectó la vena porta. Con un catéter, la

vena porta fue canalizada para que el hígado recibiera solución buffer Ringer-Krebs (R-K Apendicell), a una temperatura de 37.4 °C, carbógeno (CO₂ 5 %, O₂ 95 %), a pH 7.35-7.45 El hígado fue perfundido (aproximadamente 10 minutos) abundantemente con R-K hasta eliminar los restos de sangre. El hígado fue expuesto a digestión con colagenasa tipo II, de Worthington (0.5 mM) durante 10 a 15 minutos. Se separaron los hepatocitos en una caja de petri, posteriormente la solución de células fue filtrada en una malla de nylon. Las células fueron lavadas tres veces por decantación con buffer. Las células fueron mantenidas en un volumen total de 40 ml de *Buffer Berry and Fried 1969, modificado por Guinzberg y cols; 1987*.

Una vez aislados los hepatocitos, se empleó la técnica de exclusión con azul de tripano para conocer la viabilidad de las células. Las células utilizadas presentaron una viabilidad del 85% al 95%.

Determinación del Peso Húmedo.

Se determinó el peso húmedo (P.H) de 1ml de hepatocitos, que fueron colocados en un tubo previamente pesado, la muestra se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 5 minutos, después se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo en un ángulo de 45°, a una temperatura ambiente durante 60 minutos, nuevamente se pesó el tubo con la pastilla y se obtuvo P.H por diferencia de pesos.

Incubación de hepatocitos.

Los hepatocitos fueron incubados 60 minutos con agitación continua suave, (agitador Shaker Bath Orbit) en Buffer R-K, a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% y O₂ al 95 %, y su correspondiente sustrato; lactato

(50mM) pH 7.4, y Etanol (50mM), otro grupo fue el de las células sin incubar (basales).

Determinación de Proteína.

La determinación de proteína fue realizada de acuerdo al método de *Bradford, 1976*. Se realizó una dilución 1:10 de la suspensión de hepatocitos con buffer Tris-KCl-EDTA, 5mM, 140mM, 1mM respectivamente, a un pH 7.4; los hepatocitos se rompieron con una agitación con vortex intensa, utilizaron 50 μ l de alicuota de la dilución, y se les agregó 50 μ l de Tris-KCl, más 5ml de reactivo de Bradford, y se agitó en vortex. La solución obtenida fue leída a 595 nm en cubetas de plástico en un espectro Beckman Du 650. Los cálculos se obtuvieron tomando como referencia una curva estándar de proteína realizada con albúmina bovina (SIGMA).

Determinación de Triacilglicéroles (TAGs).

Los triacilglicéroles fueron cuantificados por el método *Gottfried y Rosenberg, 1973*. Se utilizó 0.2 μ l de la muestra de hepatocitos incubados con los respectivos sustratos, más 2 ml de n-heptano, 3 ml de Isopropanol y 1 ml de ácido sulfúrico 5 N, la mezcla fue agitada en vortex durante 30 segundos, una vez separadas las fases (sin centrifugar) se tomaron 0.4 ml de la muestra de n- heptano (capa superior de la extracción) y se adicionaron 2 ml de isopropanol, una gota de KOH (6.25 M) se mezcló bien y los tubos fueron tapados con canicas e incubados a baño maría a 70 °C durante 10 minutos, posteriormente se les agregó 0.2 ml de metaperiodato de sodio (6g/l) en 50 ml de ácido acético glacial) y 1 ml de acetil

acetona 2mol/l, se mezcló, se incubaron las muestras durante 10 minutos a 70 °C para que desarrollara color, la solución restante fue puesta en cubetas de cristal de 3 ml y se leyó la transmitancia a una longitud de onda de 425 nm, mientras permanecían tibias. Los cálculos se realizaron tomando como referencia una curva estándar de trioleín (10 g/l), equivalentes a 50, 100, 200 y 300 mg/dl.

Determinación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (SRATB).

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico SRATB fueron determinadas por el método de *Zentella de Piña y cols 1993*. Los hepatocitos incubados con los respectivos sustratos, fueron nuevamente incubados durante 30 minutos a 37°C, con agitación moderada en buffer R-K a pH 7, después se les agregó 0.75 ml de ácido acético (al 20 %, a pH 2.5), y 0.75 ml de ácido tiobarbitúrico (al 0.8 %), se incubaron a baño maría a punto de ebullición durante 45 minutos. La reacción se detuvo colocando las muestras en hielo (a 4°C). A continuación se adicionó 0.5 ml KCl (al 2%) y 2.5 ml de Butanol-piridina (15:1), se agitó vigorosamente, y centrifugó a 10 000 r.p.m. durante 5 minutos, se extrajo el sobrenadante (fracción liposoluble), y se depositó en cubetas de cuarzo de 3 ml que se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a 532nm.

El malondialdehído MDA puede ser detectado mediante su conjunción con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) el cual da una coloración rosada al medio de reacción (Fig-19). El binomio MDA-TBA es soluble en solventes orgánicos y puede detectarse mediante un espectrofotómetro a 532 nm.



Fig-18. reacción para la determinación de SRAT.

Determinación de Glutación Total (GT).

Se preparó una dilución 1:1 de los hepatocitos y ácido perclórico 0.1M, posteriormente se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 5 min, se extrajo el sobrenadante (extracto perclórico) para medir el GT .

El glutación total fue cuantificado por el método de *Akerboom y cols; 1981*. En una cubeta de cuarzo se colocó 1ml de buffer de fosfatos (0.1 M) a pH 7, más 10 μ l de muestra de extracto perclórico, se agitó y agregaron 20 μ l de NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido) diluido en una solución de bicarbonato (2 mg/0.5 ml NaHCO₃), más 20 μ l de la enzima glutación reductasa (tipo IV Sigma) 6U/ml , se agitó y pasados 2 minutos, se agregaron 20 μ l de DTNB (5, 5'- dithio-bis (ácido 2-nitrobenzoico 1.5 mg/ml NaHCO₃) al 0.5%, se agitó y pasados 5 minutos se realizó la lectura a 412 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640, los cálculos se realizaron tomando como referencia una curva estandar de GSSG (glutación oxidado) de SIGMA.

La suma del glutación reducido y oxidado es determinada enzimáticamente, utilizando un ensayo de cinética en donde las cantidades de GSH o GSSG, en presencia de glutación reductasa, son determinadas por la continua reducción de

DTNB, por el NADPH de acuerdo a la reacción representada en la (Fig-20). La reacción es proporcional a la concentración de glutatión con valores aproximados de 2mM (Akerboom, 1981) la formación de 5-Thio-2 nitrobenzoato (TNB) es seguida espectrofotométricamente a 412 nm.

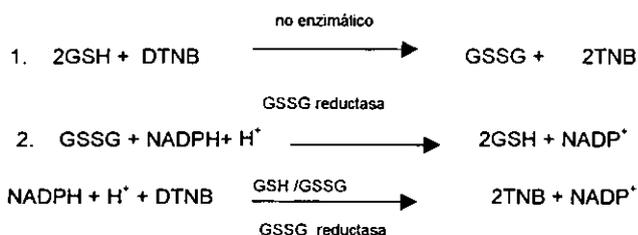


Fig-20. Reacción de reducción del DTNB, por el NADPH.

Histopatología.

Las ratas fueron anestesiadas con éter para tomar muestras del lóbulo izquierdo del hígado de aproximadamente 1 centímetro cúbico, que fueron fijados en Samboni, el resto del hígado fue perfundido para aislar los hepatocitos.

Las muestras fueron procesadas para incluirlas en parafina y se realizaron los cortes, de 7 micrómetros que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. La morfología hepática fue analizada y descrita en cada caso.

VI RESULTADOS.

Los resultados obtenidos fueron analizados usando pruebas estadísticas no paramétricas, para lo cual se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), que contempla comparaciones múltiples usando la prueba de Dunnett, de Student-Newman Keuls y Bonferoni. Otra prueba empleada fue la t de Student (*Jandel Scientific, 1994*).

EL presente trabajo mostró que los pesos corporales de las ratas que recibieron diferentes fuentes de grasas en la dieta (normolipídica, normoprotéica y controlada) no difieren significativamente entre ellas. Aunque el peso corporal semanal tiende a ser mayor en las ratas alimentadas con aceite de maíz, durante las cuatro semanas. La ganancia de peso corporal al final de la cuarta semana fue del 66.93, 63.093 y 65.22 % en los grupos que recibieron aceite de maíz, manteca de cerdo y sebo de respectivamente.

El contenido de triacilgliceroles se muestra en la gráfica 1, en ella se observa que el contenido de TAGs es similar entre las células que no fueron incubadas y las que se incubaron con lactato, se aprecia que los grupo que presenta mayor contenido de TAGs son aquellos que pertenecen a las células de animales alimentados con manteca de cerdo.

Los niveles de TAGs tienden a ser mayores en los grupos que fueron incubados con etanol independientemente de la dieta que recibieron. Al comparar el grupo que recibió etanol y aceite de maíz o manteca de cerdo hay un mayor ($p < 0.05$) nivel de TAGs en comparación con todos los grupos sin incubar e incubados con lactato. El grupo que recibió sebo de res y fue incubado con etanol

presentó mayor concentración de TAGs en comparación con el grupo que recibió la misma dieta y que no fue incubado con algún sustrato.

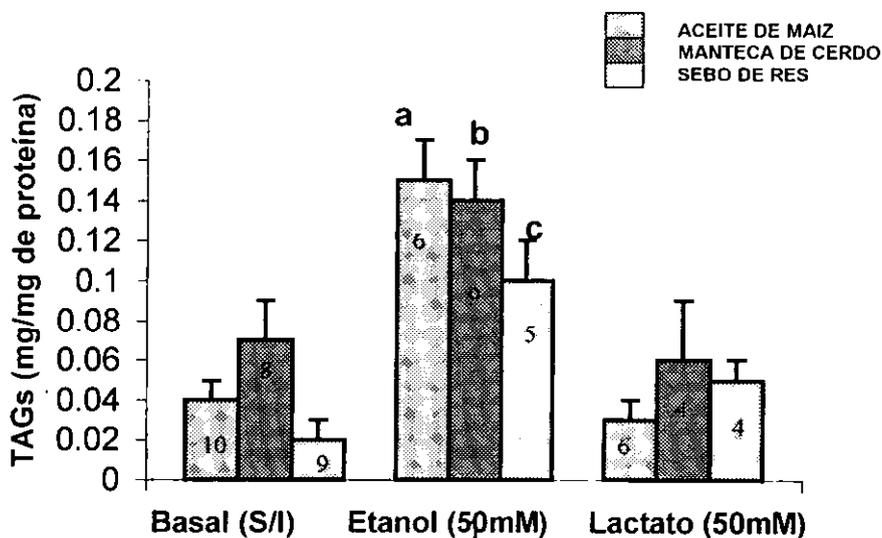


Gráfico 1. Triacilgliceroles en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con diferentes fuentes de ácidos grasos incluidos en la dieta, e incubados por 60 minutos con etanol o lactato (50mM) y agitación lenta con carbógeno (O₂ 95 % y CO₂ 5%) +/- e.e; n=4-10 se aplicó un análisis de varianza (ANOVA).

- a) AM+Etanol vs Basales y Lactato independientemente de la dieta $p < 0.05$.
- b) MC+Etanol vs Basales y Lactato Independientemente de la dieta $p < 0.05$.
- c) SR+Etanol vs Basales SR $p < 0.05$.

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico SRATB producidas en los hepatocitos aislados procedentes de las ratas alimentadas con diferentes lípidos en la dieta y que fueron incubados con etanol o lactato se muestran en gráfico 2. En esta gráfica se observa que no existe diferencia en la producción de SRATB, en las células que sin incubar (basales), mientras que en las incubadas con etanol o lactato existió un aumento significativo ($p < 0.05$) de los SRATB, en comparación con las células basales. También se observa que las células aisladas de ratas que recibieron una dieta de aceite de maíz y que fueron incubadas con etanol, los niveles de SRATB fueron mayores ($p < 0.05$) en comparación con los grupos que pertenecen a la dieta de aceite de maíz, manteca de cerdo y sebo de res incubados con lactato, así como en las células del grupo de sebo de res incubados con etanol. Existió aumento del 103, 37.28 y 21.86 % en los niveles de SRATB en los grupos que recibieron etanol y que pertenecían a aceite de maíz, manteca de cerdo y sebo de res en comparación con los grupos respectivos y que fueron incubados con lactato.

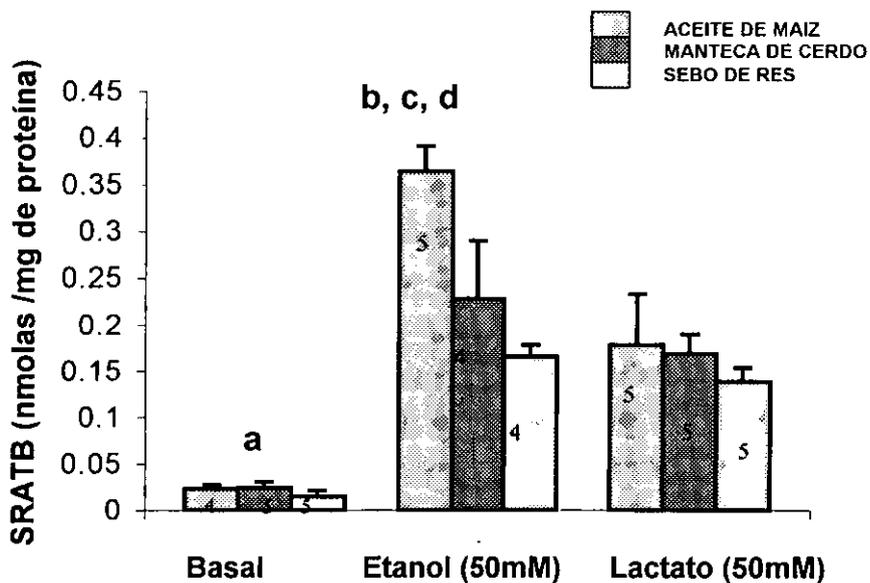


Gráfico 2. SRATB en hepatocitos aislados de rata que recibieron diferentes fuentes de ácidos grasos en la dieta, incubados por 60 minutos con etanol o lactato (50mM) y agitación lenta con carbógeno (O₂ 95 % y CO₂ 5%) +/- e.e; n=4-5, se aplicó un análisis de varianza una vía (ANOVA).

- a) Basales vs incubadas p<0.05.
- b) AM+Etanol vs Basales p<0.05
- c) AM+Etanol vs AM+Lactato, MC+Lactato p<0.05.
- d) AM+Etanol vs MC+Etanol, SR+Etanol p<0.05.

La gráfica 3. muestra que las concentraciones de glutatión total en hepatocitos basales, tienden a ser mayores que en los incubados con etanol o lactato. En las células pertenecientes al grupo que recibió aceite de maíz y que no fueron incubadas con algún sustrato existió mayor ($p < 0.05$) contenido de GT que en las incubadas con etanol o lactato y que pertenecían a hepatocitos de animales alimentados con aceite de maíz, manteca de cerdo o sebo de res. También se aprecia que los niveles de glutatión total fueron menores en un 58% en células incubadas con etanol que pertenecían al grupo de aceite de maíz y en un 43.08 % en células incubadas con lactato en comparación con las células sin incubar de la misma dieta. El glutatión total en células del grupo alimentado con manteca de cerdo incubadas con etanol o lactato mostró una disminución de glutatión total del 28.98 y 30.92 % respectivamente. Las células del grupo que recibió sebo de res en la dieta y que fueron incubadas con etanol y lactato presentó una baja del 14.87 y 11.91 % respectivamente en comparación con las que no fueron incubadas con algún sustrato. Los resultados relacionados con el GT muestran que el grupo que presentó mayor cambio en los niveles de glutatión fue el que recibió etanol y que pertenecía a las células de la dieta con aceite de maíz, mientras que las del grupo del sebo de res incubadas con etanol y lactato no mostraron cambios significativos con respecto al grupo de células sin incubar.

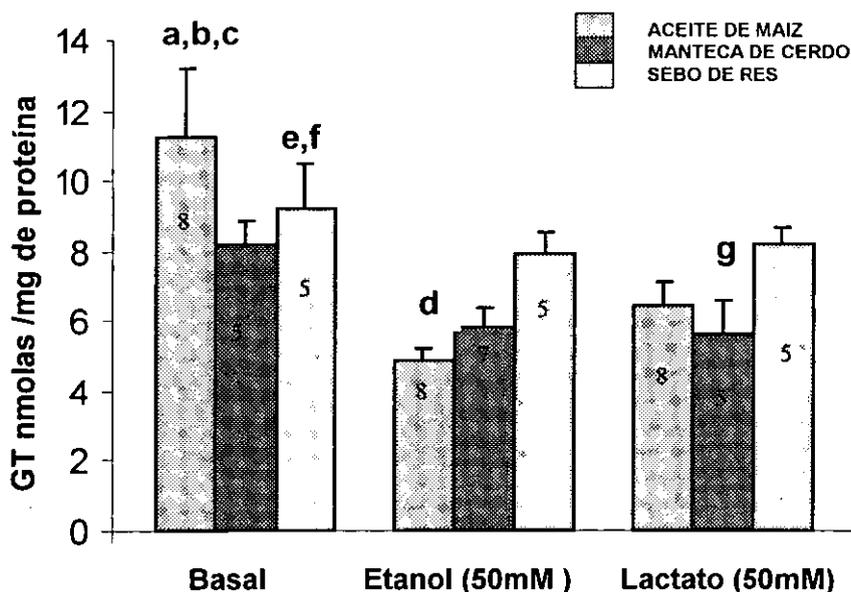


Gráfico 3. Glutación total en nmolas/mg de proteína en hepatocitos aislados, de ratas que recibieron diferentes fuentes de lípidos en la dieta, incubados por 60 minutos con etanol o lactato (50mM) y agitación lenta con carbógeno (O₂ 95% y CO₂ 5%) +/-e.e; n=5-8, se aplicó ANOVA una vía (Neuman-Kelus-Tests).

- a) AM Basal vs SR Basal, MC Basal p<0.05
- b) AM Basal vs AM+Etanol, SR+Etanol y MC+Etanol p<0.05
- c) AM Basal vs AM+Lactato, MC+Lactato y SR+Lactato p<0.05
- d) AM Etanol vs MC+Etanol, SR+Etanol p<0.05
- e) SR Basal vs AM+Lactato, MC+Etanol p<0.05
- f) AM+Etanol vs SR Basal p<0.05
- g) MC+Lactato vs SR+Lactato p<0.05

En el gráfico 4 se observa que existe una correlación entre los promedios de glutatión total y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, con una $r = -0.91$ en donde a menor cantidad de glutatión total presente en los hepatocitos incubados con etanol, aumentan los niveles de SRATB en hepatocitos aislados, en donde la fuente de grasa aceite de maíz tiene los niveles mas elevado de SRATB con 0.36 nmol/mg de proteína, manteca de cerdo 0.22nmol/mg de proteína y Sebo de res con los valores mas bajos de 0.16nmol/mg de proteína.

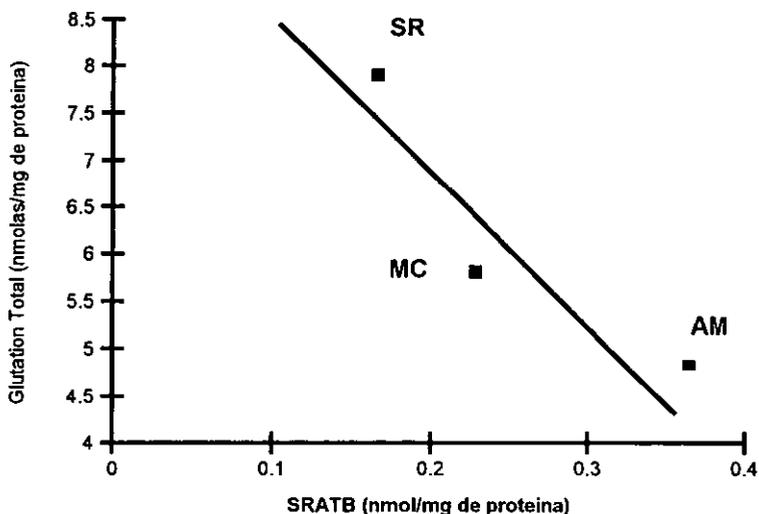


Gráfico 4. Correlación entre los promedios de glutatión total y SRATB, en hepatocitos aislados de ratas que consumieron aceite de maíz (AM), manteca de cerdo (MC) y sebo de res (SR) como fuente de lípidos, incubados 60 minutos con etanol 50mM.

Observamos en la grafica 5. los valores de SRATB de los hepatocitos aislados incubados con etanol de las ratas que consumieron las tres fuentes de lípidos y el contenido de ácido linoleico (ácido graso insaturado) del aceite de maíz, manteca de cerdo y sebo de res reportado por (Morrison 1986) Apéndice IV. Se presenta una correlación en donde a menor porcentaje de ácido linoleico como lo es en la dieta de sebo de res con un 2%, existe una disminución de las SRATB, no así en la dieta con mayor contenido ácido linoleico la de aceite de maíz con 34-56%, así mismo observamos que la dieta con manteca de cerdo que contiene aproximadamente 3-8 % de ácido linoleico se encuentra en un lugar intermedio en cuanto a los niveles de SRATB.

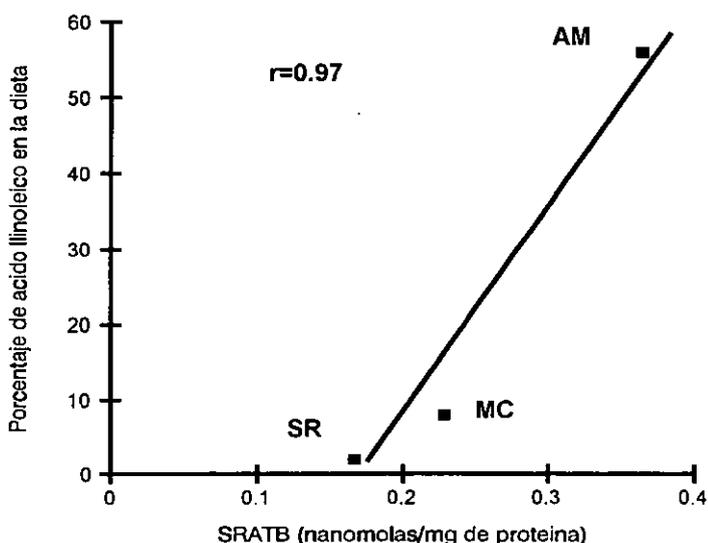


Gráfico 5. Correlación entre los promedios de SRATB, en hepatocitos aislados de ratas que consumieron aceite de maíz (AM), manteca de cerdo (MC) y sebo de res (SR) como fuente de lípidos y fueron incubadas por 60 minutos con estanol 50mM, y el contenido de ácido linoleico reportado por Morrison 1986 en las dietas

CORTES HISTOLÓGICOS

Los cortes histológicos mostraron que no existió estasis en las ratas alimentadas con sebo de res (Fig-20), mientras que en los que recibieron aceite de maíz produjo esteatosis moderada (Fig-21), mientras que en los que recibieron aceite de maíz fue moderada (Fig-22) y cuando consumieron manteca de cerdo esteatosis severa.

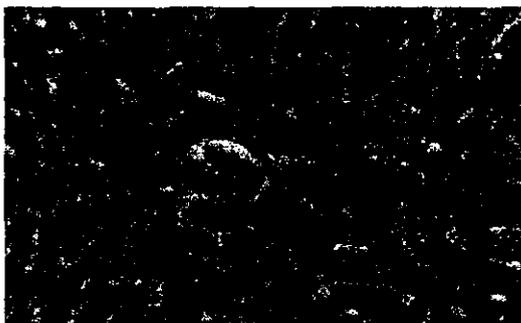


Fig.-20 Corte histológico del hígado de rata, que recibió como fuente de lípidos sebo de res, al 5%, por un periodo de 40 días. se observa esteatosis ausente (20X), P=espacio porta.

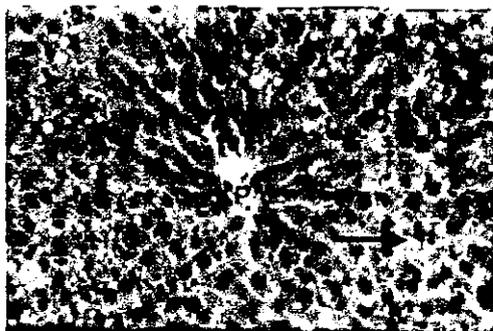


Fig-21 Corte histológico del hígado de rata que recibió una dieta con Aceite de maíz, al 5%, por un periodo de 40 días presenta esteatosis periportal univesicular (20X) P=espacio porta.

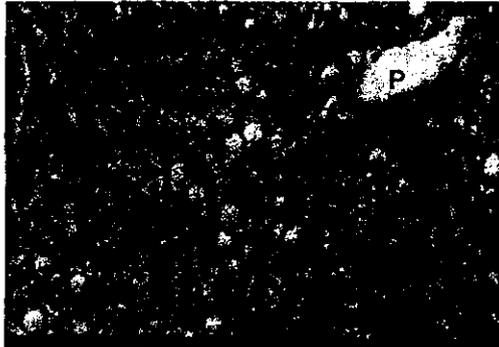


Fig.-22 Corte histológico del hígado de rata recibió como fuente de lípidos manteca de cerdo, al 5%, por un periodo de 40 días se observa esteatosis severa (20 X) P=espacio porta.

VII ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

Los pesos corporales obtenidos de las ratas, al final del tratamiento no mostraron diferencias significativas en comparación con trabajos donde se ha comparado los pesos corporales de ratas alimentadas con diferentes fuentes de ácidos grasos (aceite de maíz, aceite de salmón y manteca de cerdo) en dietas hiperlipídicas durante periodos de 4 a 8 semanas, donde se encontró que no existen diferencias significativas en cuanto a la ganancia de peso corporal (Nalbony *et al*; 1989, Skúladóttir, *et al*; 1994).

Mediante la administración de 5-6 g de etanol/ kg de peso, se llegan a alcanzar concentraciones sanguíneas de hasta 50mM etanol en ratas, estas dosis son capaces de producir lipoperoxidación como respuesta al estrés oxidativo ocasionado por el etanol (Mc Donald, 1973). Mientras que dosis de 3 g de etanol/ Kg de peso no ejercieron dicho efecto (Shaw *et al*; 1981).

En nuestro estudio se observó que las células incubadas con etanol a concentración 50 mM, existió un aumento en el contenido de triacilgliceroles, principalmente en células de animales alimentados con aceite de maíz, a éste respecto otros trabajos donde emplearon una dosis de 5 g de etanol/ Kg de peso, en ratas (animales íntegros) se presentó el aumento en la concentración de triacilgliceroles hepáticos (Zentella *et al*; 1992 b). Algunos mecanismos posibles que podrían explicar la respuesta obtenida pueden ser las siguientes: a) el etanol

llega a ser un combustible preferido por el hígado y en consecuencia desplaza a las grasas como fuente de energía, esto ocasiona un bloqueo en la oxidación de las grasas (Lieber, 1989), favoreciendo la acumulación de éstas en el hígado. b) el etanol también altera el estado redox secundario a la oxidación del etanol (NADH/NAD), promoviendo así la lipogénesis, a través del aumento de moléculas como el alfa glicerofosfato y promoviendo la formación de acilgliceroles (Lieber, 1989).

Se ha demostrado que la dieta induce cambios en la composición de la membrana plasmática (en ratones) en donde al ser alimentados con una dieta alta en ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico 18:2, por 4 semanas presentaron un aumento en el porcentaje de ácido araquidónico 20:4. Por otro lado las membranas plasmáticas de ratas alimentadas con grasas saturadas 16:0 y 28:0 presentaron un aumento en la proporción del ácido oleico (Hopkins y West 1977) .

Las membranas son más sensibles a los radicales libres hidroxilo cuando su composición está dada por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Burton y cols; 1990, L'Abbe' y cols; 1991) promotores de la lipoperoxidación, esto a su vez ocasiona la baja de las reservas antioxidantes como el glutatión en animal íntegro (Warren y cols; 1991).

Los altos niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico obtenidos en las células del grupo que recibió en la dieta mayor contenido de ácido linoléico (aceite de maíz), pueden reflejar la posible composición lipídica de las membranas celulares, Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el consumo de

lípidos de origen vegetal, como el de maíz que contiene ácidos grasos insaturados como el linoleico (18:2) en mayor porcentaje, y que son incluidos en la dieta al 5%, son capaces de modificar la respuesta al estrés oxidativo, inducido con etanol en las células hepáticas aisladas, sin utilizar necesariamente una dieta hiperlipídica. Al respecto existen reportes que indican que el ácido linoléico es esencial en el desarrollo de daño hepático causado por el etanol cuando se utilizan dietas hiperlipídicas (25%) en ratas (*Nanji y cols; 1989*).

Los cuales son más sensibles a los radicales libres hidroxilo cuando su composición está dada por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (*Burton y cols; 1990, L' Abbe' y cols; 1991*), promotores de la lipoperoxidación, esto a su vez ocasiona la baja de reservas antioxidantes como el glutatión (*Warren y cols; 1991*).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el consumo de lípidos de origen vegetal, como el aceite de maíz, que contienen ácidos grasos insaturados como el linoléico (18:2) en mayor porcentaje, y que son incluidos en un porcentaje del 5%, es capaz de modificar la respuesta al estrés oxidativo, inducido con etanol en células hepáticas aisladas, sin que se utilice necesariamente una dieta hiperlipídica. Otros reportes indican que el ácido linoléico es esencial en el desarrollo de daño hepático causado por el etanol cuando se utilizan dietas hiperlipídicas (25%) en ratas (*Nanji y cols; 1989*).

En las células hepáticas aisladas incubadas con etanol independientemente de la dieta administrada, se observó un aumento en el contenido de SRATB después de haberlas incubado una hora, dicho aumento puede deberse a que

existió el proceso de la lipoperoxidación y por ende de daño celular. La lipoperoxidación puede ser producto de la interacción entre los productos metabólicos del etanol y los ácidos grasos insaturados de la membrana celular (*Udrun y cols; 1994*).

Las células del grupo que consumió manteca de cerdo y que fueron incubadas con etanol presentaron un aumento significativo de SRATB al igual que las que consumieron aceite de maíz, el aumento de SRATB en el grupo que consumió aceite de maíz puede deberse a que el contenido de ácidos grasos insaturados se encuentra hasta en un 75%.

La manteca de cerdo presenta en su composición principalmente ácidos grasos saturados como el palmítico (16:0) y esteárico (18:0) e insaturados como el linoléico (18:2). Este último se ha reportado que aumenta marcadamente la lipoperoxidación hepática (*Nanji y cols; 1986*), además de aumentar el nivel de triacilglicerolos hepáticos (contienen ácidos grasos poliinsaturados principalmente), con los cuales forma ésteres de colesterol (*Tsai, 1975*). Además de que los ácidos grasos poliinsaturados agravan la susceptibilidad hepática a la lipoperoxidación.

Los datos obtenidos mostraron que las células hepáticas de las ratas que fueron alimentadas con la dietas que contienen mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados (aceite de maíz) presentaron mayor lipoperoxidación que se reflejó en una baja significativa ($p < 0.05$) de glutatión total. Un mecanismo que explica el daño hepático y el hígado graso es la peroxidación de los lípidos. En dicho proceso el acetaldehído producido durante el metabolismo del etanol, es capaz de unirse a la molécula de GSH hepático y a moléculas de cisteína (*Shaw y cols;*

1981), uno de los tres aminoácidos que constituyen al glutatión, lo cual explica de alguna forma las respuestas obtenidas en el presente trabajo. Otro mecanismo posible capaz de explicar los resultados obtenidos es la inhibición de la síntesis de GSH, lo que se refleja en la baja de glutatión hepático (*Speisky y cols; 1985*). También se ha reportado una disminución en la actividad de la glutatión transferasa durante la intoxicación aguda con etanol (*Kocak-Toker y cols; 1985*). Lo anterior se resume en la baja de glutatión que a su vez favorece la peroxidación (*Wendel y cols; 1979*).

Durante el metabolismo del etanol cuando el acetaldehído es transformado en acetato se genera NADH^+ , estos equivalentes reductores son utilizados por la cadena respiratoria par formar ATP, el exceso de NADH^+ en la cadena respiratoria en la mitocondria, puede desacoplar la fosforilación oxidativa, y algunos electrones salen de la cadena respiratoria, formando uniones con el oxígeno para convertirse en O_2^- (*Lehninger, 1993*).

También el acetaldehído llega a producir lipoperóxidos en el hígado de forma indirecta, a través de la depleción de GSH o durante su metabolismo (*Muller y Sies, 1983*).

En lo que se refiere a las células hepáticas incubadas con lactato 50mM, éstas presentan una disminución en las concentraciones de glutatión total, que es semejante a la reportada cuando las células son incubadas con etanol 50mM. Entre las condiciones metabólicas en las que existe aumento de lactato y una disminución de glutatión, quizá una de las mejor estudiadas es durante el ejercicio, a este respecto se conoce que cuando un organismo es sometido a un ejercicio

exhaustivo las concentraciones plasmáticas de lactato aumentan, de 1mM a 10mM y pueden aumentar hasta 15mM y 30 mM, cuando el ejercicio es supramaximo (*Groussard y cols; 2000*). También hay reportes que señalan concentraciones 30mM y 60 mM de lactato, después de una actividad muscular intensa (*Jacobs y cols; 1983*)

Otros autores (*Laaksonen y cols; 1999*) reportaron que los niveles de SRATB en plasma y GSSG en sangre aumentan en un 50% como respuesta al ejercicio, mientras que el GSH disminuye un 13 % (*Sastre y cols: 1992*). Durante el ejercicio, hay un máximo consumo de oxígeno, el lactato, piruvato y la relación lactato/piruvato aumenta significativamente (*Viña y cols; 2000*). Este aumento de lactato y del cociente lactato/piruvato se acompaña de una disminución del 60 % de GSH y del aumento del 100% en el contenido de GSSG sanguíneo (*Gohil y cols; 1988*)

.El mecanismo por el cual desciende el glutatión hepático probablemente este relacionado con una elevación de la actividad de la xantina-oxidasa, que coincide con el aumento de lactato durante ejercicio físico, la xantina-oxidasa puede generar un aumento en la producción de radicales libres tales como el O_2^- los cuales depletan el GSH y aumentan la formación de GSSG (*Viña y cols; 2000*).

La explicación exacta del porque disminuye el glutatión cuando aumenta el lactato como se observa en la gráfica 3 es difícil de precisar sin embargo la abundancia del glutatión (*Akerboom y cols; 1989*), la disponibilidad y la tendencia del glutatión reducido a mantener el equilibrio redox de varios pares de moléculas

que existen en forma reducida, lo hacen un metabolito clave en la homeostasis de las células hepáticas.

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en las células que recibieron manteca de cerdo incubadas con etanol mostraron mayor peroxidación y menor contenido de glutatión total, que las incubadas con sebo de res, a pesar de que su composición de ácidos grasos es similar, lo cual nos hace sugerir que el proceso de calentamiento al que se sometió la manteca de cerdo para ser extraída puede modificar su composición o bien generar algunas moléculas químicas que influyen en la respuesta celular. A este respecto algunos trabajos han dado a conocer que los aceites que han sido sometidos a procesos de calentamiento pueden presentar un alto contenido de productos de origen primario (lipoxi) que dan lugar a los de tipo secundario que son polímeros y carbonilos (*Chang y cols; 1978*).

Los productos primarios de la lipoperoxidación como son los peróxidos e hidroperóxidos son altamente tóxicos cuando se administran parenteralmente, y son menos tóxicos cuando se administran por vía oral, posiblemente debida a su baja absorción (*Kanazawa, 1985 y Findlay, 1970*) mientras que los productos secundarios como los compuestos aldehídos son mas tóxicos por ser altamente digestibles (*Oarada, 1986*). También se ha observado que las membranas de eritrocitos de ratas alimentadas con aceites calentados presentan menor fluidez (*Hayam, 1993*), esto sugiere que la incorporación de los productos de lipoperoxidación además de alterar la composición lipídica puede alterar la fluidez de la membrana repercutiendo en su estructura y función.

En el trabajo realizado por (Rocha, 1996) presenta evidencias de que el consumo de 5% o 15% de aceite de maíz provoca esteatosis univacuolar perilobulillar o centrolobulillar, respectivamente; y que después de una intoxicación aguda con etanol (5g/Kg) existió esteatosis multivacuolar, del hígado. Por último los resultados obtenidos en este trabajo, de los cortes histológicos de hígados sin exposición al etanol nos indican que existe esteatosis moderada y severa en hígados de ratas alimentadas con manteca de cerdo, como fuente de lípidos. Así mismo se presentó esteatosis moderada en los hígados de ratas alimentadas con aceite de maíz y en los hígados procedentes de ratas alimentadas con sebo de res se apreció esteatosis moderada o ausente.

RECOMENDACIONES

Por otro lado considero conveniente tratar de difundir estos conocimientos a nivel de las ciencias de la alimentación con objeto de que los aspectos que hemos investigado con éste trabajo puedan ser tomados en cuenta por los nutriólogos en la elaboración de dietas, específicas para pacientes hepáticos, que idealmente tendrían un bajo contenido de ácidos grasos insaturados.

Independientemente de el origen del estrés oxidativo, este puede potenciarse al consumir un gran porcentaje de grasas insaturadas.

En el trabajo realizado por (Rocha, 1996) presenta evidencias de que el consumo de 5% o 15% de aceite de maíz provoca esteatosis univacuolar perilobulillar o centrolobulillar, respectivamente; y que después de una intoxicación aguda con etanol (5g/Kg) existió esteatosis multivacuolar, del hígado. Por último los resultados obtenidos en este trabajo, de los cortes histológicos de hígados sin exposición al etanol nos indican que existe esteatosis moderada y severa en hígados de ratas alimentadas con manteca de cerdo, como fuente de lípidos. Así mismo se presentó esteatosis moderada en los hígados de ratas alimentadas con aceite de maíz y en los hígados procedentes de ratas alimentadas con sebo de res se apreció esteatosis moderada o ausente.

RECOMENDACIONES

Por otro lado considero conveniente tratar de difundir estos conocimientos a nivel de las ciencias de la alimentación con objeto de que los aspectos que hemos investigado con éste trabajo puedan ser tomados en cuenta por los nutriólogos en la elaboración de dietas, específicas para pacientes hepáticos, que idealmente tendrían un bajo contenido de ácidos grasos insaturados.

Independientemente de el origen del estrés oxidativo, este puede potenciarse al consumir un gran porcentaje de grasas insaturadas.

VIII CONCLUSIONES.

Los lípidos de la dieta modifican el daño celular promovido por agentes tóxicos como el etanol.

El alcohol estimula la lipoperoxidación, lo cual se magnifica con el consumo de grasas insaturadas.

La combinación de etanol y una dieta con alto contenido de ácido linoléico (aceite de maíz) promueve el aumento de triacilgliceroles en hepatocitos aislados.

Las dietas normolípídicas controladas con sebo de res mantienen las reservas antioxidantes, en hepatocitos aislados sometidos a una tensión oxidativa.

Los hígados de ratas alimentadas con dietas normolípídicas controladas presentan, diferente grado de esteatosis en función a la fuente de lípidos consumidos en donde existió, esteatosis moderada a severa con manteca de cerdo, moderada con aceite de maíz y moderada o ausente con sebo de res, sin ser sometidas a una tensión oxidativa.

IX BIBLIOGRAFIA.

1. American Institute of Nutrition (1997) *J.Nutr.* 107: 1340-1348.
2. Akerboom T.P.M. and Sies H. (1981) Enssay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione missed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, 77:373-382.
3. Akerboom T.P.M and Sies, H. (1989) Transport of glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrana. *Methods in Enzymology*,.173; 523-534.
4. Baldwin, S. And Parker, R. S.: (1986) The effects of dietary fat and selenium on developement of preneoplastic lesions in rat liver. *Nutr. Cancer.* 8:22-282.
5. Bernhard H.; Lauterburg, Charles V.; Smith, Héléen Rouach. (1991) Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced celular injury. *Free Radical Biology & Medicine* 12:219-240. USA.
6. Berry and Fried (1969) High-Yield preparation of insolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell .Biol.* 43:506-520.
7. Boleda, M.D.; Julia,P.;Moreno, A. Y Pares, X, (1989). Role of extrahepatic alcohol deshydrogenase in rat etanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 274:1101-1105.
8. Bourre, J. M.; Dumount, O.; Piciott, M.; Calaf, R.; Portugal, H.; Nalbone, G. And Lafont, H.; (1990) Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain an liver fatty composition. *Biochem. Biophys. Acta*, 1043: 149-152.

-
9. Bradford M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. ***Analy. Biochem.*** 72: 248-254. University of Georgia
 10. Burton K.P.; Morris, A.C.; Massey, K.D.; Buja, L.M.; and Hargler, H.K. (1990) Free radicals alteration in calcium levels and membrane phospholipid in culture rat ventricular myocytes ***J. Mol. Cell. Cardiol.*** 22:1035-1047.
 11. Caballero C.I. (1998) Modificación de los niveles de etanol y acetaldehído en sangre de ratas tratadas con agentes antiinflamatorios. UNAM Tesis M. en C. Biomédicas (Farmacología) 86pp. Mex.
 12. Chang, S.S.; Peterson, R. and Ho, C.T. (1978) Chemical Reactions Involved in the Deep-fat Frying of Foods, ***J. Am. Oil. Chem. Soc.*** 55, 718-7227.
 13. Comporti M. and Benedetti, A.; (1985) Biology of disease:lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. ***Lab. Inv.*** 53(6): 599-623.
 14. Danielsson, O.; Atrain, S.; Luque, T.; Hjelmquist, L.; González-Duarte, Jornavall, H. (1994) Fundamental Molecular differences between alcohol deshydrogenases classes. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** 91:494-498 USA
 15. Demoz, A.; Willumsen, N. And Berge, R. K.: (1991) Eicosapentanoic acid at hypotrygliceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defence in mice. ***Lipids.*** 27: 968-971.

-
16. Fernandez, V. and Videla, L.A (1980) Effect of acute and chronic ethanol ingestion on the content of reduced glutathione of various tissues of Rat *Experientia*. 37:392-394.
 17. Ferreira, R. (1984) Que son los radicales libres (RL) Antioxidantes y calidad de vida, Num 0 pp. 6-89, Mex.
 18. Findlay, G.M.; Draper, H.H.; and Bergan I.G. (1970) metabolism of 1-414C-Metyl Linoleate Hidroperoxide in the Rabbit *Lipids* 5(12):970-975.
 19. Fita I.; Silva, A.M.; Murthy, M.R.; Rosamann, M.G. (1986) The refined estructure of beef liver catalase at 2-5 a resolution, *Acta. Crist.* 42:494-515.
 20. Fraga César G, (1994) Los antioxidantes Num. 0 pp. 9-10, Méx.
 21. Gohil K, Virguie C. Sttanley W.C.; Brooxs G.A. parcker L. (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise *J. Appl Physiol* 64(1):115-119.
 22. Gottfried S.P.; and Roserberg B. (1973) Improved Manual Spectrophotometric Procedure for Determination of Serum Triglycerides. *Clinical Chemistry* 19(9):1077-1078.
 23. Groussard C.; Morel.; Chevanne M.;Cilard J.; y Delamarche A. (2000) Free radical scavenginn and antioxidant effects oh lactate ion; an in vitro study. *J Appl Physiol*.(89)169-175.
 24. Guinzberg R.; Laguna I.; Zentella A.; Guzman R.; Piña E. (1987) Effect of adenosine and inosine un ureagenesis in hepatocytes *Biochem J.* 245:371-374.

-
25. Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts, **FASEB J.** 1:358-364. USA.
 26. Hayam, I.; Cogan, U.; and Mokady, S. (1993) Dietary oxidized oil enhanced the activity of (Na⁺, K⁺) ATPase and Acetyl-Cholinesterase and lowers the fluidity of rat Erythrocytes membrane, **J. Nutr. Biochem.** 4:563-568.
 27. Hopkins G.J.; and West C.E. (1977) Diet-induced changes in the fatty acid composition of mouse hepatocyte plasma membranes **Lipids** 12(4):327-334.
 28. Huang, C.J. and Fwu, M.L. (1992) Protein insufficiency aggravates the enhanced lipid peroxidation and reduced activities of antioxidative enzyme in rats fed diets high in polyunsaturated fat. **J. Nutr.** 122: 1182-1189.
 29. Igelman Sunderberg, M.; Johansson (1984), J. Mechanism of hydroxyl radical formation and ethanol oxidation by ethanol-inducible and other forms of rabbit liver microsomal cytochromes P450. **J. Biol. Chem.** 259:6447-6458.
 30. Jacobs I.; Tesch P A.; bar-Or O.; karlsson J.; y Dontan R. (1983) Lactate in humans skeletal muscle after 10 and 30s of supramaximal exercise. **J Appl Physiol** 55:365-367
 31. Jandel Scientific (1994) Sigma Stat for Windows Ver. 1.0, Statical software user Manual. Varianza una vía (ANOVA), Student Newman Keuls y ., Jadel, San Rafael, USA.
 32. Kanazawa K.; Kanazawa, E., and Nataka. M.(1985) Uptake of Secondary autoxidation Products of linoleic Acid by the Rat. **Lipids.** 20:4122-419
 33. Kathrym, E.C.; Richard, D. B. (1989). Human metabolism of alcohol. **CRC**

-
34. Kocar-Toker N.; Uysal M.; Aykac G.; Sivas A.; Yalcin S. (1985) Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in the rat *Pharmacol. Res. Commun.* 17:233-239.
35. Kricka L.J. and P.M.S. Clark (1979) Biochemistry of Alcohol and Alcoholism Chapter 3. Adsorption, Excretion and Metabolism of Ethanol. *Halsted Press.* 30-47.
36. Kuratko, C. And Perce, B.C. (1992) Rat colonic antioxidant status: interaction of dietary fats with 1,2 dimethylhydrazine challenge. *J. Nutr.*122:278-282. Texas.
37. Laaksonen D.E.; Atalay M.; Niskanen L.; Usitupa M.; Hanninen O. Sen C.K. (1999) Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise induced oxidative stress in young men. *Redox Rep* (412):53-59.
38. Laguna- Piña (1991) Bioquímica cuarta edición, editorial, Acribia, México D:F 581pp.
39. Lapenna D.; Del Boccio G.; Porreca E.; Pennelli, A.; Mezzetti A.; DeGioia, S.; Marzio L.; Di Lio C.; y Cuccurullo F. (1992) Effects of high fat, cholesterol enriched diet on the antioxidant defence mechanisms in the rabbit heart. *Free Radic Res Commun* 17:87-96.
40. L'Abbè, M. R., Trick, K. D.; and Bears-Rogers, J.L. (1991) Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation *J. Nutr.* 121:1331-1340.

-
41. Laposta, E.A.; Lange, L.G. (1986) Presence of Nonoxidative Ethanol Metabolism in Human Organs Commonly Damaged by Ethanol Abuse. *Science*. 231:497- 499.
 42. Lehninger, A.L. (1993) Principios de Bioquímica segunda edición **Wort Publishers** Barcelona pp.. 241-244, 480-481.
 43. Lieber Charles S. (1989) Toxic and metabolic changes induced by ethanol, Chapter 3., Alcoholism Biomedical and genetic aspects. Edited by H. Werner Gosdde; Oharam P. Agarwal. Pergamon **Pres**, pp.57-83.
 44. Lieber, C. S. (a)(1991) Hepatic, metabolic and toxic effects ethanol : update, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 15: 573-592.
 45. Lieber, C.S. (b) (1991) Hepatotoxicology., Alcohol induced hepatotoxicity, Chapter 11 CRC Press Boca Raton, Boston London Ann. Arbor. 481–488
 46. Lieber C.S. (1994) Hepatic and Metabolic Effects of Ethanol: Pathogenesis and Prevention *Annals of medicine* 26:325-330.
 47. Mac Donalds C.M.; (1981) The effect of ethanol on hepatic lipid peroxidation: Potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine. *J and Clin Med* 98:417-425.
 48. Meister Alton (1983) Selective Modification of Glutathione Metabolism *Science*. 227:471-477, New York.
 49. Merck Index (1989): Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biological. onceava edición, editada por; Budavari, S. Mer & Co. Ratway, Ne Jersey.

-
50. Morrison y Boyd (1986) Química orgánica novena edición. editorial. Fondo Educativo Interamericano. pp.1035-1047
51. Muller, A.; Sies, H. (1983) Inhibition of ethanol and aldehyde induced release of ethane from isolated perfused rat liver by paragyline and disulfiram. ***Pharmacol Biochem Behav*** 18:49-4322.
52. Murray, R.K.; Mayer, P.A.; Rodwell V.W.; Granneu, D.K. (1988) Bioquímica de Harper. Ed. Manual moderno Edición 11ª 129-139. Mex. D.F.
53. Nalbone Giles.; Leonardi, J.; Termine E.; Portugal H., Lechence P., Pauli A.M; and Lafont H. (1989) Effects of oil corn oil and lard diets on lipoperoxidation status and glutathione peroxidase activities in rat heart. ***Lipids*** 24:179-186.
54. Nanji, A.A. M.D, FRCP and Samuel W. French M.D (1986) Dietary Factors and Alcoholic Cirrhosis, ***Alcoholism: Clinical and Experimental Research***.10(3):271-273.
55. Nanji A.A. (1989) Beef fat prevents alcoholic liver disease in the rat. ***Alcohol Clin. Exper. Res.***13(1): 15-9.
56. Nanji A.A. Zakim, D.; Rahemtulla A.; Daly, T.; Miao, L.; Zhao, S.; Khawal, S.; Tahan, T.R and Dannenberg, A.J. (1997) Dietary Saturated Fatty Acids Down-regulate Ciclooxygenasa-2 and Tumor Necrosis Factor α and Reverse Fibrosis in Alcohol- Induced Liver Disease in the rat. ***Hepatology*** 26(6);1539-1544. Boston, M.A.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

-
57. Nelson, D.R.; Kamatarki, T.; Woxman, D.J.; Coon, M.J.; Gunalus, J.C.; Gothogo.; Okuda, K.; Nehert, D.W. (1993) The 450 superfamily; update on new sequences gene mapping, accession numbers, early trivial numbers of enzymes, and nomenclatura. *DNA Cell. Biol.*12:1-5.
58. Newsholme, E.A. and Leech, A.R. (1983) *Biochemistry for the Medical Sciences*. Ed. Jhon Wiley 951pp.
59. Oarada, M.; Miyazawa, Z. and Kaneda, T. (1986) Distribution of ^{14}C after oral administration of (^{14}C) Labeled Methyl Linoleate hydroperoxides and their secondary oxidation products in rats, *Lipids* 221:150-154.
60. Pardo Vazquez. (1998) Mensaje Bioquímico. Depto. Bioq. Facultad de Medicina, UNAM pp 191-211.
61. Pimstein, N.P.; and Frech, S.W. (1984) Alcoholic liver disease. *Med. Clin. North. Am.* 68:39.
62. Riveros R.H.; Julian, S.A.; Piña, E. (1997) *Archives of Medical Research*. 28(4):453-471. México D.F.
63. Rocha H.A.E. (1996) Efecto del nivel de los lípidos sobre la relación glutatión reducido-glutatión oxidado (GSH/GSSG) hepático y sanguíneo en las ratas intoxicadas en forma aguda con etanol. Tesis de Doctorado, UNAM Division de posgrado e investigación Facultad de Medicina y Zootecnia.81pp. México D.F.

-
64. Rose, O.P.; Hartale, M.A.; Connolly, J.M. (1993) Effect of diet containing different levels of linoleic acid on acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. **Cancer Res.** 53:4686-4690
65. Sastre, J.; Asensi M.; gasco E.; Pallado FV.; Ferrero J:a; Furukawa T.; Viña J. (1992) Exhaustive exercise oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration **Am J Physiol.** 263:992-995.
66. Shaw, S.; Jayatilleke E. Ross, W.A.; Gordon E.R.; Lieber C.S. (1981) Ethanol induced lipoperoxidation. Potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine **J Lab Clin Med** 98:417-425.
67. Skuladóttir, V.G.; Shin-Hua Du, Brodie, E.A.; Reed J.D. and Wander, C.R. (1994) Effects of dietary Oils and Metghyl Ethyl ketona petoxidation and Antioxidants in rat Heart an Liver. **Lipids.** 29(5):351-357.
68. Speisky, Héctor Orrego. And Yedy Israel. (1982) Hepatic Glutatione metabolism alterations induced by alcohol consumption. Cap. 9 Vol. III **Human. Metabolism. of Alcohol .**
69. Speisky H, Mac Donald A, Giles G, Gunasekara A, Israel Y (1985) Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute athanol administration. **Biochem. J.** 25:565-572.
70. Stryer, L.(1981) **Metabolismo de los ácidos grasos**, Bioquímica. Ed. Reverte S.A 2ª edición. pp. 356-374. Barcelona.
71. Tsai, A.C. (1975) Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in liver of cholesterol-fed rats. **J. Nutr.** 105:946-951.

-
72. Udrun, V.S.; Hua, D.S.; Brode, A.E.; Donal J.R. and Rosemary C. Wander (1994) Effects of dietary oils an methyl ethyl ketone peroxide en in vivo lipoperoxidation and antioxidants in rat heart and liver. *Lipids* 29; 351-357.
73. Urchida, T.K.; Quispe-Sjggren an Peters, (1983) Alcoholic fomamy degeneración a pattern of agute alcoholic injury of liver. *Gastoenterology*,
74. Videla, L. A.; Fernandez, V. Ugarte, G.;Valenzuela A. (1980) Effects of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. *FEBS LETTERS.*, 111.6-10.
75. Videla, L.A.; and Valenzuela, A. (1982) alcohol ingestion, liver glutathione an lipoperoxidation: metabolic interrelation and pathological implications. *Life Sci.*, 31:2395-2407.
76. Videla L.A.; Fernandez, V.; Maris A. (1982) Liver Lipoperoxitative pressure and glutathione status following acetaldehyde and aliphatic alcohols 'pretreatments in the rat. 104(3): 965-970.
77. Videla L.A.:(1986) Efect of etanal, acetaldehyde and acetate on the antioxidat sensitive respiration in the perfused *Alchol* 3(3):163-167.
78. Viña J.; Hems, R.; Krebs, A.G. (1978). Maintenance of Glutathione Content in Insolated Hepatocytes. *Biochem, J.* 170:627-
79. Viña J.; Gimeno A.; Sastre J.; Desco C.; Asensi M.; Pakkardo F.V.; Ferreo A.J.; terada L.S.; y Repine J.E. (2000) Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rat; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol *Life* 49:539-544 España.

-
80. Warren, D.L. and Reed, D.J. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 45-52
81. Wendel, A.; Fenerstein, S.; Konz, K.H. (1979) Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation *in vivo* *Biochem Pharmacol* 28:2051-2055.
82. Yang, E.K.; Radiminska, A.; Winder, B.S.; Dannenber, A. J. (1993) Dietary lipids coinduced xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1168:52-58.
83. Zentella M. de Piña, Corona García, S.; Balmorí, Y. (1992a) Toxicidad del Oxígeno: Papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. Depto. Bioq, *Facultad de Medicina* UNAM. pp.87-93 Méx.
84. Zentella de Piña, M.; Rocha H.A.; Díaz, B.A. (1992b) Blood glutathione status in alcoholic liver disease, *Biochem. of Disease Congress Center*
85. Zentella de Piña, M. Saldaña. Balmori, Y.; Hernández-Tobías, A.; Piña, E. (1994) Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17(6): 1228-1232.
86. Zentella de Piña M. Díaz Belmont, A.; Rodríguez L. (1993) Importancia del polimorfismo en el metabolismo del etanol. *Rev. Hosp. Gen.* 56(3):113-124.
87. Zentella de Piña M.; Díaz Belmont, A.; Rodríguez, L. I.; Rocha Hernández, A.; Corona García, S. (1995) Glutathión Sanguíneo en el paciente alcohólico con hepatopatía *Rev. Med. Hosp. Gral.* 58(2):52-58.

-
88. Zentella M. de Piña y Yolanda Saldaña Balmori (1996) Papel Fisiológico de los Radicales Libres. *Boletín Educación Bioquímica*. Facultad de Medicina UNAM, 15(4):152-161. México D.F.

APENDICE I
Características químicas del glutatión (Akerboom, 1981).

<p>Glutacion reducido (GSH)</p> <p>γ-L-Glutamil-L-cisteinilglicina reducido</p> <p>$C_{10}H_{17}N_3O_6S$</p> <p>Peso molecular 307.3</p> <p>Estabilidad. GSH es estable indefinidamente estado cristalino y seco. En solución, GSH es oxidado a disulfido, especialmente a pH alcalino, en presencia de oxígeno atmosférico.</p> <p>Análisis</p> <p>Determinación enzimática con glioxilasa iodométricamente.</p> <p>Purificación requerida. 98% GSH; < 2 % GSSG.</p>	<p>Glutacion oxidado (GSSG)</p> <p>γ-L-Glutamil-L-cisteinilglicina oxidado</p> <p>$C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$</p> <p>Peso molecular 612.6</p> <p>Estabilidad. GSSG es temperatura ambiente</p> <p>Análisis determinación enzimática con glutatión reductasa con glutatión reductasa</p> <p>Purificación</p> <p>GSSG > 90%</p> <p>H_2O < 5%</p> <p>Solventes orgánicos.</p>
--	---

APÉNDICE II
Dieta semipurificada Instituto Americano de Nutrición AIN- 76 Elaborada por la ICN. Para rata y Ratón.
COMPOSICIÓN.

Caseína purificada	20.0%
Metionina DL	0.3%
Sacarosa	50.0%
Corn strach	15.0%
Alfacel no nutritivo	5.0 %
Aceite de maíz, manteca de cerdo o sebo de res	5.00%
Bitartrato de Colina	0.25%
Mezcla mineral AIN	3.5%
(Abajo en g/Kg de mezcla)	
Fosfato de calcio dibásico	500 g
Cloruro de sodio	74.00 g
Citrato de potasio monohidratado	220.00 g
Sulfato de potasio	52.00 g
Oxido de magnesio	24.00 g
Carbonato de manganeso(43-48% Mn	3.50 g
Citrato férrico (16-17% Fe)	6.00 g
Carbonato de Zinc (70 %ZnO)	1.60 g
Carbonato cobre (53-55%Cu)	0.30 g
Yodato de potasio.	0.01 g
Selenio sódico	0.01 g
Sulfato de potasio crómico	0.55 g
Sacarosa, pulverizada	118.00 g
Mezcla de vitaminas AIN	1.0%
(Abajo en g/Kg de mezcla)	
Hidrocloridro DE Tiamina	600.00 g
Riboflavina	600.00 g
Hidrochloridro de Piridoxina	700.00 g
Acido nicotínico	3.00 g
Pantotenato de calcio	1.6 g
Ácido fólico	200.0 mg
Biotina-D	20.0mg
Cianocobalamina (vit B ₁₂)	1.0 mg
Retinol Palmitato (Vit A)	
Pre-mezcla (250,000 IU/g)	1.6 g
DL- α -Tocoferol acetato	
(250 IU/gm)	20.0 mg
Colicalciferol(Vit D ₃)	
(4000 IU/gm)	250.0 mg
Menaquinona (vit K ₂)	5.0 mg
Sacarosa, finamente pulverizada	972.9 g

APENDICE III

Buffer ringer.krebs para hepatocitos.

Preparar las soluciones siguientes agregar las cantidades siguientes a un litro de agua desionizada.

KCl	5.75 %	6.51 ml	4.75mM
KH ₂ PO ₄	10.55 %	1.63 ml	1.25mM
MgSO ₄	19.1 %	1.63 ml	1.2mM
NaHCO ₃	6 %	12 ml	24mM

Adicionar para un litro de agua desionizada

NaCl. 7.4g 120Mm

Las condiciones de buffer pH entre 7.35-7.45 ajustar con NaHCO₃.

Temperatura 37° C, burbujear 15 minutos con carbógeno (CO₂ 5 % y O₂ 95 %)

Apartar 300 ml de Ringer-Krebs agregar 0.8 ml de (CaCl₂ a 7.85 %), que se utilizó para la incubación de hepatocitos.

APÉNDICE IV

Porcentaje de ácido grasos presentes en los lípidos de la dieta reportados por Morrison 1986.

ACIDO GRASO	ACEITE DE MAIZ	MANTECA DE CERDO	SEBO DE RES
12:0	-	-	0.2
14:0	0-2	1	2-3
Palmítico 16:0	8-10	25-30	25-30
Estearico 18:0	1-4	12-16	21-26
Oleico 18:1	30-50	41-51	39-42
Linoleico 18:2	34-56	3-8	2