

21-119



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

EFFECTO DE UNA DIETA A BASE DE HARINA DE
ALGODON SOBRE LA ACTIVIDAD DE DESHIDROGENASA
LACTICA (LDH) Y DESHIDROGENASA MALICA (MDH)
EN DIVERSOS ORGANOS DE RATAS MACHO

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

presenta

LAURA MOTA BUSH

MEXICO, D. F.

1983



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.

INDICE

INTRODUCCION	2
Estructura y Propiedades Químicas del Gosipol	4
Toxicidad del Gosipol	6
Efecto Antifertilizante del Gosipol	8
Efectos Bioquímicos del Gosipol	11
Papel de la Deshidrogenasa Láctica y la Deshidrogenasa Málica en el Metabolismo Energético	12
Hipótesis	15
Objetivos	15
MATERIALES Y METODOS	17
Determinación de Deshidrogenasa Láctica	21
Determinación de Deshidrogenasa Málica	23
Determinación de Proteínas Totales	24
Electroforesis de Isoenzimas de LDH	25
Obtención de Resultados	27
RESULTADOS Y DISCUSION	29
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA	51

INTRODUCCION

Cuando se habla de la importancia de la planta de algodón, se piensa casi siempre en la obtención de la fibra y raramente en su importancia dentro de la industria alimenticia, ya que de la semilla de algodón se obtienen: el aceite que se utiliza casi exclusivamente para consumo humano y la fibra residual de semilla de algodón que se utiliza actualmente como un suplemento proteínico en dietas balanceadas para animales (Smith, 1970).

En análisis hechos a la semilla de algodón, se ha encontrado que ésta es rica en proteína, alrededor de 26% de proteína cruda. Y dado que el algodón crece bien en zonas tropicales y subtropicales dando una gran producción y siendo precisamente estas zonas en las que la desnutrición proteínica es más común, se pensó en la harina de semilla de algodón como una de las fuentes de proteína adicional más prometedoras en la prevención de la desnutrición humana (Clawson *et al.*, 1975).

Varias instituciones han estudiado el posible empleo de la harina de semilla de algodón en la alimentación. Por ejemplo el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), desarrolló la "incaparina" que es un alimento que contiene 38% de harina de semilla de algodón (Béhar & Bressani, 1971). Se ha observado que el uso de esta harina con niños pequeños bajo control médico durante dos años, produjo una disminución de la desnutrición proteínica que existía (Bressani,

1980).

En este mismo Instituto se realizaron estudios de complementación entre las proteínas de la harina de semilla de algodón y semillas de leguminosas dentro del programa llamado Mezclas Vegetales para Consumo Humano (Elías, 1969).

También se puede citar como ejemplo al Departamento de Alimentos y Nutrición de la Universidad Tecnológica de Texas, en donde se realizaron estudios en los que se aumentó substancialmente el valor nutricional de las tortillas de maíz, cuando fueron suplementadas con harina de semilla de algodón en un 20 a 25% (McPherson & Ou, 1976).

A pesar de lo útil que parece lo anterior, el uso de la harina de semilla de algodón en las dietas, ha tenido que ser restringido debido a que la semilla de algodón presenta un compuesto tóxico, el cual resulta dañino a los animales monogástricos que lo ingieren, incluyendo al hombre. A este compuesto se le dió el nombre de gopiol el cual es una substancia amarillenta presente en las plantas de algodón del género *Gossypium*. El nombre de gopiol se derivó de "*gossyp(ium)-phenol*" indicando así su origen y su naturaleza química (Adams & Geissman, 1976). Este compuesto ha sido aislado de la semilla, raíz, tallo, hojas, flores y capullos tiernos y maduros, encontrándose que la semilla es la que tiene la mayor proporción (Sotelo *et al.*, --- 1982).

En la semilla de algodón, el gopiol se encuentra contenido en unas glándulas pigmentadas que constituyen del 20 al 40% del peso de la misma. En un corte transversal de la almendra de la semilla se pueden observar las glándulas del pigmento como puntos oscuros relativamente grandes, cuerpos esféricos

ovoides de 100 a 400 micras de longitud (Yang & Davis, 1976).

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUIMICAS DEL GOSIPOL

La fórmula molecular propuesta para el gosisol es : $C_{30}H_{30}O_8$ que equivale a 1,1',6,6',7,7'-hexahidroxi-5,5' diisopropil-3,3' dimetil-(2,2' binaftaleno)-8,8' dicarboxialdehído. Este compuesto tiene un peso molecular de 518.54 y es polimórfico ya que cuando se ha cristalizado a partir de éter su punto de fusión es de 184°C, a partir de cloroformo es de 199°C y a partir de ligroína es de 214°C (Edwards, 1970).

Se han descrito tres derivados del gosisol que son: el compuesto formado por la pérdida de dos moléculas de agua llamado anhidrogosisol $C_{30}H_{26}O_6$; el compuesto formado por la acción de un álcali fuerte que presenta dos átomos de oxígeno y de carbono menos que el gosisol llamado apogosisol $C_{28}H_{30}O_6$ y el compuesto formado por anilina y gosisol llamado dianilina-gosisol $C_{42}H_{40}N_2O_6$ (Edwards, 1970).

La molécula de gosisol contiene dos grupos aldehído y seis grupos hidroxilo que son fuertemente ácidos y reaccionan fácilmente con aminas para formar bases de Schiff. El gosisol también forma quelatos con cationes. Es un compuesto insoluble en agua pero forma sales en soluciones alcalinas y es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Debido a que existen muchos productos de reacción se han propuesto tres formas tautoméricas del gosisol: aldehído, hemiacetal y quinóide, siendo el aldehído la forma predominante en muchos compuestos orgánicos (figura 1) (Adams & Geissman, 1976).

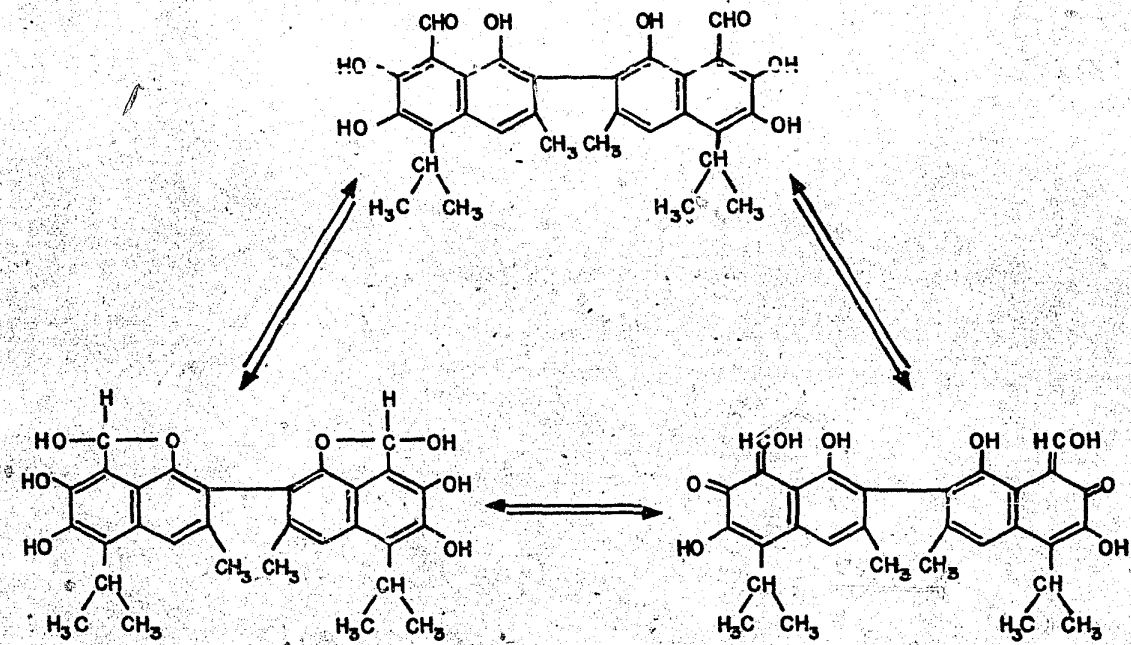


Fig.1. Formas tautoméricas del Gossipol

TOXICIDAD DEL GOSIPOL

Cuando la proteína de las dietas para animales monogástricos proviene en su mayor parte de la harina de semilla de algodón, se reduce el crecimiento de los animales observándose también una alta mortalidad. Una forma de disminuir esto es un proceso de calentamiento en el cual las glándulas de resina se rompen y el gopisol contenido se esparce sobre la proteína de la semilla. El gopisol se une a proteína, principalmente al aminoácido lisina, reduciendo la liberación de nitrógeno y las propiedades nutritivas de la proteína, por lo tanto si bien se reduce la toxicidad, también se reduce la calidad nutricional (Clawson *et al.*, 1975).

En estudios con animales rumiantes se ha visto que el gopisol de la dieta, no produce ningún efecto tóxico debido a que la fermentación que se lleva a cabo en el rumen vuelve inerte al gopisol. La tolerancia al gopisol en aves, depende de la edad de éstas, el tipo de ave, el nivel de proteína en la dieta y otros componentes de la misma. Se ve que pueden resistir niveles hasta 150 partes por millón (ppm) (0.015%). Los requerimientos nutricionales de un ave ponedora, se pueden satisfacer con una dieta de harina de algodón hasta con 50 ppm de gopisol sin que se presente decoloración en la yema (Smith, 1970).

Con base en una dosis oral simple, se determinó que la dosis letal media (LD_{50}) para ratas, es de 2,400 a 3,340 mg/Kg cuando se administra en agua y alrededor de 10% más tóxico cuando se administra en aceite (Abou-Donia, 1976).

Los síntomas del efecto tóxico del gopisol en animales monogástricos son: pérdida de apetito, pérdida de peso, hipo-

protrombinemia, diarrea, decoloración del pelo, baja de hemoglobina, disminución en la cuenta de células rojas y proteínas de suero, fluido edematoso en cavidades del cuerpo como corazón y pulmones, cambios degenerativos en hígado y bazo así como hemorragias en hígado, estómago e intestino delgado (Singleton & Kratzer, 1973).

La cantidad máxima de gossypol libre para consumo humano permitida por los organismos internacionales es de 0.06%. A esta dosis se ha dicho que el gossypol no ejerce sus efectos tóxicos sobre el organismo. El gossypol libre presente en las harinas de algodón comerciales varía entre 0.02 y 0.1% y el total entre 0.5 y 1.2% (Singleton & Kratzer, 1973). Esto hace necesario estudiar los efectos tóxicos que pueda tener el uso de la harina de semilla de algodón como suplemento proteínico en las dietas.

La absorción, distribución y excreción del gossypol ya había sido estudiada (Abou-Donia *et al.*, 1970). Se encontró que la vida media del gossypol en el tracto gastrointestinal es de 9.6 horas, lo que indica una lenta absorción. Se administró gossypol marcado con C¹⁴ a ratas y se vió que se tardaban hasta diecinueve días en eliminar el 97.24% del gossypol ingerido, lo cual sugirió además que con administración continua podría haber una acumulación en el cuerpo, debida a lo lento de su eliminación.

Tone y Jensen en 1976 midieron el contenido del gossypol en varios órganos observando que la mayor concentración se encontraba en el hígado, sin embargo en testículo la cantidad de gossypol era mínima. Esto último es interesante debido a que recientemente se ha descrito un efecto antifertilizante del gossypol.

EFFECTO ANTIFERTILIZANTE DEL GOSIPOL

El efecto antifertilizante del gossypol en animales machos se sugirió recientemente en la República Popular China, -- cuando en un estudio epidemiológico se vió que en ciertas áreas había mayor número de casos de infertilidad que los esperados y descartando que esto se debiera a causas medioambientales, se propuso que la causa estuviera en los alimentos. Luego de algunas investigaciones se demostró que el aceite de semilla de algodón era el causante, debido a que recientemente se había cambiado su proceso de obtención: primero se hacía la extracción calentando previamente las semillas y se cambió a un proceso en que se suprimía el calentamiento. Aquellos hombres que ingirieron el aceite crudo por períodos mayores a un año presentaron infertilidad, la cual resultó reversible poco después de dejar de ingerir el aceite crudo (N.C.G.M.A.A., 1978).

Estas observaciones dieron lugar a investigaciones sobre el gossypol como posible agente antifertilizante y se iniciaron los estudios a nivel de laboratorio. Estos estudios se hicieron utilizando gossypol puro en tres diferentes tipos de preparación que fueron: gossypol, ácido acético gossypol y ácido fórmico gossypol preparados para estudios clínicos. Después de una administración oral del gossypol o de ácido acético gossypol en dosis de 15 a 40 mg/Kg/día durante dos a cuatro semanas a ratas macho, éstos se volvieron infértiles. La rapidez con que se logra la infertilidad depende de la dosis aplicada.

En estos mismos estudios se observó que después de la administración de gossypol tenían lugar una serie de cambios citológicos en el epitelio seminífero de los testículos de la ra-

ta. Algunos de los cambios observados fueron: vacuolas en el núcleo e hinchamiento de las espermátidas. Cambios como picnosis, cariorrexis o citólisis se presentaban tanto en espermátidas como en espermatoцитos. Se observó exfoliación de las células del epitelio germinal con la descamación resultante y la formación de células gigantes multinucleadas derivadas de espermátidas y espermatoцитos. El epitelio germinal sufrió una reducción progresiva en sus capas celulares y una asincronía en la asociación celular en los túbulos. Sólo una capa de células de Sertoli y espermatogonias quedó en los túbulos.

En el epidídimo se encontraron espermátidas y espermatogonias exfoliadas y numerosos espermatozoides muertos, muchos de los cuales tenían las cabezas y colas separadas. La cuenta de espermatozoides fue disminuyendo hasta llegar a la azoospermia.

El gopipol fue clínicamente utilizado por primera vez en 1972 como un agente antifertilizante masculino cuando le fue administrado a cuatro mil chinos saludables, por períodos mayores a seis meses, llegando a alcanzar algunos hasta cuatro años de tratamiento. La dosis usada fue de 20 mg/día durante los primeros dos meses de tratamiento para producir la infertilidad y después se mantuvieron con una dosis de 150 a 220 mg/mes en dosis divididas. Los efectos observados fueron: disminución del porcentaje de espermatozoides móviles y aumento de espermatozoides mal formados hasta alcanzar azoospermia; espermátidas y espermatoцитos multinucleados exfoliados, espermatozoides con alteraciones ultraestructurales como acrosomas dañados, nucleoplasma menos condensado, desarreglo e hinchamiento de la vaina

espiral de las mitocondrias y disminución o ausencia de crestas. Histoquímicamente se reportó una disminución en la deshidrogenasa succínica y la deshidrogenasa láctica de la pieza media del espermatozoide. Al suspender el tratamiento el número y morfología de los espermatozoides se recuperó en tres meses (N.C.G.M.A. A., 1978).

Los efectos antifertilizantes del gosipol encontrados por los científicos chinos, han sido corroborados por estudios hechos en otros laboratorios. Por ejemplo, la pérdida de movilidad de los espermatozoides debida a la desorganización de la vaina mitocondrial y a la ausencia de elementos celulares de la pieza media del espermatozoide fue reportada por Nadakavukaren *et al.*, en 1979.

* Los estudios hechos por Chang *et al.* en 1980 y Waller *et al.* en 1981 en hamsters, mostraron que hay una inhibición total de la fertilidad cuando se han tratado con una dosis de ácido acético gosipol de 5 mg/Kg/día por un lapso de ocho a diez semanas y que la fertilidad se recupera después de cuatro semanas de terminado el tratamiento.

Estudios hechos "*in vitro*" sobre el efecto espermicida del gosipol en espermatozoides humanos, mostraron que los espermatozoides fueron inmovilizados rápidamente por el gosipol, posiblemente por un efecto directo de éste sobre la enzima respiratoria adenosin-trifosfatasa (ATPasa) que se encuentra en las mitocondrias de la pieza media (Kalla & Vasudev, 1980 y Cameron *et al.*, 1982).

EFECTOS BIOQUIMICOS DEL GOSIPOL

Establecido ya el efecto antifertilizante del gopipol, se han llevado a cabo diversos estudios a distintos niveles, tratando de encontrar la manera en que el gopipol actúa en el organismo para causar la esterilidad.

Se ha observado que su uso no modifica al ADN total ni a las proteínas, sino que más bien los cambios registrados parecen limitarse principalmente a las enzimas involucradas en el metabolismo energético (Kalla *et al.*, 1981).

Se ha reportado por ejemplo que el gopipol inhibe la actividad de las enzimas oxidativas, ocasionando el desacoplamiento de la cadena respiratoria, inhibiendo así la producción de energía (Abou-Donia & Dieckert, 1974), observándose que el tratamiento con gopipol inhibe la actividad de la ATPasa en el hígado y en el testículo.

En los estudios hechos por los investigadores chinos se observó disminución de la deshidrogenasa succínica y de la deshidrogenasa láctica de la pieza media del espermatozoide, ambas enzimas de vital importancia en el metabolismo energético (N.C. G.M.A.A., 1978).

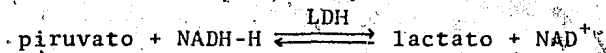
Aparentemente el efecto inhibitorio del gopipol se hace más patente sobre la LDH-X que se encuentra presente en espermatozoides y células de los testículos maduros. El gopipol parece ser un inhibidor competitivo de un cofactor que es necesario para la actividad enzimática, lo cual produce inhibición de la producción de espermatozoides (Tso & Lee, 1982). También se ha reportado un efecto en otras enzimas energéticas, como la deshidrogenasa málica que se observó inactiva en el testículo de roedo-

res (Maugh, 1981).

El daño en la deshidrogenasa láctica (LDH), y en la deshidrogenasa málica (MDH), puede tener graves repercusiones ya que intervienen en las dos vías energéticas, la anaeróbica y la aeróbica.

PAPEL DE LA DESHIDROGENASA LACTICA Y LA DESHIDROGENASA MALICA EN EL METABOLISMO ENERGETICO

La deshidrogenasa láctica (LDH) cataliza la reacción final de la glucólisis en la que el piruvato se reduce a lactato a expensas de los electrones cedidos originalmente por el gliceraldehído-3-fosfato al NAD^+ . Estos electrones son transportados hasta esta última etapa en forma de NADH_2 . La reacción es la siguiente:



La glucólisis es el proceso por el cual los organismos degradan a la glucosa hasta ácido láctico en ausencia de oxígeno molecular, con objeto de obtener energía química en forma de ATP. La glucólisis es la fermentación anaerobia que se produce en células de animales superiores, muchas plantas y microorganismos (figura 2).

La deshidrogenasa láctica se presenta en animales en cinco formas moleculares llamadas isoenzimas, separables por electroforesis. Las cinco isoenzimas están constituidas por combinaciones de dos clases diferentes de cadenas polipeptídicas denominadas M y H, cada una de las cuales tiene un peso molecular de 33,500. Difieren en su composición y secuencia de aminoácidos.

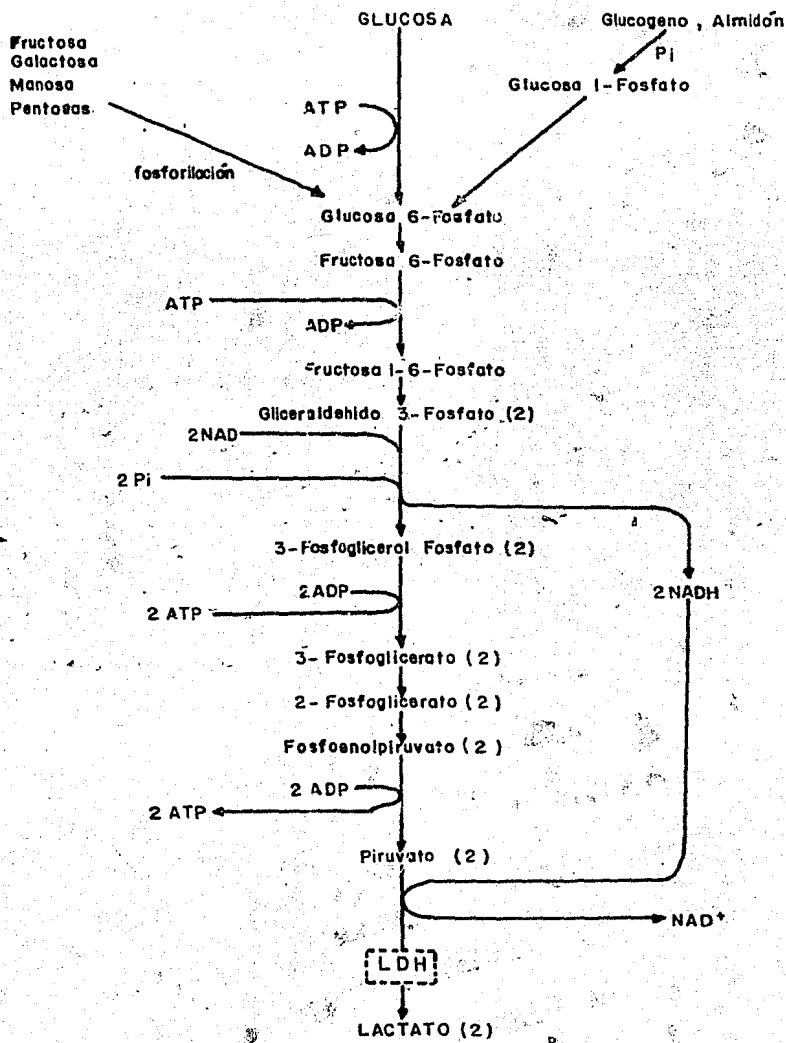
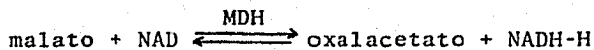


Fig. 2- Glucólisis

Las cinco formas contienen cuatro cadenas polipeptídicas. La -- isoenzima que predomina en músculo esquelético posee cuatro cadenas M idénticas (M_4) y la de corazón cuatro cadenas H (H_4). Las deshidrogenasas lácticas de otros tejidos son híbridos constituí dos por mezclas de cadenas M y H ; es decir, M_3H , M_2H_2 , MH_3 . Estas isoenzimas difieren significativamente en sus velocidades máximas y en sus constantes de Michaelis. La isoenzima M_4 predomina en los músculos que se utilizan intermitentemente, mientras - que la isoenzima H_4 predomina en el corazón y en otros músculos que trabajan de modo continuado (Cahn, 1962).

Cuando existe daño celular en algún tejido las diferentes isoenzimas de la LDH se liberan al torrente sanguíneo, por - lo cual haciendo un análisis electroforético del suero, se puede llegar a detectar un daño celular en un tejido específico. Este método se ha usado en experimentos en los que se produce infarto al miocardio, aplicando torniquetes y produciendo así células isquémicas en las cuales aumenta la permeabilidad de la membrana - celular, provocando la salida de las enzimas citoplásmicas al medio extracelular (Sáez *et al.*, 1982).

La deshidrogenasa málica (MDH) interviene en la última - reacción del ciclo de Krebs, catalizando la oxidación del malato a oxalacetato según la siguiente reacción:



El ciclo de Krebs es la ruta común final dentro de la -- respiración aeróbica en la que convergen, en último término, las moléculas combustibles principales de las células como los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, durante el catabolismo --

(figura 3) (Lehninger, 1975).

La posibilidad de que estas enzimas se vean afectadas resulta de gran importancia para el buen funcionamiento celular, lo que podría tener graves repercusiones en el organismo.

Al existir el antecedente de que el gosipol disminuye la actividad de LDH-X y MDH del testículo, surgió la interrogante si en otros tejidos estas enzimas se encontraban afectadas, es por ello que se plantearon la siguiente hipótesis y objetivos.

HIPOTESIS

El gosipol presente en la harina de algodón no sólo es capaz de inhibir la actividad de LDH y MDH en testículo, sino también en otros órganos como músculo, corazón e hígado.

OBJETIVOS

Determinar si la ingestión de harina de algodón produce una inhibición de la actividad de LDH en forma similar a cuando se administra gosipol puro en testículo y otros órganos; y si este daño es reversible cuando se ha dejado de ingerir dicha harina.

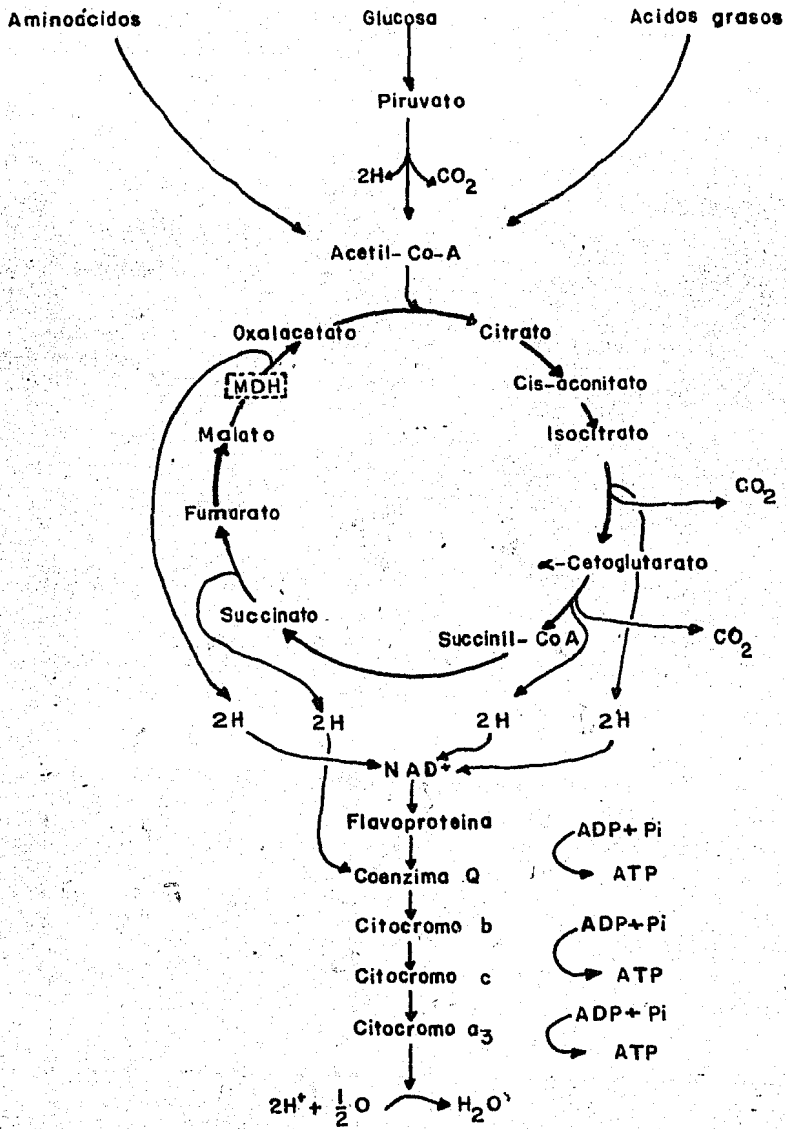


Fig. 3- Ciclo de Krebs y Cadena Respiratoria.

MATERIALES Y METODOS

Animales.- Se utilizaron veinticinco ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de doce semanas de edad y 350 gramos de peso aproximadamente, proporcionadas por el Bioterio del Centro Médico Nacional del IMSS. Las condiciones que hay en este Bioterio son: luz/obscuridad 12/12, temperatura 21°C, humedad relativa de 45 a 50% y diez a quince cambios de aire por hora.

Dietas.- A los animales control se les alimentó con Purina Chow de Purina Laboratories y a los animales experimentales se les preparó una dieta balanceada a base de harina de algodón. La semilla para la elaboración de la harina fue proporcionada -- por Albamex. Esta semilla se molió en un molino Arthur H. Thomas Co. Scientific Apparatus y se pasó por una malla del número 20, una vez hecho esto se utilizó la harina. La dieta que se preparó fue la siguiente:

Nutrientes	gr/100 gr de dieta
Purina	21.73
Harina de algodón	24.24
Sacarosa	20.1
Glucosa	19.0
Dextrina	3.89
Manteca	8.0
Sales minerales	1.04
Mezcla de vitaminas	2.0

Los nutrientes utilizados fueron: sacarosa comercial, - glucosa de E. Merck Harmstadt, dextrina de Aranal, S. A., mante- ca vegetal comercial, sales minerales de Rogers & Harper y mez- cla de vitaminas de Teklad Test Diets.

El contenido de gosispol en esta dieta fue de 95 mg/100 gr de dieta. Esta cantidad ya había sido determinada con ante- rioridad en el laboratorio (Sotelo *et al.*, 1982).

Para lograr desnutrir a los animales se utilizó una die- ta hipoproteica cuyo contenido era el siguiente:

Nutrientes	gr/100 gr de dieta
Caseína	0.0
Sacarosa	20.1
Glucosa	19.0
Dextrina	29.57
Manteca	8.0
Aceite	6.0
Sales minerales	4.0
Mezcla de vitaminas	2.0
Celulosa	11.33

Los nutrientes utilizados fueren: sacarosa comercial, - glucosa de E. Merck Harmstadt, dextrina de Aranal, S. A., mante- ca vegetal comercial, aceite de maíz comercial, sales minerales de Rogers & Harper, mezcla de vitaminas de Teklad Test Diets y celulosa Fiber Cellulose Type, de Teklad Test Diets, Madison, Wis.

Los animales se distribuyeron en tres grupos: dos ex-

perimentales y uno control. De los animales experimentales el primer grupo se alimentó con una dieta balanceada en la que la proteína era aportada 50% por harina de algodón y 50% por Chow Purina, el segundo grupo se alimentó con una dieta hipoproteica y el grupo de animales controles se alimentó exclusivamente con Chow Purina.

Se colocó cada rata debidamente marcada e identificada con su alimento y su bebedero en jaulas individuales. Las ratas se pesaron al inicio del experimento y después dos veces por semana durante las cuatro semanas que duró el tratamiento. Igual control se siguió con el alimento pesando la cantidad inicial que se colocó en el comedero y lo que consumían hasta la siguiente vez que se pesaban y volviendo a pesar la nueva cantidad de alimento. Esto se hizo con el fin de registrar los cambios en peso que tenían los animales y la cantidad de alimento consumido para saber cuánto gosispol había sido ingerido.

Al término del tratamiento de cuatro semanas se hizo el primer sacrificio de animales, tres experimentales del primer grupo, tres experimentales del segundo grupo y dos controles. El resto de los animales del primer grupo y los animales controles se dejaron con alimentación a base de Chow Purina durante catorce semanas más, en períodos de recuperación sucesivos de seis, diez y catorce semanas posteriores a la suspensión de la dieta. En cada ocasión se sacrificaron tres animales experimentales y dos controles. Los dos animales restantes del segundo grupo experimental se dejaron con alimentación a base de Chow Purina, durante seis semanas más de recuperación al cabo de las cuales se sacrificaron.

En cada sacrificio se anestesió a los animales con dos tipos de anestésico combinados:

a) Droperidol.- Este compuesto produce actividad antiemética, se le considera como un compuesto neuroléptico lo cual significa que produce un estado de quiescencia con actividad motora reducida, ansiedad reducida e indiferencia al medio externo. Se utilizó una dosis de 0.100 mg/100 gr de peso (Goodman, 1980).

b) Ketalar o Clorhidrato de Ketamina.- Este compuesto se usa para inducir anestesia disociativa o sea que el sujeto tiene un fuerte sentido de disociación respecto al ambiente y además produce analgesia prolongada. Este se utilizó en una dosis de 8 mg/100 gr de peso (Goodman, 1980).

Se combinaron ambos compuestos para adormecer al animal y a la vez quitarle la sensibilidad al dolor. Para ello se pesaba al animal y de acuerdo con su peso se calculaban las dosis que se le iban a inyectar (Goodman, 1980).

Cuando se veía que el animal estaba ya bajo el efecto de la anestesia, se procedía a abrirlo a la altura del tórax y con una jeringa estéril sin anticoagulante se extraía la sangre, la mayor cantidad posible, directamente del corazón que aún bombeaba.

Inmediatamente después de extraerla se vació en tubos de ensaye y se centrifugó a 1,500 rpm en una centrífuga International Refrigerated Centrifuge Modelo PR-6 de International Equipment Co. a 20°C durante diez minutos. Al sacar los tubos de la centrífuga se separó el suero con una pipeta Pasteur y se metió al refrigerador (4°C).

Después se hizo la disección del animal y se obtuvieron

de ahí muestras de hígado, músculo, corazón y testículo y de estas muestras se pesaron 0.5 gr de cada una.

Las muestras de tejido ya pesadas se cortaron en pedacitos y con 5 ml de agua destilada fría se homogenizaron dándoles quince golpes con un taladro Skil modelo 550 M de Skil Tools de México, S. A. de C. V. -de 1 de pulgada que da 2,500 rpm. Los tubos de los homogenados se mantuvieron en hielo.

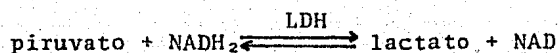
Las muestras ya homogenadas se diluyeron en la siguiente proporción: hígado, músculo y corazón 1:20 o sea 0.1 ml del homogenado en 0.19 ml de agua destilada y el testículo 1:10 o sea 0.1 ml del homogenado en 0.9 ml de agua destilada.

A las muestras ya diluídas se les hicieron las siguientes determinaciones:

- a) Determinación de deshidrogenasa láctica (LDH).
- b) Determinación de deshidrogenasa málica (MDH).
- c) Determinación de proteínas totales.
- d) Electroforesis de isoenzimas de LDH (sólo a las muestras de suero).

DETERMINACION DE DESHIDROGENASA LACTICA (LDH)

La deshidrogenasa láctica cataliza la reduccion de piruvato por el nicotinamida adenín dinucleótido en su forma reducida (NADH_2) según la siguiente ecuación:



Para la valoración cuantitativa de la enzima se deja ag

tuar la muestra problema sobre piruvato y NADH_2 y se mide fotométricamente la velocidad de la reacción. El NADH_2 se lee a 340 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss, PMQ II y conforme se oxida a nicotinamida adenín dinucleótido en su forma oxidada (NAD) la lectura va disminuyendo (Wroblewski & LaDue, 1955).

REACTIVOS:

Esta prueba se realizó con dos tipos de reactivos diferentes: reactivos de Merck para la determinación de LDH de hígado, músculo y testículo y reactivos de Sigma para la determinación de LDH de corazón. Los reactivos fueron:

Piruvato de sodio 0.6 mM

NADH_2 0.18 mM

Buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.5

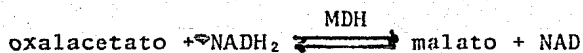
METODO:

- 1.- Debido a que las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C para evitar la desnaturalización de las enzimas, -- tanto las muestras como los reactivos tenían que alcanzar una temperatura constante de 25°C , lo cual se logró incubando los viales con reactivos en un baño a esa temperatura y la cámara del espectrofotómetro también a esa temperatura.
- 2.- Se agregó al vial de NADH_2 2.8 ml del buffer de fosfatos.
- 3.- Se agregó 0.1 ml de solución stock de piruvato de sodio.
- 4.- Se agregó 0.1 ml de la muestra a viales por duplicado.
- 5.- Se leyó inmediatamente en el espectrofotómetro a 340 nm

en luz visible cada treinta segundos durante tres minutos.

DETERMINACION DE DESHIDROGENASA MALICA (MDH)

La deshidrogenasa málica cataliza la reducción de oxalacetato por el NADH_2 según la siguiente reacción:



La valoración se hace midiendo fotométricamente la velocidad de la reacción (Siegel & Bing, 1956).

REACTIVOS:

Los reactivos utilizados para esta prueba fueron de la casa Sigma Chemical Co.:

NADH_2 0.18 mM

Buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.5

Solución de ácido oxalacético 10 mg/10 ml de agua fría

METODO:

- 1.- Se puso en viales de NADH_2 por duplicado 2.8 ml del -- buffer de fosfatos y 0.1 ml de la muestra.
- 2.- Se dejó veinte minutos a 25°C en un baño.
- 3.- Se agregó 0.1 ml de solución de ácido oxalacético.
- 4.- Se leyó inmediatamente en un espectrofotómetro Carl --- Zeiss, PMQ II a 340 nm cada treinta segundos durante -- tres minutos.

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

Se realizó por el método colorimétrico de Lowry modificado por Hartreé (Hartreé, 1972), basado en la formación de un complejo de cobre, sodio y potasio con el reactivo de Folín-Ciocalteu.

REACTIVOS:

A. Tartrato de sodio y potasio	2.0 gr
Carbonato de sodio	100.0 gr
Hidróxido de sodio 1M	500.0 ml
Ajustar con agua destilada a un litro.	

B. Tartrato de sodio y potasio	2.0 gr
Sulfato de cobre	1.0 gr
Hidróxido de sodio 1M	10.0 ml
Agua destilada	90.0 ml

C. Reactivo de Folín-Ciocalteu	1.0 ml
Agua destilada	15.0 ml

Todos los reactivos fueron adquiridos de la casa Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri, U. S. A.

METODO:

- 1.- Se colocaron alícuotas por duplicado de 0.1 ml de muestra en tubos de ensaye de 15 ml.
- 2.- Se diluyó con 0.9 ml de agua destilada para tener un volumen final de 1 ml.
- 3.- Se agregó 0.9 ml del reactivo A a cada tubo.

- 4.- Se incubó diez minutos a 50°C y se dejó enfriar doce minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Se añadió 0.1 ml del reactivo B y se dejó reposar diez minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Se añadió 3 ml del reactivo C, se incubó cinco minutos a 50°C, se agitó y dejó enfriar a temperatura ambiente.
- 7.- Se leyó en un colorímetro Coleman, Modelo 6-35 a 500 nm.

CURVA ESTANDAR DE ALBUMINA DE SUERO DE BOVINO

- 1.- Se toman alícuotas duplicadas de 0.1 a 1.0 ml de la solución estándar de 400 µg/ml de seroalbúmina bovina.
- 2.- Se diluye la solución a un volumen final de 1 ml.
- 3.- Se realizan los mismos pasos para la determinación de proteína a partir del número 3.
Preparar un blanco colocando 1.0 ml de agua destilada y continuar la técnica a partir del paso 3.

ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS DE LDH

Las isoenzimas de deshidrogenasa láctica se separan por electroforesis en acetatos de celulosa o geles de agarosa y para su visualización se siguen las siguientes reacciones:

- 1.- $L^+ \text{ lactato} + \text{NAD} \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{piruvato} + \text{NADH}_2$
- 2.- $\text{NADH} + \text{PMS} \longrightarrow \text{NAD} + \text{PMS-H}$
- 3.- $\text{PMS-H} + \text{TNBT} \longrightarrow \text{PMS} + \text{TNBT-formazan}$

donde:

PMS significa metasulfato de fenozoina.

TNBT significa tetrazolium tetranitroazul.

TNBT-formazan es un compuesto coloreado e insoluble que se localiza en las zonas electroforéticas de actividad de LDH - (Plagemann *et al.*, 1960).

REACTIVOS:

Se usaron reactivos ya preparados de la casa Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, U. S. A. Estos reactivos fueron:

a) Buffer para electroforesis de LDH (trizma 50 mmol, - citrato 12 mmol, barbitol 25 mmol). Se disuelve el contenido -- del vial en un litro de agua y se puede refrigerar.

b) Buffer de incubación para LDH (trizma y tetrasodio - pirofosfato). Se disuelve el contenido del vial en un litro de agua y se puede refrigerar.

c) Reactivo colorante para LDH agarosa: 10 partes de - NAD; 85 partes de Litium L⁺ lactato; 5 partes de TNBT y 0.1 partes de PMS. Se prepara diez minutos antes de terminar la electroforesis y se reconstituye con 15 ml de agua agitándose vigorosamente. Al terminar la electroforesis se le agregan 15 ml - del buffer de incubación, se mezcla bien y se usa inmediatamente.

d) Geles de agarosa hidratada.

METODO:

- 1.- Se prepararon los geles de agarosa equilibrándolos en - el buffer para electroforesis una hora.
- 2.- Se quitó el exceso del buffer para electroforesis con secantes.

- 3.- Se agregó un μ l de la muestra en el lugar de aplicación.
- 4.- Se dejó que la muestra se absorbiera y se colocó el gel en una cámara de electroforesis, de Internacional Científica, S. A., modelo 2 PAC/5 conectada a una fuente de poder, con las muestras cerca del cátodo.
- 5.- Se aplicaron 250 volts por treinta minutos.
- 6.- Se sacó el gel y se colocó en una cámara.
- 7.- Se agregó el colorante (preparado como ya se explicó) y se incubó durante treinta minutos a 37°C en la oscuridad.
- 8.- Se pasó el gel a una caja con 200 ml de una solución -- acético-metanol por treinta minutos.
- 9.- Se pasó el gel a una caja con 200 ml de agua destilada por treinta minutos.
- 10.- Se puso a secar el gel en un incubador a $60-70^{\circ}\text{C}$ por -- quince a treinta minutos.
- 11.- Se leyó en un densitómetro Beckman, modelo R-110 a 550 nm.

OBTENCION DE RESULTADOS

Como ya se explicó en las técnicas de determinación tanto de LDH como de MDH, se tomaron lecturas de densidad óptica -- cada treinta segundos durante tres minutos. Se hicieron las gráficas correspondientes de densidad óptica contra tiempo y en --- ellas se determinó la diferencia por minuto.

Sabiendo que 0.030 D.O. es igual a 0.0097 μ Moles de --- NADH_2 se calculó con base en una regla de tres los μ Moles de --- NADH_2 presentes por minuto.

Con la técnica para determinación de proteínas totales - se obtuvieron los mg de proteína presente en cada ml de muestra y con este dato se pudo obtener la relación μ Moles NAD/mg de proteína/min que es la actividad de la enzima para cada muestra.

Utilizando una prueba de t de Student, que es una prueba de hipótesis usada para verificar las diferencias observadas en tratamientos distintos (Sokal & Rohlf, 1979), se pudo hacer - la comparación de la actividad enzimática entre los animales -- tratados con harina de algodón, los desnutridos y los controles.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del registro llevado a cabo sobre el peso de los animales cada tercer día, durante las cuatro semanas de tratamiento y el peso final a las seis semanas de recuperación se muestran en la figura 4.

Como se puede observar los animales tienen un peso similar al inicio del tratamiento, sin embargo a partir de la segunda semana la diferencia en peso entre los tres grupos de animales se vuelve significativa y se mantiene así durante todo el tratamiento. Los animales con dieta hipoproteica tienen una baja durante todo el tratamiento lo cual se esperaba ya que su dieta carecía de proteína. Los animales controles más o menos se mantienen en un rango constante de peso, pero los alimentados con harina de algodón desde el principio disminuyen de peso, lo cual es un efecto de la toxicidad del gossipol aunado a una disminución en el consumo de alimento. Al cabo de seis semanas de recuperación los tres grupos aumentan considerablemente su peso. Esto en el caso de los controles se debe a que la tensión en que se encontraba el animal aislado en una jaula desaparece. Con respecto a los dos grupos experimentales lo anterior también influye, pero lo decisivo en el aumento de peso es para unos dejar de ingerir el tóxico y para los otros volver a ingerir proteína. Sin embargo como se puede ver los animales tratados con harina de algodón, no aumentan de peso tanto como los otros, lo que indica que aun después de seis semanas de recuperación siguen bajo los efectos tóxicos del gossipol ingerido.

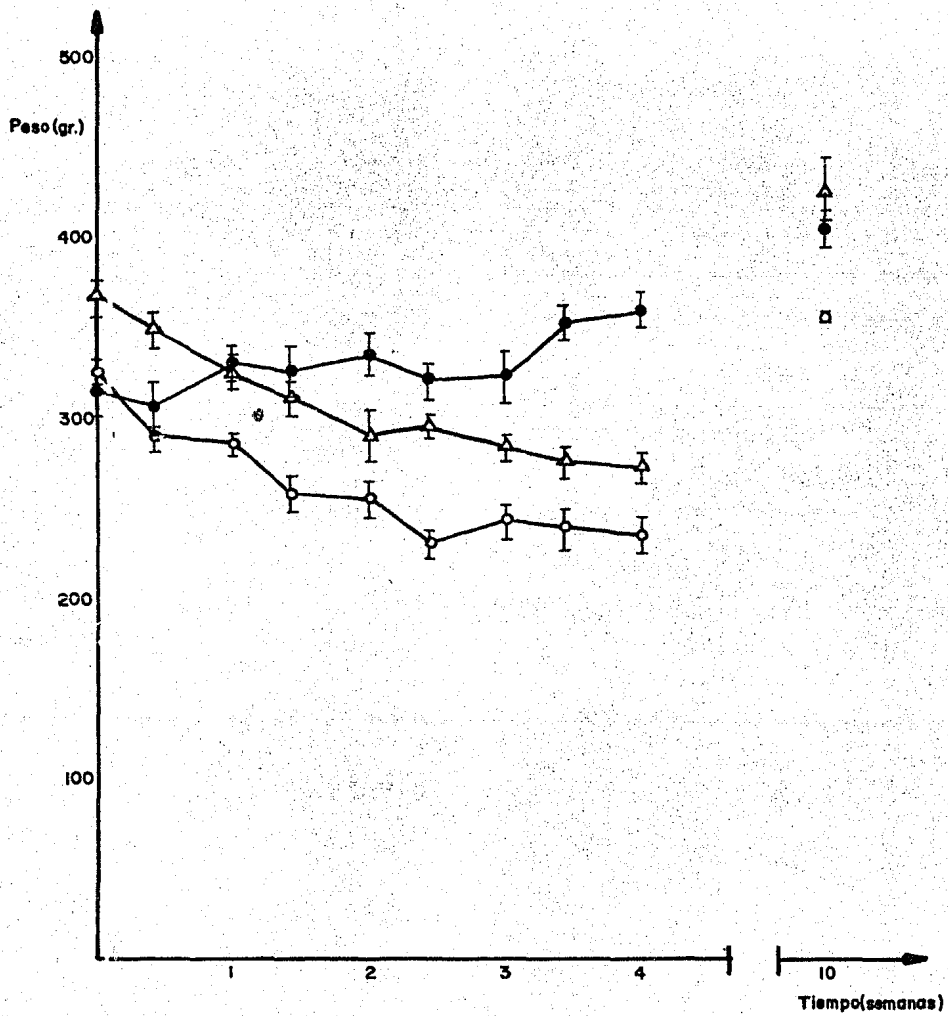


Fig. 4- Peso de los animales durante el tratamiento y a las 6 semanas de recuperación (● control, ○ gosipol, △ desnutr.)

En la figura 5 tenemos la comparación entre las cantidades de alimento ingeridas por los tres grupos durante el tratamiento. Aquí se puede apreciar que los animales que ingieren harina de algodón desde el principio consumen menos alimento. En un comienzo, esto se puede deber a que la textura harinosa del alimento no es agradable para los animales roedores y ya más adelante, a que se empiezan a ver los efectos tóxicos del gosisol. Los animales con dieta hipoproteica al principio dejan de ingerir alimento quizá por la misma razón que los otros, luego tienen un período de aumento de ingestión tal vez como compensación de la carencia de proteína que se empieza a sentir y posteriormente estando ya el animal en un estado de desnutrición disminuye nuevamente la ingestión.

Con este breve análisis nos damos cuenta desde el inicio del trabajo de que los animales que ingirieron harina de algodón se ven mucho más afectados por el efecto tóxico que lo que se ven aquéllos que padecen desnutrición, lo cual se comprueba posteriormente con el análisis enzimático.

Los resultados correspondientes a la actividad de la LDH se presentan en la tabla I y en la figura 6.

Como se puede apreciar, la actividad de LDH en hígado (H) se ve significativamente disminuída ($P > 0.005$) al término del tratamiento y aún después de catorce semanas de haberlo suspendido. Esta reducción en la actividad de LDH podría acarrear serias consecuencias para el organismo al presentarse en un órgano cuya multiplicidad de actividades requiere de una dotación alta y constante de energía metabólica. Entre las actividades hepáticas que se pueden ver afectadas por una disminución en el metabo

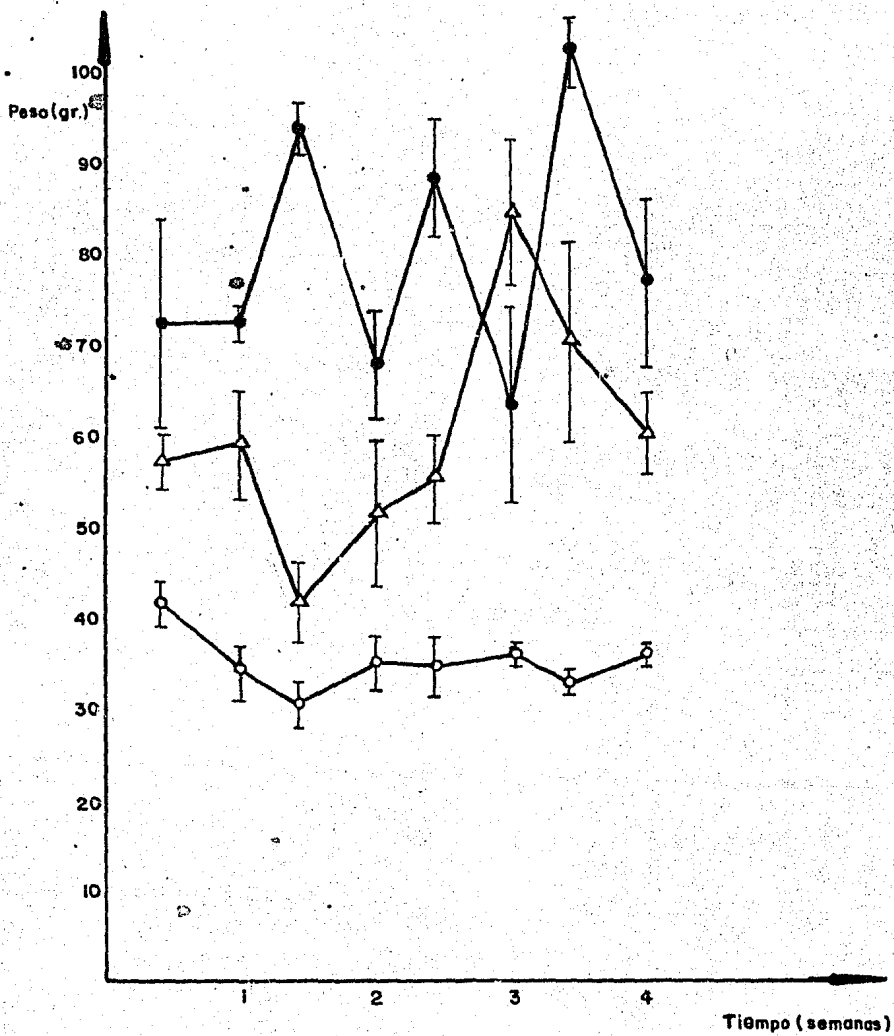


Fig.5-Alimento ingerido por los animales durante el tratamiento (● control, ○ gospol, △ desnutr.)

TABLA I
 DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE LDH
 (μ Moles NAD/mg de protefina/min)

	GRUPO	HIGADO	MUSCULO	CORAZON	TESTICULO	SUERO
término dieta	gosipol	0.55 \pm 0.21	1.57 \pm 1.10	0.22 \pm 0.22	0.12 \pm 0.05	0.021 \pm 0.017
	control	1.81 \pm 0.79	2.45 \pm 1.65	2.95 \pm 0.70	0.42 \pm 0.06	0.020 \pm 0.004
	P	> 0.005	NS	> 0.001	> 0.001	NS
seis semanas	gosipol	0.67 \pm 0.48	2.10 \pm 1.16	0.36 \pm 0.11	0.09 \pm 0.08	0.010 \pm 0.004
	control	2.41 \pm 0.75	3.49 \pm 1.04	3.03 \pm 1.54	0.44 \pm 0.10	0.037 \pm 0.007
	P	> 0.001	NS	> 0.002	> 0.01	> 0.001
diez semanas	gosipol	0.74 \pm 0.27	2.39 \pm 0.82	0.41 \pm 0.19	0.26 \pm 0.15	0.008 \pm 0.005
	control	1.22 \pm 0.09	2.07 \pm 0.26	0.70 \pm 0.38	0.17 \pm 0.05	0.013 \pm 0.004
	P	> 0.01	NS	NS	NS	NS
catorce semanas	gosipol	0.97 \pm 0.21	3.23 \pm 1.14	0.65 \pm 0.27	0.60 \pm 0.10	0.016 \pm 0.006
	control	1.46 \pm 0.11	3.13 \pm 0.68	0.67 \pm 0.28	0.29 \pm 0.08	0.023 \pm 0.003
	P	> 0.005	NS	NS	> 0.005	NS

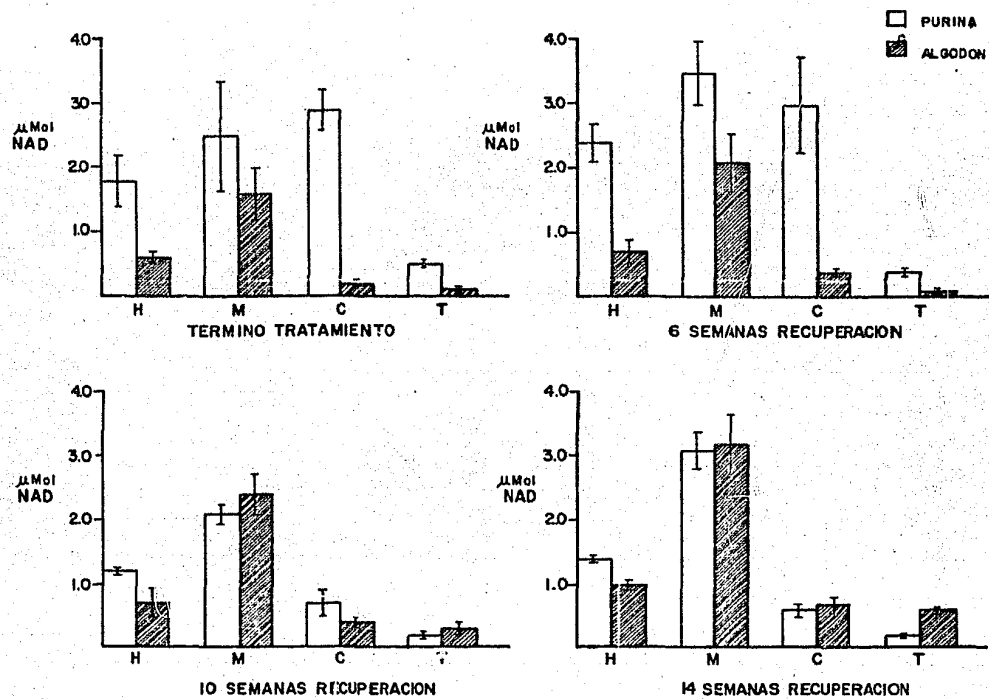


FIG.6-ACTIVIDAD DE LDH EN DIFERENTES TEJIDOS DE ANIMALES ALIMENTADOS CON HARINA DE SEMILLA DE ALGODON (μ Moles NAD/mg prot./min.).

lismo energético destacan la producción de bilis y la producción de glucógeno como material de reserva a partir de glucosa (Ganong, 1967).

El músculo (M) fue el único órgano de los estudiados cuyos valores de actividad de LDH no se vieron afectados significativamente ni al término del tratamiento ni después en las semanas de recuperación. Esto parece sugerir que el músculo, en cuyas fibras se encuentran tanto enzimas glucolíticas como del ciclo de Krebs, no es un órgano blanco sobre el cual ejerza su efecto el gosipol. Para el caso de la LDH esto podría deberse al tipo de cadenas de que está constituida, ya que como se mencionó en la introducción la isoenzima de músculo está constituida por cuatro cadenas M, mientras que las otras son híbridos de cadenas M y H, esto sugiere que las cadenas M pudieran ser menos susceptibles a la acción del gosipol.

La LDH de corazón (C) también se vió disminuída en su actividad significativamente ($P > 0.001$) al término de la ingestión de la dieta con harina de algodón. La actividad de la enzima en este órgano alcanzó su valor normal después de diez semanas de recuperación luego de la suspensión del tratamiento. El daño producido por los efectos del gosipol en el corazón se ve corroborado con la presencia de LDH₁ en suero, situación que se discute más adelante. Aunque pudiera parecer que la disminución en la actividad de la enzima que se presenta en el corazón se deba no sólo a un efecto sobre la enzima sino además a un daño celular manifestado por la presencia de LDH₁ en suero.

En el testículo (T) se observó una disminución significativa ($P > 0.001$) en la actividad de LDH durante la ingestión de la

harina de algodón, lo cual coincide con los hallazgos de otros autores utilizando gopisol puro. Esta disminución aún es detectable seis semanas después de suspender la dieta, regularizándose a las diez semanas después de lo cual aumenta su actividad por arriba del valor normal ($P > 0.005$) como puede observarse a las catorce semanas. Esto posiblemente se debe a un mecanismo de compensación.

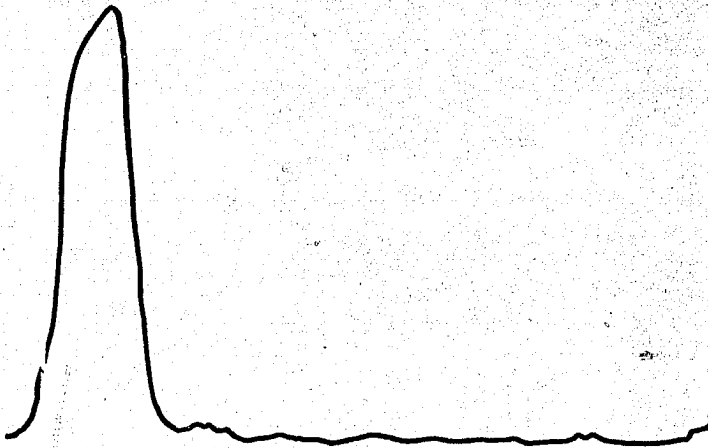
Debido a que el gopisol no se acumula en grandes cantidades en el testículo (Abou-Donia & Dieckert, 1975), la disminución de la actividad de LDH no es por grandes concentraciones de gopisol en el testículo, sino que posiblemente esta enzima es más vulnerable a la droga que las otras isoenzimas lo cual podría ser uno de los factores involucrados en el efecto espermatocida del gopisol; de hecho otros autores coinciden en un efecto directo del gopisol sobre la LDH-X (Tso & Lee, 1982).

Los valores de LDH registrados en suero (S) tampoco se ven afectados significativamente lo que sugiere que los cambios observados en la actividad de LDH no se deben a un daño celular. De ahí que estos cambios no se manifiesten a nivel periférico y sólo sean detectables en el órgano, lo que se puede deber a un efecto directo sobre la enzima o sobre mecanismos involucrados en su activación.

Sin embargo la electroforesis de las isoenzimas demostró que al término de la dieta no sólo se presentaba un pequeño pico que es el patrón normal en ratas (Sáez *et al.*, 1982), sino que se presentaban dos correspondiendo el segundo pico a la isoenzima de LDH de corazón (figura 7). Ya se mencionó que estas isoenzimas no son liberadas al torrente sanguíneo a menos que exista



a) Experimentales al término de la dieta.



b) Controles al término de la dieta.

Fig. 7- Electroforesis de Isoenzimas de LDH.

un daño celular en el tejido específico. La aparición de la LDH₁ sugiere un daño celular aunque éste puede ser leve debido a que la cantidad liberada no fue tan grande que nos permitiera detectar aumento significativo en la actividad de LDH total de suero. Sin embargo en las semanas de recuperación no apareció la LDH₁ - en ninguna de las electroforesis, lo cual demuestra una aparente recuperación de la organización celular cardiaca.

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad de MDH se resumen en la tabla II y en la figura 8, en las cuales se pueden observar efectos similares a los obtenidos en las determinaciones de LDH, con excepción del testículo. Así vemos que en el hígado (H) la actividad de esta enzima disminuye de manera significativa ($P > 0.001$). Este cambio sólo es detectable hasta la sexta semana después de la suspensión de la dieta normalizándose posteriormente.

En músculo (M) la actividad de esta enzima al igual que en el caso de la LDH, no se ve afectada, sin embargo no se pueden argüir las mismas razones.

En corazón (C) también se observa una disminución significativa ($P > 0.001$) en la actividad de la MDH, normalizándose a la sexta semana de recuperación.

Con respecto a la actividad de MDH en testículo (T) no se observó ningún efecto al término de la dieta; pero después de seis semanas de suspendida hubo un aumento significativo ($P > 0.02$) en la actividad de la enzima, el cual permanece aún después de catorce semanas. Esto nos hace pensar en una compensación de los sistemas energéticos del testículo hasta alcanzar la actividad normal de los mismos (Johnson *et al.*, 1970).

TABLA II
 DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE MDH
 (μ Moles NAD/mg de proteína/min)

	GRUPO	HIGADO	MUSCULO	CORAZON	TESTICULO
término dieta	gosipol	0.47 \pm 0.28	1.39 \pm 0.99	1.05 \pm 0.21	0.49 \pm 0.63
	control	1.87 \pm 0.18	1.15 \pm 0.40	4.42 \pm 0.75	0.50 \pm 0.00
	P	> 0.001	NS	> 0.001	NS
seis semanas	gosipol	1.07 \pm 0.17	1.75 \pm 0.83	4.05 \pm 1.32	0.78 \pm 0.08
	control	2.12 \pm 0.18	1.87 \pm 0.49	3.92 \pm 0.62	0.52 \pm 0.18
	P	> 0.001	NS	NS	> 0.02
diez semanas	gosipol	1.83 \pm 0.35	1.44 \pm 0.69	3.22 \pm 0.44	0.74 \pm 0.17
	control	1.65 \pm 0.12	0.72 \pm 0.20	4.15 \pm 0.81	0.40 \pm 0.00
	P	NS	NS	> 0.05	> 0.005
catorce semanas	gosipol	1.77 \pm 0.22	1.40 \pm 0.24	4.17 \pm 0.46	0.55 \pm 0.27
	control	1.51 \pm 0.06	1.18 \pm 0.37	4.68 \pm 1.30	0.52 \pm 0.03
	P	NS	NS	NS	NS

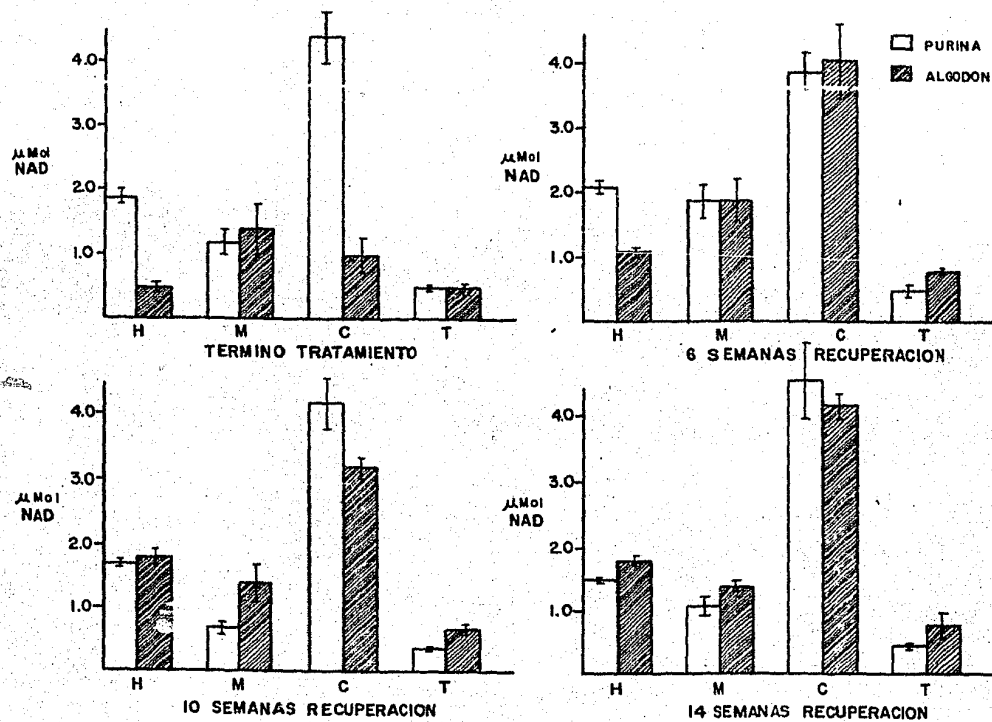


FIG.8-ACTIVIDAD DE MDH EN DIFERENTES TEJIDOS DE ANIMALES ALIMENTADOS CON HARINA DE SEMILLA DE ALGODON (μ Moles NAD / mg prot./min.).

Debido a que los animales bajan de peso durante la ingestión de la dieta a base de harina de algodón (figura 4), surgió la pregunta de si los efectos observados en la actividad enzimática no eran ocasionados por el estado nutricional de los animales. Con el objeto de despejar esta interrogante se hicieron las mismas determinaciones en animales sometidos a una dieta hipoproteica y los resultados obtenidos en la cuantificación de LDH se muestran en la tabla III y en la figura 9. En estos resultados podemos observar una disminución significativa en la actividad de LDH en corazón ($P > 0.001$) y testículo ($P > 0.01$) al término del tratamiento, recuperándose la actividad normal de la enzima en ambos casos después de seis semanas.

Sin embargo no se registraron cambios significativos ni en el hígado ni en el músculo y al hacer un análisis comparativo entre los animales desnutridos y los que ingirieron la dieta a base de harina de algodón (tabla IV y figura 9) se pudo constatar una disminución mayor en la actividad de LDH en aquéllos que ingirieron harina de algodón, lo que indica que esta disminución se puede deber a la presencia de gopipol en la dieta y no a un efecto por desnutrición.

Con respecto a la actividad de la MDH en las ratas sometidas a una dieta hipoproteica (tabla V y figura 10) se pudo observar también una disminución significativa en corazón ($P > 0.001$) y testículo ($P > 0.05$) recuperándose esta actividad al cabo de seis semanas de suspendida la dieta y nuevamente encontramos que la actividad de MDH al igual que la de LDH no se vió afectada ni en hígado ni en músculo. La comparación de la actividad de MDH entre animales desnutridos y los que ingirieron en su dieta harin

TABLA III
 COMPARACION LDH ENTRE DESNUTRIDOS Y CONTROLES
 (μ Moles NAD/mg de proteína/min)

	GRUPO	HIGADO	MUSCULO	CORAZON	TESTICULO	SUERO
término dieta	desnutridos	1.25 ± 0.13	3.01 ± 1.48	0.66 ± 0.18	0.30 ± 0.08	0.056 ± 0.048
	control	1.81 ± 0.79	2.45 ± 1.65	2.95 ± 0.70	0.42 ± 0.06	0.020 ± 0.004
	P	NS	NS	> 0.001	> 0.01	NS
seis semanas	desnutridos	1.07 ± 0.05	2.89 ± 0.49	1.01 ± 0.22	0.38 ± 0.08	0.028 ± 0.008
	control	2.41 ± 0.75	3.49 ± 1.04	3.03 ± 1.54	0.44 ± 0.10	0.037 ± 0.007
	P	NS	NS	NS	NS	NS

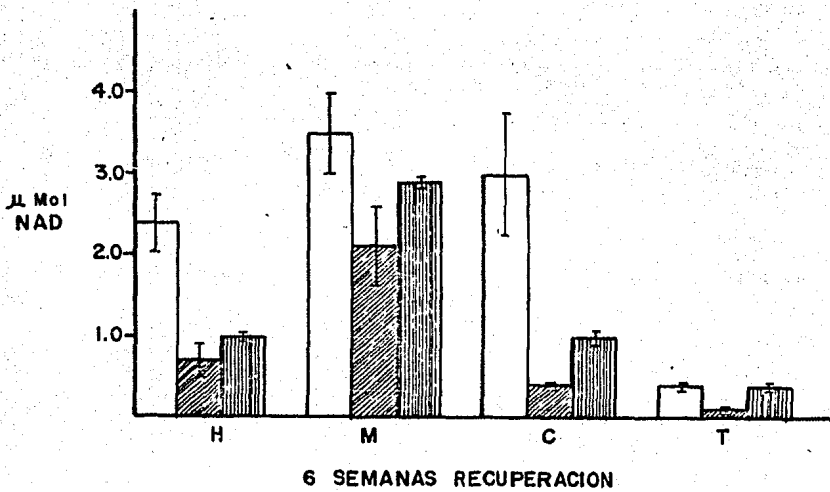
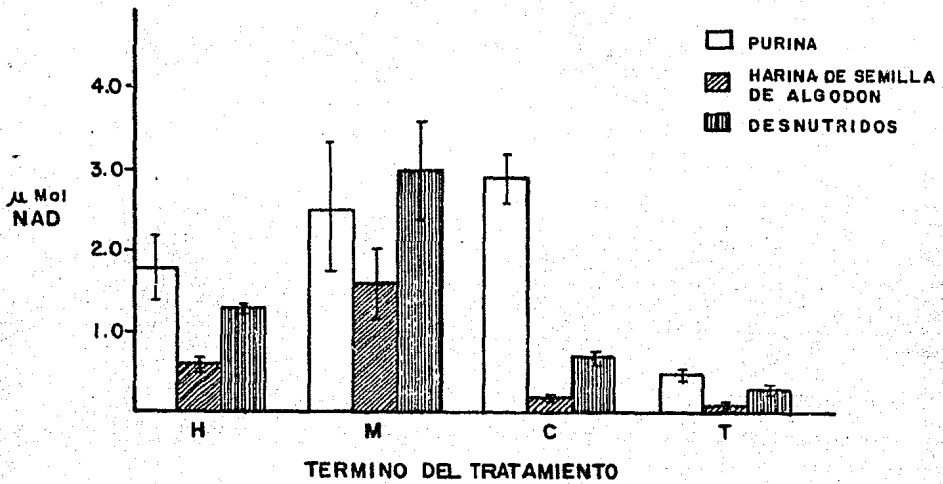


FIG.9-ACTIVIDAD DE LDH EN DIFERENTES TEJIDOS DE ANIMALES ALIMENTADOS CON SEMILLA DE ALGODON Y DESNUTRIDOS. (μ Moles NAD/mg prot./min.).

TABLA IV
 COMPARACION LDH ENTRE DESNUTRIDOS Y GOSIPOL
 (μ Moles NAD/mg de proteína/min)

	GRUPO	HIGADO	MUSCULO	CORAZON	TESTICULO	SUERO
término dieta	desnutridos	1.25 \pm 0.13	3.01 \pm 1.48	0.66 \pm 0.18	0.30 \pm 0.08	0.056 \pm 0.048
	gosipol	0.55 \pm 0.21	1.57 \pm 1.10	0.22 \pm 0.22	0.12 \pm 0.05	0.021 \pm 0.017
	p	> 0.001	NS	> 0.001	> 0.002	NS
seis semanas	desnutridos	1.07 \pm 0.05	2.89 \pm 0.49	0.01 \pm 0.22	0.38 \pm 0.08	0.028 \pm 0.008
	gosipol	0.67 \pm 0.48	2.10 \pm 1.16	0.36 \pm 0.11	0.09 \pm 0.08	0.010 \pm 0.004
	p	NS	NS	> 0.001	> 0.001	> 0.001

TABLA V
 COMPARACION MDH ENTRE DESNUTRIDOS Y CONTROLES
 (μ Moles NAD/mg de proteína/min)

	GRUPO	HIGADO	MUSCULO	CORAZON	TESTICULO
término dieta	desnutridos	2.11 \pm 0.37	1.21 \pm 0.64	1.93 \pm 0.63	0.38 \pm 0.09
	control	1.87 \pm 0.18	1.15 \pm 0.40	4.42 \pm 0.75	0.50 \pm 0.00
	P	NS	NS	> 0.001	> 0.05
seis semanas	desnutridos	1.56 \pm 0.21	1.03 \pm 0.12	3.05 \pm 0.39	0.61 \pm 0.16
	control	2.12 \pm 0.18	1.87 \pm 0.49	3.92 \pm 0.62	0.52 \pm 0.18
	P	> 0.005	NS	NS	NS

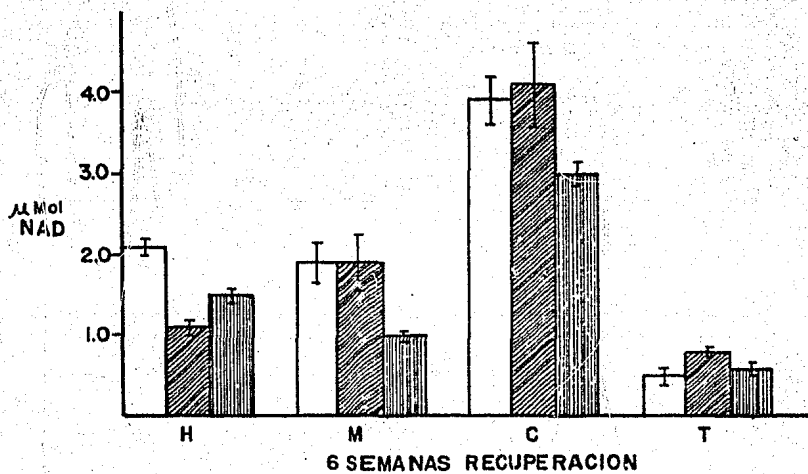
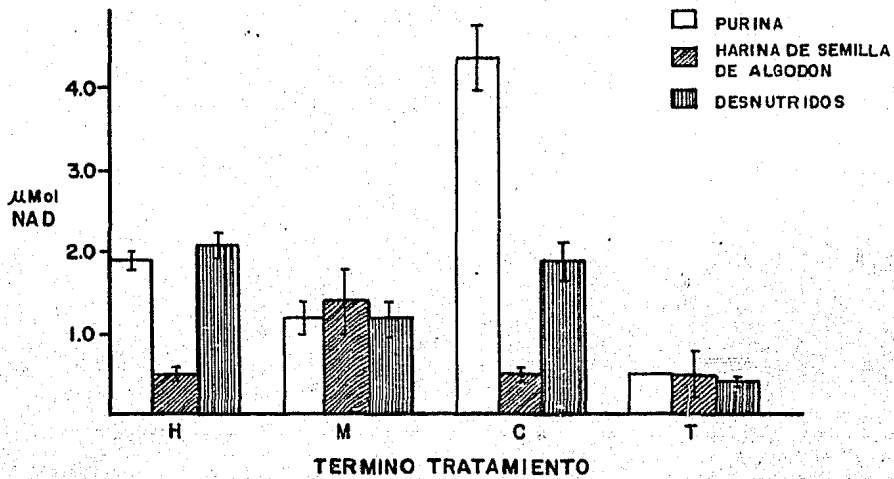


FIG.10-ACTIVIDAD DE MDH EN DIFERENTES TEJIDOS DE ANIMALES ALIMENTADOS CON SEMILLA DE ALGODÓN Y DESNUTRIDOS. (μ Moles NAD/mg prot./ min.).

na de algodón (tabla VI y figura 10), demuestra un mayor daño en los animales que ingirieron la dieta de algodón que en aquéllos sometidos a una dieta hipoproteica.

TABLA VI
 COMPARACION MDH ENTRE DESNUTRIDOS Y GOSIPOL
 (μ Moles NAD/mg de proteína/min)

	GRUPO	HIGADO	MUSCULO	CORAZON	TESTICULO
término dieta	desnutridos	2.11 \pm 0.37	1.21 \pm 0.64	1.93 \pm 0.63	0.38 \pm 0.09
	gosipol	0.47 \pm 0.28	1.39 \pm 0.99	1.05 \pm 0.21	0.49 \pm 0.63
	P	> 0.001	NS	> 0.05	NS
seis semanas	desnutridos	1.56 \pm 0.21	1.03 \pm 0.12	3.05 \pm 0.39	0.61 \pm 0.16
	gosipol	1.07 \pm 0.17	1.75 \pm 0.83	4.05 \pm 1.32	0.78 \pm 0.08
	P	> 0.005	NS	NS	NS

CONCLUSIONES

Las observaciones anteriores nos llevan a concluir que la presencia de gosipol en la dieta a la concentración utilizada provoca:

- 1.- La disminución significativa de la actividad de deshidrogenasa láctica (LDH) en hígado, corazón y testículo pero no en músculo.
- 2.- La disminución significativa de la actividad de deshidrogenasa málica (MDH) en hígado y corazón pero no en testículo ni músculo.
- 3.- Tanto la LDH como la MDH se ven notablemente más afectadas por la presencia de gosipol en hígado, corazón y testículo que por una dieta hipoproteica.
- 4.- El efecto del gosipol en la actividad de estas enzimas del metabolismo energético podría ser una de las causas de la infertilidad observada.

Los resultados presentados en este trabajo se refieren a la actividad de LDH y MDH en general. Sin embargo, ante la existencia de cinco isoenzimas de LDH y dos de MDH (Goldberg, 1963) así como de su posible especificidad en diferentes órganos, se recomienda profundizar la investigación analizando la actividad de las isoenzimas por separado.

Las conclusiones anteriores resultan de gran importancia en reproducción animal, ya que aunque la concentración de gosipol en las dietas puede ser no tóxica, ésta puede afectar no sólo la fertilidad del animal, sino en general el buen funcionamiento

to metabólico del mismo disminuyendo por consiguiente la producción.

Por lo que se refiere al posible uso del gopipol puro o presente en dietas como agente antifertilizante en humanos, sigue haciendo falta un estudio a fondo de los daños colaterales que provoca y ver si de alguna manera se pueden eliminar dichos efectos. Mientras esto no se realice no se puede recomendar su uso a ninguna dosis a pesar de lo ya publicado por los diversos investigadores.

BIBLIOGRAFIA

- Abou-Donia, M.B.; C.M. Lyman & J.W. Dieckert 1970 Metabolic - Fate of Gossypol: The Metabolism of ^{14}C -Gossypol in Rats. *Lipids* 5(11):938-946.
- Abou-Donia, M.B. & J.W. Dieckert 1974 Gossypol: Uncoupling of Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation. -- *Life Sci.* 14:1955-1963.
- Abou-Donia, M.B. & J.W. Dieckert 1975 Metabolic Fate of Gossypol: The Metabolism of [^{14}C]Gossypol in Swine. --- *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 31:32-46.
- Abou-Donia, M.B. 1976 Physiological Effects and Metabolism of Gossypol. *Residue Rev.* 61:126-160 New York.
- Adams, R. & T.A. Geissman 1976 Gossypol, a Pigment of Cottonseed. *Chem.Rev.* 61:555-574.
- Béhar, M. & R. Bressani 1971 Recursos Proteínicos en América - Latina. *INCAP* 353-354.
- Bressani, L.C. 1980 Human Nutrition and Gossypol. *PARFR Workshop on Gossypol.* Chicago, Illinois.
- Cahn, R.D.; N.O. Kaplan; L. Levine & E. Zwilling 1962 Nature and Development of Lactic Dehydrogenases. *Science* 136:962-969.
- Cameron, S.M.; D.P. Waller & L.J.D. Zaneveld 1962 Vaginal --- Spermicidal Activity of Gossypol in *Macaca arctoides*. *Fertil.Steril.* 37(2):273-274.
- Chang, M.C.; P.G. Shi & S.K. Saksena 1980 Effects of Gossypol on the Fertility of Male Rats, Hamsters and Rabbits. *Contraception* 21(5):461-469.
- Clawson, A.J.; J.H. Maner; G. Gómez; O. Mejía; Z. Flores & J. Buitrago 1975 Unextracted Cottonseed in Diets for Monogastric Animals. I. The Effect of Ferrous Sulfate and Calcium Hydroxide in Reducing Gossypol Toxicity. *J.Anim.Sci.* 40(4):640-647.
- Edwards, J.D. Jr. 1970 Synthesis of Gossypol and Gossypol --- Derivatives. *J.Amer.Oil Chem.Soc.* 47(11):441-442.

- Elías, L.G. 1969 Mezclas Vegetales para Consumo Humano. XVIII-Desarrollo de la Mezcla Vegetal INCAP 17, a Base de Semillas Leguminosas. Arch.Latinoamer.Nutrición -- 19(2):109-127.
- Ganong, W.F. 1967 Review of Medical Physiology. Cap. 26 Sec. 5 The Liver & Biliary System. Lange Medical Publications U.S.A. 406-409.
- Goldberg, E. 1963 Lactic and Malic Dehydrogenases in Human --- Spermatozoa. Science 139:602-603.
- Goodman, A.; L. Goodman & A. Gilman eds. 1980 The Pharmacological Basis of Therapeutics. MacMillan Publishing Co., Inc. U.S.A.
- Hartreé, E.P. 1972 Determination of Protein: a Modification of Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. Anal.Biochem. 48:422-427.
- Johnson, A.D.; W.R. Gomes & N.L. Vandermark eds. 1970 The Testis Vol.II Biochemistry Cap.2 Histochemical Localization of Testicular Enzymes. Academic.Press.Inc. New York 73-123.
- Kalla, N.R. & M. Vasudev 1980 Studies on the Male Antifertility Agent, Gossypol Acetic Acid: I. In Vitro Studies on the Effect of Gossypol Acetic Acid in Human Spermatozoa IRCS Med.Sci.Biochem. 8:375-376.
- Kalla, N.R.; M. Vasudev & G. Arora 1981 Studies on the Male -- Antifertility Agent Gossypol Acetic Acid. III Effect of Gossypol Acetic Acid on Rat Testis. Andrología -- 13:242.
- Lehninger, A.L. 1975 Biochemistry Worth Publishers, Inc. New --- York Cap.9,16,17.
- Maugh, T.H. 1981 Male "Pill" Block Sperm Enzyme. Science 212 -- (17):314.
- McPherson, C.M. & S.L. Ou 1976 Evaluation of Corn Tortillas --- Supplemented with Cottonseed Flour. J.Food Sci. 41: 1301-1304.
- Nadakavukaren, M.J.; R.H. Sorensen & J.N. Tore 1979 Effect of - Gossypol on the Ultrastructure of Rat Spermatozoa. Cell.Tiss.Res. 204:293-296.

- National Coordinating Group of Male Antifertility Agents 1978 -
Gossypol- A New Antifertility Agent for Males. Ch.
Med.J. 4(6):417-428.
- Plagemann, P.W.; K.F. Gregory & F. Wroblewski 1960 The Electro-
phoretically Distinct Forms of Mammalian Lactic De-
hydrogenase in Rabbit and Human Tissues. J.Biol. --
Chem. 235: 2282.
- Sáez, J.C.; E. Vivaldi & B. Günther 1982 Tourniquet Shock in --
Rats: Appearance of Lactic Dehydrogenase Isozymes in
Serum. IRCS Medical Science: 10:191-192.
- Siegel, A. & R.J. Bing 1956 Plasma Enzyme Activity in Myocar-
dial Infarction in Dog and Man. Prod.Soc.Exp.Biol.
Med. 91:604-607.
- Singleton, V.L. & F.H. Kratzer 1973 Plant Phenolics in: Toxi-
cants Occurring Naturally in Foods. National Academy
of Sciences. Washington, D.C. 318-323.
- Smith, K.J. 1970 Practical Significance of Gossypol in Feed --
Formulation. J.Amer.Oil Chem.Soc. 47(11):448-450.
- Sokal, P.R. & F.J. Rohlf 1979 Biometría Blume Ediciones Madrid.
Cap.7:145-194.
- Sotelo, A.; I. Montalvo; M.L. Crail & M.T. González 1982 Infer-
tility in Male Rats Induced by Diets Containing ---
Whole Cottonseed Flour. J.Nutr. 112(11):2052-2057.
- Tone, J.N. & D.R. Jensen 1976 The Accumulation Pattern of ---
Ingested Gossypol in Selected Organs of the Rat. --
Experientia 15(3):369-371.
- Tso W.W. & C.S. Lee 1982 Lactate Dehydrogenase-X: An Isozyme -
Particularly Sensitive to Gossypol Inhibition. Int.
J.Andr. 5:205-209.
- Waller, O.P.; H.H.S. Fong; G.F. Cordell & D.D. Soejarto 1981 -
Antifertility Effects of Gossypol and its Imputi-
ties on Male Hamsters. Contraception 23(6):653-660.
- Wroblewski, F. & J.S. LaDue 1955 Lactic Dehydrogenase Activity
in Blood. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 90:210-213.
- Yang, H.C. & D.D. Davis 1976 Variations in Gossypol Concentra-
tion of Flower Buds of Cotton. Crop Sci. 16:485-488.