



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

94
2ij

FACULTAD DE QUIMICA

ACTIVIDAD SERICA Y LOCALIZACION SUBCELULAR
DE ENZIMAS HEPATICAS EN DOS MODELOS DE
HEPATITIS INDUCIDA QUIMICAMENTE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

ELIZABETH QUEVEDO ORNELAS



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: HERNANDEZ MONTES HOMERO

VOCAL: NAVA DIAZ GRACIELA

SECRETARIO: HERNANDEZ MUÑOZ ROLANDO EFRAIN

1er SUPLENTE: FRANCO Y BOURLAND REBECCA E.

2do SUPLENTE: CASTILLO MARTINEZ ALICIA


SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOENERGETICA, INSTITUTO DE FISILOGIA
CELULAR, UNAM.

ASESOR DE TESIS:


DR. ROLANDO EFRAIN HERNANDEZ MUÑOZ.

SUSTENTANTE:


ELIZABETH QUEVEDO ORNELAS.

*El amor es paciente, servicial y sin envidia.
No quiere aparentar, ni se hace el importante.
No actúa con bajeza, ni busca su propio Interés.
El amor no se deja llevar por la ira,
sino que olvida las ofensas y perdona.
Nunca se alegra de algo Injusto
y siempre le alegra la verdad.
El amor disculpa todo;
todo lo cree,
todo lo espera y
todo lo soporta.*

1^a Cor 13, 4-7.

A MIS PADRES POR HABERME DADO LO MEJOR DE SU VIDA, ASI COMO SU PACIENCIA Y APOYO EN TODO MOMENTO.

ESTE TRABAJO LO DEDICO A MIS HERMANOS (KENA, BRENDA RAQUEL E IVAN) COMO SIMBOLO DE LUCHA Y DE EMPEÑO.

A MARIO POR LO MUCHO QUE ME ENSEÑASTE, HUBIERA DESEADO COMPARTIR MI ALEGRIA CONTIGO. TODO FUE UN HERMOSO SUEÑO.

A MIS TIOS MANUEL, LUISA, LUPE Y JESUS POR SU VALIOSISIMO APOYO, SIN EL CUAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE ESTE TRABAJO.

A MIS QUERIDOS AMIGOS DE LA FAMILIA QFB'90 A QUIENES AGRADEZCO INFINITAMENTE POR HACERME EL CAMINO MAS PLACENTERO, POR LA REALIDAD DE LA AMISTAD Y POR QUE TODOS SOMOS UNOS TRIUNFADORES, LOS QUIERO.

A ROLANDO POR TENERME TANTA PACIENCIA Y POR SU GRAN APOYO.

TO NOWHEREMAN BECAUSE THIS IS MORE THAN LOVE. THANKS FOR THIS TASTE OF HEAVEN SO DEEP SO TRUE.

A CRISTINA MI QUERIDA AMIGA, GRACIAS.

A JOSEFINA Y ERICK POR SU INVALUABLE AMISTAD Y APOYO. GRACIAS.

MUY EN ESPECIAL A LINO, AIDA, POR ENSEÑARME LO IMPORTANTE DE CONFIAR EN ALGO O ALGUIEN.

A LALO, SAUL, POR LOS BUENOS E INCREIBLES MOMENTOS.

A MI QUERIDA ANA, QUE AUNQUE NO ESTES HOY CONMIGO, SABES LO MUCHO QUE TE APRECIO.

A SANDRA POR ENSEÑARME QUE SIEMPRE HABRA ALGUIEN QUE NO CONCUERDE CONTIGO, GRACIAS.

A TI QUE PROMETISTE ESTAR SIEMPRE A MI LADO, GRACIAS POR AQUELLOS MOMENTOS EN QUE FUISTE EL UNICO APOYO. PORQUE RECUERDA EN LA AMISTAD NO SE EXIGE NI SE PROMETE, SOLO SE DA.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO, Y DE LA MAESTRIA (IPN) POR SOPORTARME TANTO.

A PACO, ROGELIO, CONCHITA Y ALEJANDRA POR NUESTROS GLORIOSOS AÑOS DE PREPA.

*CUANDO SE CIERRA UNA PUERTA A LA
FELICIDAD, OTRA SE ABRE;
PERO CON FRECUENCIA NOS QUEDAMOS
TANTO TIEMPO MIRANDO LA PUERTA
CERRADA,
QUE NO VEMOS LA QUE SE ABRIÓ.*

INDICE

INDICE

RESUMEN	iii
INTRODUCCION	
El hígado.	1
Mecanismo de daño del tetracloruro de carbono.	4
Mecanismo de daño propuesto para la d-Galactosamina.	6
Enzimas.	9
METODO EXPERIMENTAL	
Vias de experimentación y requerimientos iniciales.	14
Sacrificio y toma de muestras.	15
Fraccionamiento.	15
Muestra de sangre.	17
Determinaciones enzimáticas.	17
Análisis estadístico.	22
RESULTADOS	23
DISCUSION Y CONCLUSIONES	
Discusiones.	33

INDICE

Conclusiones. 41

BIBLIOGRAFIA 42

RESUMEN

La D-Galactosamina (D-GLN), es un azúcar aminado con la fórmula: 2-amino-2-deoxi-D-galactosa es soluble en agua, y ha sido reportada como hepatotóxica, ocasionando un daño difuso con necrosis focal, se ha observado que la lesión inducida por la D-GLN es similar a la ocasionada por el virus de la hepatitis B. La D-GLN disminuye la síntesis de proteínas y altera la funcionalidad de la membrana.

El Tetracloruro de Carbono (CCl_4), utiliza al citocromo P-450, siendo esta una de las enzimas que llevan a cabo el proceso de detoxificación del hígado. Se ha observado acumulación de triglicéridos y disminución en la capacidad de secreción de éstos, provocando un hígado graso. Provoca necrosis celular, aumento en la lipoperoxidación y los signos iniciales de daño hepático debidos al CCl_4 son: hepatomegalia, ictericia y elevación masiva de las transaminasas.

La administración de ambos hepatotóxicos fue el modelo para provocar un daño agudo en el hígado. Se llevó a cabo el estudio de los esquemas de liberación enzimática en suero y las actividades en las diferentes fracciones subcelulares de los hepatocitos, encontrando diferencias en el patrón de daño ocasionado por ambos hepatotóxicos.

La administración del tetracloruro de carbono ocasionó una mayor liberación de las enzimas LDH, GDH, MDH, OCT, TGP y TGO en suero, alteraciones morfológicas, alteración en la dinámica de los lípidos corporales, daño en membrana y alteraciones en la actividad de la mitocondria y en microsomas, así como disminución en la síntesis proteica.

RESUMEN

La administración de la galactosamina provocó un aumento en la actividad sérica de las enzimas GDH, OCT y las transaminasas, cambios morfológicos, alteraciones histológicas, alteración en la dinámica de los lípidos corporales, daño en membrana, disminución en la síntesis de proteínas y modificación de la actividad enzimática en las fracciones subcelulares. Los hepatocitos conservan su actividad metabólica para el mantenimiento de su función como órgano de secreción de albúmina y glucosa.

El aumento en la actividad sérica de ciertas enzimas mitocondriales pueden funcionar como señales moduladoras del proceso regenerativo.

INTRODUCCION

EL HIGADO

Anatómicamente el hígado está formado de parénquima y estroma. El primero comprende células epiteliales de origen endodérmico llamadas hepatocitos, en tanto que el segundo es tejido conectivo de origen mesenquimatoso. Cada hepatocito colinda con un conductillo biliar y con un sinusoides sanguíneo. En promedio el hígado recibe aproximadamente un 75% de sangre venosa, la cual está saturada de productos de la digestión que llegan por medio de la vena porta, desde el intestino delgado.

Debido a la importancia metabólica del hígado, este se ha dividido estructuralmente en acinos hepáticos, los cuales denotan una unidad de parénquima. El acino hepático se divide en 3 zonas metabólicas, siendo la zona I la que recibe mayor aporte en nutrientes y oxígeno, y en la zona III los hepatocitos dependen de sangre que posee muy pocas cantidades de nutrientes y oxígeno, siendo esta zona metabólicamente la más activa. Es el sitio principal de la detoxificación del alcohol y fármacos. (1)

Las funciones principales del hígado son:

FUNCION DETOXIFICANTE:

Se encargan de la detoxificación de algunos compuestos endógenos y exógenos. (1)

FUNCION SECRETORA:

Además de secretar los constituyentes de la bilis, sintetizan y liberan diversos tipos de secreciones internas de enorme importancia:

- a) Síntesis de glucógeno y secreción de glucosa.

INTRODUCCION

- b) Secreción de proteínas en sangre: los hepatocitos secretan albúminas, fibrinógeno y casi todas las globulinas del plasma.
- c) Secreción de lipoproteínas, interviniendo en la regulación de los niveles de lípidos en el plasma.
- d) Secreción de bilis. La bilis es una secreción exócrina de los hepatocitos que penetra en los conductillos biliares, contiene el pigmento bilirrubina, sales biliares, colesterol, lecitina y ácidos grasos, junto con iones y agua. (1)

A continuación se mencionará como el hígado es capaz de llevar a cabo el metabolismo de detoxificación. En primer término, se sabe que contiene una gran cantidad de enzimas con funciones tales que las sustancias que aún no están listas para ser eliminadas por riñón, sean transformadas a metabolitos que sí puedan ser eliminados, siendo este un paso crítico en la toxicidad de xenobióticos. Algunos ejemplos de enzimas involucradas en el proceso de biotransformación de xenobióticos por el hígado, son las siguientes:

Oxidasas

Monooxigenasas con flavinas como coenzimas

Deshidrogenasas

Hidrolasas

Reductasas

Esterasas, amidasas

Sulfotransferasas.

INTRODUCCION

La mayor parte de estas enzimas se localizan en el dominio lipofílico de las membranas del retículo endoplásmico, aunque el metabolismo también se lleva a cabo en la mitocondria, citosol o lisosomas.

El proceso de biotransformación que se lleva a cabo en el hígado, se divide en dos fases: **FASE 1** donde la droga se vuelve más polar por medio de la adición de un grupo funcional específico.

FASE 2 donde ocurren reacciones biosintéticas. Principalmente un sustrato endógeno como el ácido glucurónico o aminoácidos se combinan con el producto de la Fase 1 para formar un compuesto altamente polar. Una característica principal de esta fase es que para las reacciones se requiere de un intermediario reactivo.

Los productos metabólicos usualmente se vuelven inactivos o menos activos que la droga inicial, pero existen ejemplos donde el xenobiótico se biotransforma a un metabolito altamente tóxico, que puede ocasionar mutagenicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad. (2)

De manera breve, se mencionará el mecanismo de las principales reacciones que se llevan a cabo en el hígado durante el proceso de la biotransformación, ya que de esta manera comprenderemos mejor el mecanismo de daño de los hepatotóxicos por el tetracloruro de Carbono (CCl_4) y la galactosamina (D-GLN).

INTRODUCCION

MECANISMO DE DAÑO DEL TETRACLORURO DE CARBONO:

El tetracloruro de carbono:

El CCl_4 , también conocido como tetraclorometano, es un líquido pesado con olor característico, incoloro, claro, no flamable. Más denso que el agua, y no es soluble en ella (un ml se disuelve en 200 ml de agua), pero si es soluble en solventes polares. Debido a esto, su administración se lleva a cabo disolviéndolo en aceite comestible.

El CCl_4 inicia el proceso de *lipoperoxidación* dentro de los primeros minutos después de su administración. A este proceso se le conoce como lesión primaria ya que precede a otros cambios morfológicos y funcionales. (3) El CCl_4 es activado metabólicamente por el citocromo P-450 a el radical triclorometilo (CCl_3^*). El radical CCl_3^* se une covalentemente a proteínas, ADN y lípidos. Posteriormente se oxida a radical triclorometil peróxido CCl_3O_2^* en presencia de oxígeno molecular. Los radicales libres formados a partir del CCl_4 inician por tanto el proceso de lipoperoxidación dentro del retículo endoplásmico utilizando los hidrógenos de ácidos grasos insaturados (LH). El CCl_3^* también es reducido a triclorometano (cloroformo) el cual es no reactivo. Además de iniciar el proceso de lipoperoxidación, el CCl_4 actúa como un sustrato suicida del citocromo P-450, disminuyendo su actividad enzimática.

Durante el proceso de daño se observa que la velocidad de síntesis proteica decae gradualmente, y la estructura ribosomal se pierde. También se daña oxidativamente la enzima responsable del secuestro del Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (Ca^{2+} -ATPasa), en consecuencia la concentración de Ca^{2+} intracelular se eleva iniciándose así, un

INTRODUCCION

proceso de activación de enzimas proteolíticas de manera que ocurre un daño a nivel de membrana.

Podemos concluir que el patrón de daño hepático ocasionado por el CCl_4 es el que sigue:

acumulación de triglicéridos.

daño mitocondrial (debido a la disminución en la concentración de ATP)

daño de la membrana plasmática

muerte celular.

Los eventos iniciales de daño hepático debidos al CCl_4 son hepatomegalia, ictericia y elevación masiva de las transaminasas. En el hígado se produce un fenómeno conocido como stress oxidativo que ocurre cuando se elevan las concentraciones de los radicales libres formados durante el proceso de biotransformación de un metabolito que fué capaz de iniciar el ciclo redox. En condiciones normales los radicales libres son transformados por medio de la superóxido dismutasa en H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), el cual es rápidamente convertido a agua por la acción de la glutatión peroxidasa en el citosol y la mitocondria.

INTRODUCCION

MECANISMO DE DAÑO PROPUESTO PARA LA D-GALACTOSAMINA:

La D-galactosamina:

Su nombre es 2-amino-2-desoxi-D-galactosa, con un peso molecular de 179.17. Cuando se presenta hidrociorada forma cristales y es soluble en agua.

A diferencia del daño ocasionado por el CCl_4 este es un daño difuso con una necrosis desigual del hepatocito e inflamación portal y de parénquima. Se ha reportado que la lesión hepática inducida por la D-GLN es similar a la ocasionada por el virus de la hepatitis B (4). Se altera de tal forma el metabolismo del hepatocito que aunque se observa una disminución en la síntesis de proteínas, la actividad de glucólisis y gluconeogénesis están elevadas ya que no disminuyen las concentraciones en suero de glucosa.

Se ha observado una disminución de los uridín difosfatos debida a la formación de los derivados UDP-azúcares, resultando así una disminución en la síntesis proteica. Posteriormente se observa un daño a la membrana lo que se asocia al aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Al ser metabolizada la D-GLN se acumulan D-GLN-1-P y derivados de UDP-GLN, dando como resultado una disminución importante en la biosíntesis de macromoléculas como proteínas, glucógeno y ácidos nucleicos. (5)

1. D-GLN induce una deficiencia selectiva de UTP, sin reducir ATP, GTP o CTP.

INTRODUCCION

2. UDP-aminoazúcares aumentan, mientras el contenido de UTP baja 30 min después de la inyección con D-GLN.

Los aminoazúcares D-galactosamina y D-glucosamina depletan las reservas de UTP en células normales y malignas. La disminución de UTP es consecuencia de una rápida acumulación de UDP aminoazúcares derivados de galactosamina o glucosamina. La deficiencia de UTP en hígado nos sugiere ser la causa de la inhibición de la síntesis de RNA y proteínas. El metabolismo de la D-GLN conlleva a la formación y acumulación de UDP-galactosamina, UDP-glucosamina, UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina. (7 y 10)

También ocurre una caída lenta de los niveles de sulfhidrilos no proteícos como el glutation, esto nos remite a un stress oxidativo como el presentado en el proceso de daño del CCl₄. (8)

Este modelo animal es considerado como la contraparte de la hepatitis viral aguda en humanos debido a sus características histológicas y clinicopatológicas. Una sola inyección de este aminoazúcar causa una marcada depleción de los uracil-nucleotidos dando como consecuencia la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas. Esta alteración se acompaña de un aumento de los niveles de citocromo P-450 microsomal. Este sistema enzimático es el mediador de la hidroxilación de varios compuestos no polares en el hígado. También produce cantidades significativas de anión superóxido (O⁻²) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Esto eleva el potencial de intermediarios tóxicos, conocidos como radicales hidroxilo (OH·) y el singulete de oxígeno(1O²), los cuales se

INTRODUCCION

cree estan involucrados en la patogénesis de la inflamación, isquemia, enfermedades autoinmunes y varios procesos tóxicos. (9)

La proliferación de hepatocitos comienza a los dos días, alcanzando un máximo a los 5 días y luego declina. Los hepatocitos proliferantes no expresan mRNA para AFP fetal (alfa-feto proteína fetal) o GGT (gama glutamil transpeptidasa). Esto nos indica que después del daño ocasionado por la D-GLN el hígado responde por activación de células progenitoras que proliferan o se diferencian a hepatocitos maduros. Los hepatocitos adultos también pueden proliferar después de la administración de D-GLN pero estos hepatocitos no se dediferencian/rediferencian durante la regeneración del lóbulo hepático.(11)

INTRODUCCION

ENZIMAS:

En estudios previos se ha encontrado que la actividad de ciertas enzimas son indicadores de alguna disfuncionalidad de ciertos órganos o tejidos, de manera que el análisis de su actividad tanto en suero como en fracciones subcelulares han sido de importancia clínica.

La actividad de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en suero está aumentada, en todos los procesos de daño en el hígado, de manera que se usa como un marcador de daño hepático. De esta forma se espera un aumento en la actividad de esta enzima en suero de acuerdo al daño presente en el hígado. (17)

Un aumento en la actividad de Malato Deshidrogenasa (MDH) se relaciona con un aumento en la formación de oxalacetato, el cual es necesario para el ciclo de Krebs. Determinar la actividad de MDH en suero y en fracciones subcelulares nos indicarian de forma indirecta la situación metabólica del hepatocito.

La actividad de Glutamato Deshidrogenasa (GDH) que se involucra en el metabolismo de los aminoácidos, el ciclo de Krebs y el ciclo de la urea. Es de localización mitocondrial. Los estudios que se han realizado hasta la fecha han demostrado que es un marcador de necrosis en hepatocitos de alcohólicos, y que sólo el aumento de su actividad es señal de hepatitis comprobada histológicamente. (12).

INTRODUCCION

En cuanto a Ornitin Carbamil Transferasa (OCT), enzima meramente hepática, es un buen indicador de daño tisular, y posteriormente como señal de inicio de la reparación del tejido (13). Se sabe que el metabolismo de ornitina esta acoplado a la fosforilación oxidativa y un aumento en su metabolismo se usa para mantener los niveles normales de ATP (13). En los casos de daño mitocondrial OCT se ve disminuida en su actividad en mitocondria, sin embargo su actividad en suero se eleva. (14).

Las transaminasas se han usado como indicadores de daño en hígado, debido a que estas son liberadas al suero al poco tiempo de iniciado el mecanismo de toxicidad. Se ha demostrado el aumento en la actividad de Transaminasa de Glutamato-Oxalacetato (TGO) mitocondrial en casos de hepatitis aguda y crónica siendo mayor en la aguda; estos valores en ambos casos son más altos que la actividad de OCT. (15). Un aumento en la actividad de TGO mitocondrial asociado a un aumento en la actividad de TGO total demuestra casos de hepatitis aguda y fulminante. (16)

También existen estudios donde se han relacionado las enzimas mitocondriales como TGO y OCT, en casos de enfermedades hepáticas, de manera que un aumento en la actividad de estas enzimas esta relacionado directamente con el estado patológico. (14)

Ahora hablaremos de las enzimas, sus características e importancia en el metabolismo intermedio que se lleva a cabo en el hígado.

INTRODUCCION

- LACTATO DESHIDROGENASA LDH:

L-lactato:NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.27

Se ha observado la elevación en suero de la actividad de la LDH al principio de un cuadro de hepatitis viral. Es una enzima citosólica la cual presenta mayor actividad en el riñón, para ir disminuyendo en los siguientes órganos: corazón, músculo esquelético, páncreas, bazo, hígado, pulmón. Se han encontrado 5 isoenzimas en los mamíferos. Cataliza la reducción reversible del piruvato, es decir el piruvato en presencia de NADH y la enzima LDH, se reduce a lactato (19).

- MALATO DESHIDROGENASA MDH:

L-malato:NAD⁺ oxidoreductasa, EC 1.1.1.37

Esta enzima tiene dos isoenzimas, una se encuentra en mitocondria y la otra en la fracción citosólica, ambas son dímeros con dos cadenas polipeptídicas idénticas cada una con un peso aproximado de 35 Kd. Esta enzima no es específica para el malato, ya que puede oxidar a otros ácidos 2-hidroxicarboxílicos. Requiere de la presencia de NAD para su actividad y ésta se eleva en suero debido al daño en tejidos como corazón, hígado o músculo esquelético. El malato al oxidarse en presencia de NAD da lugar al oxalacetato, del cual sabemos es de vital importancia para la entrada de acetil CoA al ciclo de Krebs (20).

- GLUTAMICO DESHIDROGENASA GDH:

L-glutamato:NAD oxidoreductasa, deaminación, EC 1.4.1.3

Esta enzima se encuentra en la matriz mitocondrial. En el hígado su actividad es cerca de dos veces mayor en la zona metabólica III que en la zona I. El peso molecular de las

INTRODUCCION

cadena polipépticas es de entre 50 y 60 Kd y se forman hexámeros con un peso de 310 a 350 Kd. Su actividad es de importancia debido a que se involucra en el metabolismo de los aminoácidos, el ciclo de Krebs y el ciclo de la urea. La enzima cuenta con diferentes sitios de regulación, además del sitio activo. Cataliza la reacción del 2-oxoglutarato a glutamato, en presencia de NADH y NH_4^+ . (21).

- **ORNITIN CARBAMIL TRANSFERASA (OCT):**

Carbamil fosfato: L-ornitín carbamil transferasa, EC 2.1.3.3

Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo carbamilo "activado" a el grupo amino de la ornitina, dentro del ciclo de la urea, formando así la citrulina. Su localización es exclusiva de mitocondria hepática y en muy pequeñas cantidades en el intestino. Aparentemente no requiere de coenzimas y es inhibida por sustancias que bloquean grupos SH. (22).

- **TRANSAMINASA DE GLUTAMATO OXALACETATO (TGO):**

L-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.1

Esta enzima se encuentra en altas concentraciones en hígado, tejido nervioso y músculo esquelético y cardíaco. Se han encontrado dos isoenzimas, una es mitocondrial y otra soluble o citosólica. La enzima soluble es un dímero consistente en subunidades idénticas formando así una proteína con un peso molecular de 93 Kd. Se requiere de una coenzima la cual está en la siguiente relación un mol de piridoxal fosfato por mol de monómero. La enzima cataliza la reacción entre el aspartato y el oxoglutarato produciéndose el oxalacetato y glutamato. La elevación en suero de la TGO, se ha presentado en pacientes con hepatitis viral. Es considerada como un índice del daño

INTRODUCCION

hepático. Un incremento en la actividad de estas enzimas sirve para identificar o confirmar el daño hepático. (23).

- **TRANSAMINASA DE GLUTAMATO PIRUVATO (TGP):**

L-alanina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.2

Se encuentra distribuida en una gran variedad de órganos (hígado, riñón, corazón, músculo esquelético y páncreas) y en suero. Existen múltiples formas moleculares, sin embargo la forma mitocondrial es muy inestable. Requiere de un mol de piridoxal fosfato por mol de monómero. (24).

Esquema de reacciones:

Piruvato + NADH + H ⁺	LDH	lactato + NAD ⁺
Malato + NAD ⁺	MDH	oxalacetato + NADH + H ⁺
Oxoglutarato + NADH + H ⁺	GDH	glutamato + NAD ⁺ + H ₂ O
Carbamil-P + ornitina	OCT	citulina + Pi
Aspartato + oxoglutarato	TGO	glutamato + oxalacetato
Alanina + oxoglutarato	TGP	glutamato + piruvato

En algunas alteraciones hepáticas, se ha encontrado disminución de las proteínas plasmáticas, en especial de albúmina. Durante los procesos de hepatitis aguda se presenta un aumento ligero de triglicéridos y alteración en el metabolismo de la bilirrubina (17).

METODO EXPERIMENTAL

Tomando en cuenta que los hepatotóxicos cuentan con diferentes características físicas y químicas, las vías de administración y los requerimientos de los animales de investigación son diferentes, por lo que se describen los requerimientos en ambos casos. Posteriormente se describen las características del sacrificio y el tratamiento de las muestras, que en los dos tratamientos son los mismos pasos.

VIA DE ADMINISTRACION Y REQUERIMIENTOS INICIALES:

Para el tratamiento con CCl₄:

Se trabajó con ratas macho Wistar con un peso aproximado de 200 a 250 g. a las cuales se les administró CCl₄ por vía oral (usando una sonda), a una dosis de 2ml en una dilución 1:4 por kilogramo de peso del animal.

Para suero, los tratamientos se indican a continuación: 24, 48, 72 y 96 horas; y para las fracciones los tiempos de tratamiento fueron a las 24, 48 y 72 horas.

Para el tratamiento con D-Galactosamina:

Se trabajó con ratas macho Wistar con un peso aproximado de 150 a 200 g. a las cuales se les administró D-GLN por vía intraperitoneal, a una dosis de 500 mg. por kilogramo de peso del animal.

Para suero, los tratamientos fueron a 5 tiempos, los cuales se indican a continuación: 6, 12, 24, 48 y 96 horas; y para las fracciones subcelulares los tiempos de tratamiento fueron a las 24 y 48 horas.

METODO EXPERIMENTAL

SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRA:

Después de la administración del fármaco, las ratas se mantenían en cajas de plástico con agua y alimento *ad libitum*. Al llegar el tiempo para el sacrificio del animal, se realizaban los siguientes pasos:

- a) administración vía intraperitoneal de pentobarbital sódico a dosis de anestesia
- b) se pesa al animal
- c) al entrar en estado anestésico el animal, se decapitaban
- d) recolección de la muestra de sangre
- e) se realiza una insición en el abdomen del animal y se toma todo el hígado, se pesa y se toma una muestra de aproximadamente 5 g. de masa
- f) la muestra de hígado se lava en amortiguador para mitocondrias. (Sacarosa 2.5 M, TRIS 0.01 M, EGTA 0.2 mM, Albúmina 0.2 %, pH 7.4).
- g) se homogeniza en 25 ml. del mismo amortiguador y se realiza a continuación el método estandar de fraccionamiento celular.

FRACCIONAMIENTO:

A.

Centrifugación del homogenado por 15' a 3,500 rpm manteniendo la temperatura de 0-4°C. (De ahora en adelante no se indicará la temperatura de la centrifugación, ya que esta se realiza siempre de 0-4°C). Obteniendo así el sobrenadante 1 y el precipitado 1. En el precipitado 1 se obtienen las membranas y los núcleos después del tratamiento

METODO EXPERIMENTAL

adecuado, de manera que el citosol, las mitocondrias y los microsomas se encuentran en el sobrenadante, y se obtienen por medio de los pasos que siguen a continuación.

B.

El sobrenadante 1 se somete nuevamente a centrifugación por 15' a 7,500 rpm, 0-4°C. Separo el precipitado y el sobrenadante, al precipitado lo trato con amortiguador para mitocondrias y centrifugo por 15' a 10,000 rpm. y de esta manera en el precipitado obtengo las mitocondrias, las cuales se resuspenden con el amortiguador de mitocondrias y se guarda en tubos de plástico, debidamente etiquetados. Al sobrenadante lo centrifugo por 70' a 45,000 rpm y así separé al citosol en el sobrenadante, y los microsomas en el precipitado, este precipitado se resuspende en amortiguador para mitocondrias, y se guarda.

C.

El precipitado 1 se resuspende en el amortiguador para membranas (Sacarosa 2.5 M, TRIS 0.01M pH 7.4) llevando a un volumen de 20 ml, poniendo 10ml en un tubo A y otros 10 ml en el tubo B, centrifugo por 15 ' a 3,500 rpm. Del tubo A, tiro el sobrenadante y por medio de la formación de un gradiente de densidad, (por medio del Percoll d=1.13 g/ml) y otro de concentración (por medio de la sacarosa 2M) de manera que al centrifugarse a 16,000 rpm por 25', se separen las membranas, las cuales están en la superficie, de otros organelos que se pudieran encontrar en esta muestra. Posteriormente pasamos a un lavado, el cual se realizó en las mismas condiciones, pero agregando cloruro de calcio (1.3 mM), y centrifugando a 18,000 rpm por 25'. De esta

METODO EXPERIMENTAL

manera se obtienen las membranas que se encuentran en el tubo, para extraerlas uso una pipeta Pasteur y almacenarlas.

El tubo B nos sirve para obtener los núcleos, los cuales se encuentran ya en el precipitado que se trata con 15 mililitros de una solución de TRITON X-100 y citrato, se filtra con una gasa y se centrifuga a 3,500 rpm por 6' y repite este lavado 2 veces más, pero la última se realiza con agua destilada. Los núcleos se resuspenden en el menor volumen posible.

El equipo en el cual se realizaron todas las centrifugaciones fue: Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge.

MUESTRA DE SANGRE:

La recolección de la muestra de sangre se realizó en tubos Vacutainer con SST (gel activador de la coagulación), posteriormente se centrifuga a 2,500 rpm en una centrifuga clínica durante 5 min. obteniéndose así el suero, el cual se colecta en tubos de plástico y se congela hasta su posterior tratamiento.

La centrifugación se realizó en una centrifuga clínica.

DETERMINACIONES ENZIMATICAS:

Una vez que se cuenta con las fracciones y el suero se procede a la determinación de la actividad de las enzimas LDH, MDH, GDH, OCT, TGO y TGP. En general los métodos

METODO EXPERIMENTAL

de determinación fueron los mismos en suero que en las fracciones, sólo se necesitó variar el método en el caso de las transaminasas, por lo que se explican ambos métodos. Otro factor importante, antes de iniciar la determinación de la actividad de las enzimas, y sólo en las fracciones, se procede a determinar la cantidad de proteína presente, para obtener la relación de $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Métodos de determinación de proteína:

Los métodos para determinar la concentración de proteínas son muchos y muy variados, la elección del método se basó en su facilidad de realización y en ser considerado el más preciso y sensible. El método de elección fue el descrito por Lowry et al. (18), y combina la reacción de Biuret con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu en fenol de los residuos de tirosina y triptófano.

Métodos de determinación de la actividad enzimática:

- **LACTATO DESHIDROGENASA LDH:**

L-lactato:NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.27

Los métodos de determinación para la actividad esta enzima citosólica pueden ser espectrofotométricos, monitoreando el aumento o decremento en la absorción de NADH a 339 nm. El método que se utilizó fue descrito por Anne Vassault (19). Donde la muestra se mantiene en solución de Tris/NaCl//NADH y se inicia la reacción agregando el piruvato, y se toman las lecturas de absorbancia cada 30 segundos durante 3 minutos, se obtiene un promedio de ΔAbs por min.

METODO EXPERIMENTAL

- **MALATO DESHIDROGENASA MDH:**

L-malato:NAD⁺ oxidoreductasa, EC 1.1.1.37

Se llevó a cabo el método descrito por Alistair F. Smith (20). El cual es un método espectrofotométrico que se basa en la absorción a 339 nm debida a la oxidación del NADH o reducción del NAD. Debido a la inestabilidad del oxalacetato, que se puede descarboxilar espontáneamente a piruvato y este a su vez reaccionar con el NADH presente, se utiliza al malato y NAD como sustratos. Para la determinación de la actividad enzimática se incubó previamente por una hora en presencia de NAD, la reacción se dispara en presencia del malato, y se toman las lecturas de absorbancia cada 30 segundos durante 3 minutos.

- **GLUTAMICO DESHIDROGENASA GDH:**

L-glutamato:NAD oxidoreductasa, deaminación, EC 1.4.1.3

El método fue descrito por Ellen y Freidrich Werner Schmidt (21). Donde se determinó la disminución en la absorbancia debida a la oxidación del NADH a 339 nm. El tubo de reacción contiene acetato de amonio, el cual provee de los iones amonio requeridos para la enzima; el ADP, que se utiliza para estabilizar a la enzima; el NADH, que es el cofactor; todo esto en un amortiguador de fosfatos, y al estabilizarse la reacción (aproximadamente 5 minutos) se agrega el cetoglutarato y se lee la absorbancia cada minuto durante 5 minutos.

METODO EXPERIMENTAL

- ORNITIN CARBAMOIL TRANSFERASA (OCT):

Carbamoil fosfato: L-ornitin carbamoil transferasa, EC 2.1.3.3

Se realizó el método descrito por Giovanni Ceriotti (22). Se cuantifica la formación de citrulina, por medio de un método colorimétrico, que al reaccionar con la diacetilmonoxima-antipirina se forma un complejo colorido, que muestra cierta absorbancia a 460 nm. Donde la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de citrulina formada. Debido a que la urea que pueda existir en la muestra inhibiría la reacción, esta se destruye por acción de la ureasa que se agrega al tubo de reacción. Además de que se elimina la interferencia ocasionada por las proteínas al utilizar la menor cantidad de muestra. El tubo de reacción se incuba por 30' a 37°C y se agrega el reactivo cromogénico, el cual se deja reaccionar por 15' a temperatura de ebullición del agua, transcurriendo este tiempo las muestras se enfrían al chorro del agua y se determina la absorbancia.

- TRANSAMINASA DE GLUTAMATO OXALACETATO (TGO):

L-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.1

A esta enzima también se le conoce como aspartato aminotransferasa. Se determinó por un método colorimétrico, el cual se basa en cuantificar a 546 nm el complejo colorido formado al reaccionar el oxalacetato con la 2,4 dinitrofenilhidrazina en medio básico. La técnica fué descrita por Robert Rej y Mogens Horder (23). La reacción se lleva a cabo a 37°C por 60', después se agrega el reactivo para cetonas durante 20' a temperatura ambiente y se revela con NaOH, de manera que la coloración es directamente proporcional a la actividad de TGO.

METODO EXPERIMENTAL

Para la determinación de esta enzima en las diferentes fracciones se utilizó el método UV el cual se basa en que el oxalacetato formado es reducido por el NADH, en presencia de la enzima MDH (23). En el tubo de reacción se coloca la muestra, el aspartato, las enzimas MDH y LDH (se agrega para reducir al piruvato), y el piridoxal fosfato es cual funciona como cofactor de la enzima., se procede a incubar por 10' a 30°C e inmediatamente se agrega el 2 oxoglutarato y se determina el cambio de absorbancia cada 30 segundos durante 3 minutos.

- TRANSAMINASA DE GLUTAMATO PIRUVATO (TGP):

L-alanina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.2

A esta enzima también se le conoce como alanin aminotransferasa. El método fué descrito por Mogens Horder y Robert Rej (24). En este método se determina la formación de piruvato, el cual al reaccionar con la 2,4 dinitrofenilhidrazina en medio básico forma un complejo colorido que se cuantifica a 546 nm. Para la determinación de esta enzima en las diferentes fracciones se utilizó el método UV el cual se basa en que el piruvato formado es reducido por el NADH, en presencia de la enzima LDH (24). En el tubo de reacción se coloca la muestra, la alanina, la enzima LDH y el piridoxal fosfato el cual funciona como cofactor de la enzima., se procede a incubar por 10' a 30°C e inmediatamente se agrega el 2 oxoglutarato y se determina el cambio de absorbancia cada 30 segundos durante 3 minutos.

METODO EXPERIMENTAL

DETERMINACION DE METABOLITOS EN SUERO:

Se determinó la concentración en suero de glucosa, bilirrubina total, albúmina y triglicéridos, usando los equipos de reactivos proporcionados por la casa SIGMA DIAGNOSTICS, siguiendo la técnica indicada para tal efecto en los manuales.

ANALISIS ESTADISTICO:

Métodos estadísticos:

Para el análisis estadístico de los resultados de la actividad enzimática se llevo a cabo la prueba t-student para poblaciones con diferente número de muestras, tomando en cuenta una p menor a 0.05 para afirmar variación significativa de los resultados obtenidos.

RESULTADOS

Primero se muestran los datos de las actividades enzimáticas en suero y fracciones subcelulares para el tetracloruro de carbono, después para la galactosamina y por último los datos de los metabolitos en suero a las 24 horas después de la administración de cada hepatotóxico.

Se describen los resultados que después de ser analizados por la prueba t-student para grupos con diferentes números de muestras, tienen una P menor a 0.05 que nos indica una diferencia significativa en la actividad enzimática, respecto al grupo control.

A manera de gráficas se muestran los resultados obtenidos en las actividades séricas de las enzimas, graficando la actividad, expresada en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ o U/l según sea el caso, contra el tiempo de tratamiento.

TETRACLORURO DE CARBONO:

Para la actividad sérica de LDH, se muestra un aumento a las 24 horas después de la administración de CCl_4 de 44 veces la actividad normal. Dentro de las siguientes 24 horas el valor en su actividad en suero regresó a los valores normales. (Gráfica 1.)

El aumento máximo en la actividad de MDH en suero se presentó a las 48 horas después de la administración de CCl_4 , encontrando de nuevo valores normales a las 72 horas. (Gráfica 1).

RESULTADOS

En cuanto a la actividad sérica de OCT, ésta se elevó 30 veces el valor normal, a las 24 horas después de administrado el CCl₄. (Gráfica 2). La actividad de GDH en suero se elevó 48 veces el nivel normal, esto ocurrió en las 48 horas después de administrado el CCl₄. (Gráfica 2)

La elevación de las transaminasas en suero ocurrió a las 24 horas después de administrado el hepatotóxico, para TGO y para TGP el pico se presenta a las 48 horas. (Gráfica 2). El aumento en la actividad es del orden de 15 y 38 veces el valor normal respectivamente.

Observamos que todas la enzimas estudiadas elevaron su actividad en suero, después de ser la administración oral de CCl₄. (Gráficas 1 y 2)

Los datos en la actividad sérica de estas enzimas nos sirvieron de base para encontrar los tiempos adecuados en los siguientes estudios, de manera que se realizaron las determinaciones de las actividades enzimáticas en las diferentes fracciones subcelulares a las 24, 48 y 72 horas.

Como se muestra en la tabla I, en todas las fracciones estudiadas se alteraron las actividades de al menos una enzima. Podemos observar que en homogenado las enzimas MDH y GDH disminuyeron su actividad en un 20 % a las 24 horas después de la administración del CCl₄.

RESULTADOS

En citosol la actividad de TGP, a las 48 horas se encuentra disminuida en un 30 % del valor normal. En microsomas la actividad de OCT, GDH y TGO se elevan, siendo que para GDH y TGO el máximo de actividad es a las 24 horas y para OCT se presenta a las 48 horas después de administrar el CCl₄.

En mitocondria la actividad de LDH, OCT y TGP se encontró elevada a las 24 horas después de la administración del CCl₄.

En membranas, la actividad de LDH se encuentra disminuida en un 50 % del valor normal, y para MDH su actividad aumentó en un 74 %. Ambas alteraciones se observan en las 48 horas después de la administración del CCl₄.

GALACTOSAMINA:

Como podemos observar en la gráfica 3, las enzimas GDH, TGP, TGO y OCT aumentan su actividad en suero después de administrarse por vía intraperitoneal la galactosamina.

Para la actividad de GDH en suero observamos que se eleva a las 12 horas 6.83 veces sobre el nivel normal, aún a las 72 horas se mantuvo elevada 2 veces sobre su actividad normal. Esta es la única enzima que mostró un pico máximo de actividad a las 12 horas después de la administración de D-GLN. (Gráfica 3)

RESULTADOS

En cuanto a OCT, y las transaminasas (Gráfica 3), su actividad sérica se encontró elevada a las 24 horas después de la administración de D-GLN. Tomando en cuenta que las enzimas principales indicadoras de daño hepático son las transaminasas, se realizaron las siguientes determinaciones en las fracciones subcelulares a partir de la 24 horas y sólo hasta las 48 horas, pues ninguna enzima mostró alteraciones en su actividad sérica posteriores a este tiempo.

En la tabla II se muestran las alteraciones en las actividades de las enzimas encontradas en las diferentes fracciones subcelulares, después de la administración de la D-GLN.

En homogenado se observó disminución en la actividad de MDH y TGO a las 48 y 24 horas respectivamente, después de la administración de la D-GLN.

En la fracción citosólica, la actividad de MDH, OCT y TGO se encontró disminuida desde un 17 hasta un 80 % por debajo del valor normal.

En microsomas se encontró disminuida la actividad de GDH y TGO a las 24 horas después de la administración de la D-GLN, mientras que para TGP su actividad se elevó 3.1 veces la actividad basal.

En mitocondrias, se observó un aumento en la actividad de GDH de 1.8 veces el valor normal, este cambio se presentó en las 24 horas posteriores a la administración de D-GLN.

RESULTADOS

En membranas, la actividad de MDH sólo fué del 30 % de su actividad normal en esta fracción, para OCT su actividad se elevó a las 24 horas después de la administración de D-GLN.

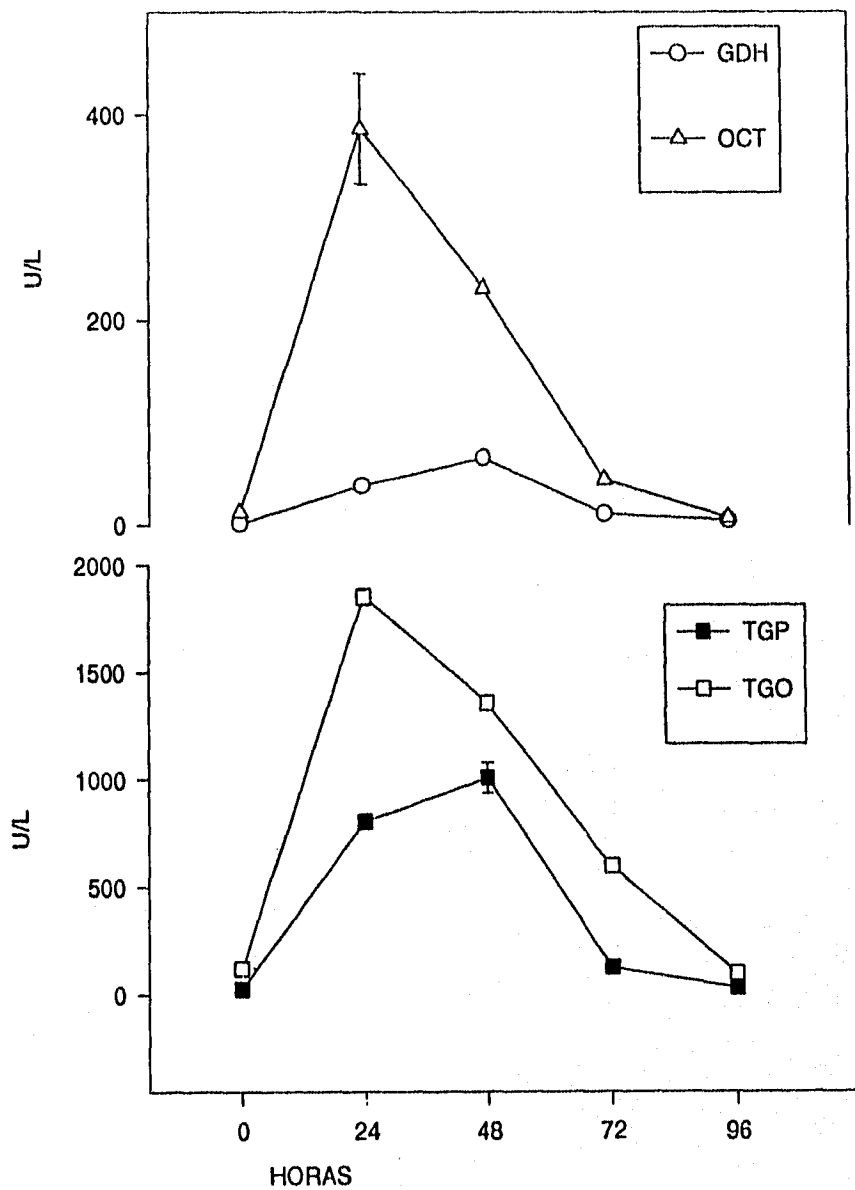
La actividad de LDH en núcleos se incrementó a las 24 horas posteriores a la administración de D-GLN unas 3.6 veces sobre la actividad normal.

De acuerdo a los datos obtenidos en las actividades de las enzimas en suero y fracciones subcelulares, se realizarón las determinaciones de los metabolitos en suero, a las 24 horas después de la administración del hepatotóxico.

Como se muestra en la tabla III, no se observan cambios en los niveles séricos de glucosa y albúmina, mientras que para triglicéridos y bilirubina directa se observa un aumento en su concentración en suero, siendo más pronunciado para el CCl₄ que para D-GLN.

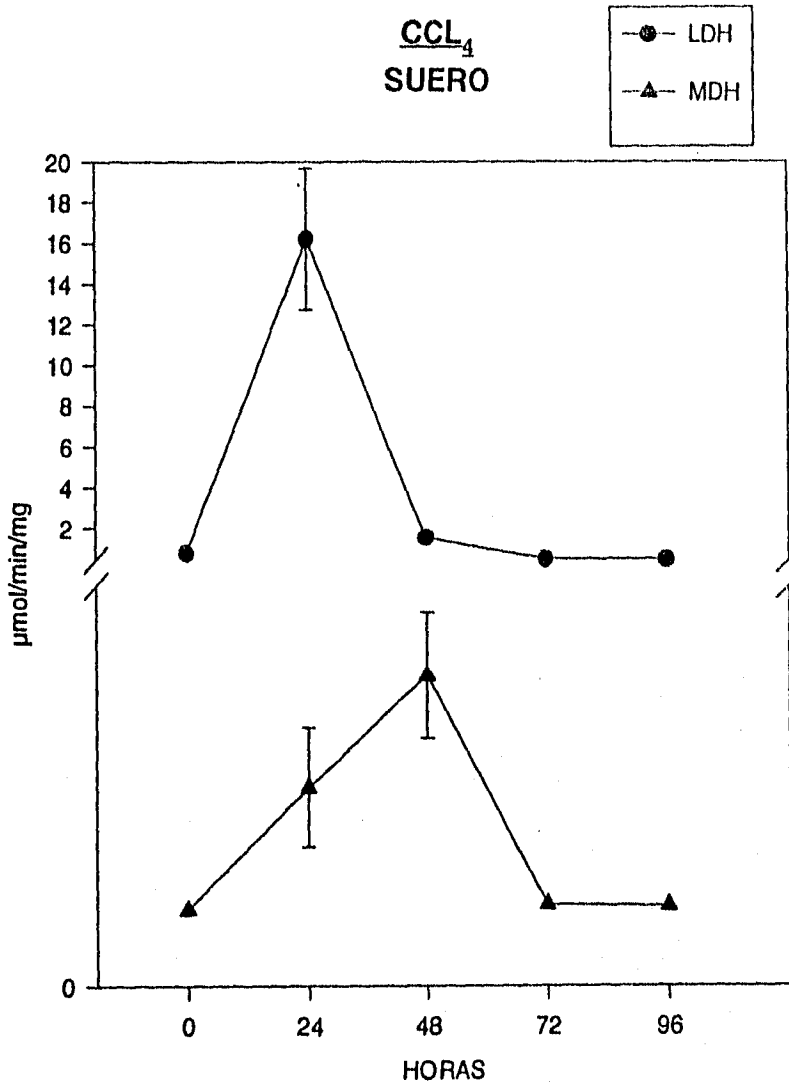
CCL₄
SUERO

GRAFICA 1



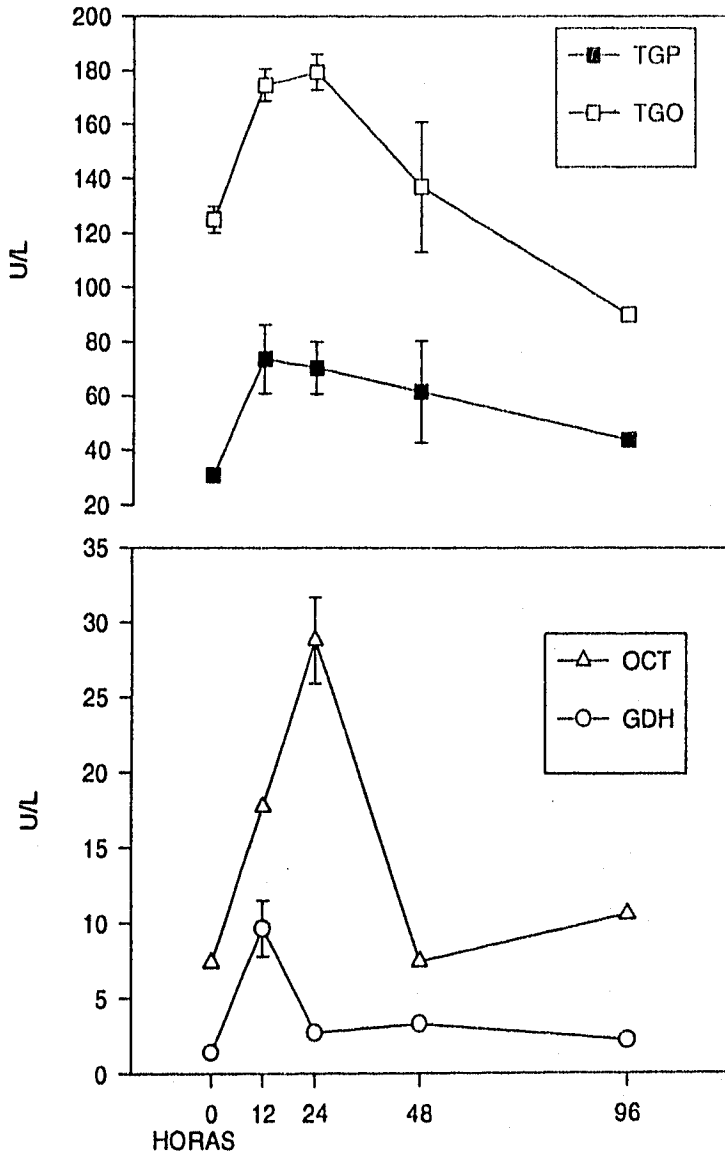
RESULTADOS

GRAFICA 2



RESULTADOS

GALACTOSAMINA *GRAFICA 3*
SUERO



RESULTADOS

TABLA I

% DE ACTIVIDAD DE ENZIMAS EN LAS DIFERENTES FRACCIONES CELULARES,
AL SER ADMINISTRADO POR VÍA ORAL EL TETRACLORURO DE CARBONO

FRACCION	ENZIMA	TIEMPO HORAS	% DE ACTIVIDAD DEL CONTROL. ± E.S.
HOMOGENADO	MDH	24	78.75 ± 5.6
HOMOGENADO	GDH	24	79.01 ± 1.0
CITOSOL	TGP	48	69.89 ± 1.3
MICROSOMAS	GDH	24	125.36 ± 7.1
MICROSOMAS	OCT	48	135.7 ± 7.1
MICROSOMAS	TGO	24	136.7 ± 4.8
MITOCONDRIAS	LDH	24	201 ± 30.3
MITOCONDRIAS	OCT	24	125 ± 7.7
MITOCONDRIAS	TGP	24	177 ± 10.8
MEMBRANAS	LDH	48	50.99 ± 4.6
MEMBRANAS	MDH	48	174.16 ± 16.1

RESULTADOS

TABLA II

% DE ACTIVIDAD DE ENZIMAS EN LAS DIFERENTES FRACCIONES CELULARES,
AL SER TRATADOS CON GALACTOSAMINA

FRACCION	ENZIMA	TIEMPO HORAS	% DE ACTIVIDAD DEL CONTROL.
HOMOGENADO	MDH	48	73.24 ± 4.6
HOMOGENADO	TGO	24	69.73 ± 3.7
CITOSOL	MDH	24	73.8 ± 6.1
CITOSOL	OCT	48	56.0 ± 15.4
CITOSOL	TGO	24	21.8 ± 13.3
MICROSOMAS	GDH	24	50.45 ± 6.9
MICROSOMAS	TGO	24	73 ± 5.2
MICROSOMAS	TGP	24	309 ± 40
MITOCONDRIAS	GDH	24	180 ± 10
MEMBRANAS	MDH	48	29.4 ± 13.6
MEMBRANAS	OCT	24	142.34 ± 6.3
NUCLEOS	LDH	24	363.0 ± 92.3

TABLA III.

DETERMINACION DE METABOLITOS EN SUERO A LAS 24 HORAS:

HEPATOTOXICO	GLUCOSA mg/dl	TRIGLICERIDOS mg/dl	ALBUMINA mg/dl	BILIRRUBINA DIRECTA mg/dl
CONTROL	102.6	53.5	3.1	0.88
CCI4	100.0	106.0	2.9	1.3
D-GLN	101.5	100.0	3.6	0.8

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La concentración de los metabolitos como glucosa, triacilglicéridos, albúmina y

DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION

TETRACLORURO DE CARBONO

El estudio de la actividad enzimática en la hepatotoxicidad del CCl_4 se realizó en suero y fracciones subcelulares de los hepatocitos. De la misma forma se analizaron las concentraciones de algunos metabolitos y las características morfológicas del hígado, después de la administración del hepatotóxico.

Las alteraciones morfológicas del hígado ocasionadas por el CCl_4 a las 24 horas fueron hepatomegalia, cambio en la coloración y pérdida en la estructura de los bordes, los cuales dejaron de ser finos y se mostraban redondeados. En conjunto a estas características morfológicas se les conoce como hígado graso, siendo éste un estado patológico que se caracteriza en alteraciones en la dinámica de los lípidos corporales. (3).

Estas alteraciones se presentaron en menor magnitud y no en todos los casos de los animales sacrificados a las 48 y 72 horas. A las 96 horas no se observó ningún cambio morfológico.

De acuerdo a estos cambios, concluimos que morfológicamente el daño ocasionado por la administración del CCl_4 es de mayor magnitud a las 24 horas como consecuencia de necrosis celular y alteración en la homeostasis de los lípidos corporales. (26).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION

TETRACLORURO DE CARBONO

El estudio de la actividad enzimática en la hepatotoxicidad del CCl_4 se realizó en suero y fracciones subcelulares de los hepatocitos. De la misma forma se analizaron las concentraciones de algunos metabolitos y las características morfológicas del hígado, después de la administración del hepatotóxico.

Las alteraciones morfológicas del hígado ocasionadas por el CCl_4 a las 24 horas fueron hepatomegalia, cambio en la coloración y pérdida en la estructura de los bordes, los cuales dejaron de ser finos y se mostraban redondeados. En conjunto a estas características morfológicas se les conoce como hígado graso, siendo éste un estado patológico que se caracteriza en alteraciones en la dinámica de los lípidos corporales. (3).

Estas alteraciones se presentaron en menor magnitud y no en todos los casos de los animales sacrificados a las 48 y 72 horas. A las 96 horas no se observó ningún cambio morfológico.

De acuerdo a estos cambios, concluimos que morfológicamente el daño ocasionado por la administración del CCl_4 es de mayor magnitud a las 24 horas como consecuencia de necrosis celular y alteración en la homeostasis de los lípidos corporales. (26).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La concentración de los metabolitos como glucosa, triacilglicéridos, albúmina y bilirrubina en suero, se usaron como índice de alteración en el metabolismo hepático. Siendo el hígado el principal órgano de secreción de la albúmina y de la glucosa sus concentraciones se mantienen a las 24 horas, tiempo en el que morfológicamente las alteraciones son mayores. Esto nos hace suponer que los cambios en el metabolismo hepático son tales que mantienen la funcionalidad como órgano de secreción de albúmina y glucosa. Es decir la cantidad de albúmina secretada se mantiene por los hepatocitos sobrevivientes a la necrosis y para mantener el nivel de glucosa en sangre la gluconeogénesis se eleva como un mecanismo secundario a la regeneración. (26).

El aumento en la concentración de triacilglicéridos en suero se debe a las alteraciones en el intercambio de lípidos. La concentración de bilirrubina directa aumenta en suero siendo ocasionado por daño hepatobiliar, es decir la conjugación de la bilirrubina por el hígado se lleva a cabo de manera normal pero su secreción se ve alterada. (1).

Al analizar la actividad de las enzimas en suero, todas muestran el pico máximo entre las 24 y 48 horas después de la administración oral del tóxico (Gráfica 1). La actividad sérica de algunas enzimas tardan en regresar a sus valores normales, por lo que el estudio se continuo hasta las 96 horas, donde la actividad de todas la enzimas se encuentra en los valores normales.

Las actividades séricas de las transaminasas se han usado como índice de muerte celular y daño hepático (3), por lo que el patrón de liberación de las transaminasas en suero, nos indican que a las 24 horas ocurre el mayor grado de daño tisular, y la

DISCUSION Y CONCLUSIONES

recuperación del hígado es lenta pues no se observan valores normales en su actividad sino hasta las 96 horas después de la administración del hepatotóxico.

Además de observar la actividad en suero de las transaminasas se analizó la elevación masiva de las otras enzimas, aún las mitocondriales (OCT, TGO, GDH) la cual ocurrió entre las 24 y 48 horas posteriores a la administración del CCl_4 . En conjunto esto nos indica necrosis hepática, la cual es máxima en las 24 horas y se mantiene incluso a las 48 horas donde se observa el daño a nivel mitocondrial, aumento en la actividad de GDH (27). A las 96 horas después de la administración del hepatotóxico, la necrosis ha cesado.

Analizando en conjunto las actividades en suero y en las diferentes fracciones subcelulares, encontramos lo siguiente:

La actividad de LDH en suero aumenta a las 24 horas pero es la única enzima que a las 72 e incluso 96 horas su actividad se normaliza. Analizando su actividad en cada fracción subcelular, encontramos que en las mitocondrias se eleva a las 24 horas, mientras que para las membranas disminuye a las 48 horas. Este patrón de actividad se explica como un proceso en el cual la enzima se particula, es decir la pérdida en su actividad en la membrana puede ser ocasionada por un proceso dependiente de su alteración ocasionada por el hepatotóxico y el aumento en su actividad en mitocondrias se deba a que las mismas están metabólicamente muy activas, y no a una mayor o menor producción de la enzima.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Esto nos indica una gran ventaja metabólica, pues el hígado no la puede producir en las cantidades requeridas, permitiendo que se dirija a zonas donde es necesaria su actividad. De esta forma los hepatocitos se dedican al restablecimiento de su funcionalidad como sería el mantener la homeostasis de las proteínas de secreción. Estos datos son solo una pista en la cual se propone no una mayor producción de ciertas enzimas, sino una redistribución de las mismas y la prueba concluyente sería el estudio de los RNAm en los hepatocitos. (26).

En cuanto a la actividad de MDH, podemos observar que en homogenado esta disminuye, y en membranas se eleva siendo otro ejemplo donde la enzima se particula. También nos muestra que la membrana está en un proceso de reajuste de su estructura posterior a la necrosis celular y que los hepatocitos sobrevivientes tienen que entrar en división celular para restablecer la funcionalidad del hígado (28) siendo necesaria la formación de membranas; este proceso ya se ha iniciado a las 24 horas por los hepatocitos que sobrevivieron a la necrosis.

La observación de la actividad de la GDH es muy importante pues su localización especial, matriz mitocondrial, y su mayor actividad en la zona metabólica III (1) nos indican que las mitocondrias en los hepatocitos sobrevivientes se encuentran en franca actividad metabólica (27). El hecho de encontrar valores normales a las 48 horas nos hace suponer que algunos hepatocitos se encuentran en proceso de mitosis donde sus actividades metabólicas cesan, pero otras poblaciones de hepatocitos se encuentran activos para mantener la funcionalidad del hígado. Si se analizara el porcentaje de

DISCUSION Y CONCLUSIONES

hepatocitos en cada fase del ciclo celular y la funcionalidad de la membrana se podría demostrar este hecho.

La actividad de OCT, otra enzima de matriz mitocondrial, aumenta en mitocondrias y microsomas. Observamos que todas las actividades séricas de todas las enzimas de localización mitocondrial se mantienen por mucho más tiempo en el suero que las enzimas citosólicas pudiendo ser señales moduladoras, producidas por el hígado y para el hígado [regulación autócrina (28)], del proceso regenerativo. (29)

En conjunto, el patrón de daño ocasionado por el CCl₄ es necrosis, siendo mayor a las 24 horas y al mismo tiempo se inicia el proceso de regeneración por los hepatocitos sobrevivientes al hepatotóxico; y alteración en el metabolismo hepático para el mantenimiento de la homeostásis de la albúmina y glucosa principalmente.

GALACTOSAMINA

Los cambios morfológicos encontrados en el hígado a las 24 horas después de la administración de la D-GLN fueron: hepatomegalia, cambio en la coloración y pérdida en la estructura de los bordes. Estas alteraciones morfológicas no se observaron en todos los casos y fueron menos severos que los ocasionados por la administración del CCl₄.

La concentración de glucosa en sangre no se ve alterada tomando en cuenta que también es el tiempo en el que se manifiesta mayor necrosis, podemos afirmar que la

DISCUSION Y CONCLUSIONES

actividad de glucólisis y gluconeogénesis están elevadas (5) para mantener el aporte normal de este metabolito en sangre.

Se observa un aumento en la concentración de triacilglicéridos en sangre, esto es ocasionado por las alteraciones en el intercambio de lípidos. La concentración de bilirrubina directa en sangre se mantiene, esto es contrario a lo que reporto Medline (4), por lo que suponemos que se está llevando a cabo su conjugación y secreción de manera normal.

La concentración de albúmina sérica no se encuentra alterada. Podemos concluir que los hepatocitos conservan su actividad metabólica para el mantenimiento de ciertas funciones, como la secreción de albúmina y glucosa.

Los parámetros para determinar el daño hepático fueron las alteraciones morfológicas y el aumento en la actividad sérica de las transaminasas y OCT. Observamos que no todas las enzimas aumentaron su actividad sérica como LDH y MDH, por lo que suponemos que el daño ocasionado por la administración de la D-GLN comienza a partir de las 12 horas y es máximo a las 24 horas. Mientras que a las 96 horas ya no se observan alteraciones en la actividad sérica de estas enzimas.

En general se observa una disminución en la actividad de las enzimas en las diferentes fracciones, con excepción de TGP en microsomas, GDH en mitocondrias y OCT en membranas, esto se explica por la disminución en la síntesis proteica ocasionada por la administración de la D-GLN.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El aumento en la actividad sérica de GDH, es señal de necrosis (17). Analizando que a las 24 horas aumentó su actividad en mitocondrias y posteriormente no se observa disminución es quizá un proceso donde la enzima se particula, de esta manera no se tiene necesidad de producirse en mayor cantidad por un hígado ya de por sí dañado recordando que la síntesis de proteínas disminuye por la acción del hepatotóxico. (7).

Observando la actividad de TGP, ésta aumenta en microsomas y no disminuye en ninguna fracción, por lo que pensamos que de alguna manera se está produciendo en este momento y que la fracción microsomal se encuentre en franca actividad.

El aumento en la actividad de GDH en las mitocondrias, puede ser señal de inicio en el proceso de regeneración hepática, pues su actividad es mayor en la zona metabólica III (1) y mientras otras enzimas disminuyen su actividad, ésta se eleva.

Si tomamos en cuenta que ocurre un aumento en la actividad de las transaminasas en suero y esto nos habla de necrosis, al relacionarlo con el patrón de actividad enzimática en las fracciones, en general se observó disminución en su actividad por lo que suponemos se debe a disminución en su producción, como un hecho ocasionado por la disminución en la síntesis de proteínas.

El aumento en la actividad de TGP en microsomas, GDH en mitocondrias y OCT en membranas, probablemente se deba a un aumento en su producción.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Podemos concluir que el daño ocasionado por la D-GLN es difuso, no localizado, y provoca liberación de enzimas a suero debido al estado de necrosis existente en el hígado.

Histológicamente (datos no mostrados) se observan el mayor número de alteraciones a las 24 horas, pero se iniciaron desde las 6 horas posteriores a la administración del hepatotóxico, por lo que en conjunto el hígado lleva a cabo cambios metabólicos para el mantenimiento de su función como órgano de secreción de albúmina y glucosa.

Nuevamente las actividades séricas de las enzimas mitocondriales son las primeras en elevarse y aunque no se mantienen por mucho tiempo, si se localizan en sitios específicos del hepatocito. Sosteniendo de igual manera que pueden funcionar como señales moduladoras del proceso regenerativo como se ha demostrado en el hígado en regeneración posterior a hepatectomía parcial. (29).

Encontramos con que la actividad de LDH, una enzima citosólica y con 5 isoenzimas existentes (30), fué la única enzima que aumento su actividad en núcleos, además fué el único sitio donde esta enzima mostró alteraciones. Tomando en cuenta que la enzima no modificó su localización creemos que este aumento se deba a que el hígado la está produciendo como una señal en el proceso de regeneración.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los hepatotóxicos, tetracloruro de carbono y galactosamina ocasionan diferentes patrones de daño, siendo más severo el provocado por el tetracloruro de carbono, y más temprano el de galactosamina.
2. El aumento en la actividad microsomal y mitocondrial pueden ser parte del proceso de regeneración.
3. La producción de ciertas enzimas mitocondriales pueden funcionar como señales moduladoras del proceso regenerativo.
4. Los hepatocitos conservan su actividad metabólica para el mantenimiento de ciertas funciones, como la secreción de albúmina y glucosa. La actividad de glucólisis y gluconeogénesis se eleva como un mecanismo de sostenimiento en la homeostasis de la glucosa.
5. El metabolismo de los lípidos se altera en ambos casos y como en consecuencia se observa daño en la estructura membranal.

BIBLIOGRAFIA

1. RUBIN E, FARBER J.L. El hígado y las vías biliares, pp653-ss.
2. GASCON M.P., DAYER P 1991, Hepatic metabolism of drugs and toxins, OXFORD TEXTBOOK OF CLINICAL HEPATOLOGY, VOL. I, OXFORD MEDICAL PUBLICATIONS, EDITED BY NEIL McINTYRE., pp 247-258.
3. KAHL R 1991., Hepatotoxicidad, OXFORD TEXTBOOK OF CLINICAL HEPATOLOGY, VOL. I, OXFORD MEDICAL PUBLICATIONS, EDITED BY NEIL McINTYRE., pp 905-911.
4. MEDLINE A. SHCAFFNER F. AND POPPER H., 1970, Ultrastructural features in galactosamine-induced hepatitis. EXP. MOL PAT. 12, 210-211.
5. OLIVEIRA J.R., ROSA J.L., AMBROSIO J., BARTRONS R., 1992, Effect of D-Galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-biphosphate, HEPATOLOGY, JUN 15(6), 1147-53.
6. LESCH R, REUTTER W., KEPPLER D. AND DECKER K. 1970, Liver restitution after acute galactosamine hepatitis: autoradiographic and biochemical studies in rats. EXP. MOL. PAT., 12, 58-69.
7. KEPLER D.O.R. PAUSCH J. AND DECKER K. 1974, Selective Uridine Triphosphate deficiencie induced by D-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors.

BIBLIOGRAFIA

8. McMILLAN J.M. AND JOLLOW D.J., 1992. Galactosamine hepatotoxicity: effect of galactosamine on glutathione resynthesis in rat primary hepatocyte cultures. *TOX. APPL. PHARM.*, 115, 234-240.
9. D'SOUZA-NB, KULKARNI-AB, BAXI-AJ, NADKARNI-GD, 1985, Enzymatic defence against oxygen toxicity in D-Galactosamine induced hepatitis in rats. *INDIAN GAST.*, 4, 87-88.
10. MALEY F., TARENTINO-A.L., MCGARRAHAN-J.F., DELGIACCO-R. 1967, The metabolism of D-Galactosamine and N-Acetyl-D-galactosamine in rat liver. *BIOCHEM J.*, 107,637-644.
11. DABEVA-MD. SHAFRITZ-DA. 1993, Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in D-galactosamine model of liver regeneration. *AM. J. PATHOL.*, 143(6) 1606-1620.
12. VAN-WAES-L. LIEBER-CS. 1977, Glutamate Dehydrogenase: a reliable marker of liver cell necrosis in the alcoholic. *BR. MED. J.*, 2 (6101), 1508-10.
13. STUMPF-DA. PARKS-JK. 1980, Urea Cycle regulation: I: Coupling of ornithine metabolism to mitochondrial oxidative phosphorylation. *NEUROLOGY* 30(2), 178-83.

BIBLIOGRAFIA

14. OHTANI-N. 1980, Experimental and clinical studies on enzymes of mitochondria in various liver diseases; with special reference to alcoholic liver disease. HOKKAIDO-IGAKU-ZASSHI, 55(1), 67-80.

15. SEKIYA-C. YASAKI-Y. NUMAZAKI-A. TAKAHASHI-A. et. al. 1979, Mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase and its clinical significance. HOKKAIDO-IGAKU-ZASSHI, 54(3), 245-51.

16. MIYAKE-S. 1979, The mechanism of the release of hepatic enzymes in various liver diseases. 1. Alterations in cytoplasmic and mitochondrial enzyme activities in serum. ACTA-MED-OKAYAMA. 33(4), 287-304.

17. NEIL McINTYRE AND SIDNEY ROSALKI. 1991, Biochemical Investigations in Management of Liver Disease. OXFORD TEXTBOOK OF CLINICAL HEPATOLOGY. VOL 1, OXFORD MEDICAL PUBLICATIONS, EDITED BY NEIL McINTYRE. pp 293-309.

18. LOWRY, 1978, Anal. Biochem 87,206-208.

19. ANNE VASSAULT, 1983, 2.2 LACTATE DEHYDROGENASE. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H.U. 3rd Edition, Verlag Chemie. pp 118-126.

20. ALISTAIR F. SMITH, 1983, 2.4 MALATE DEHYDROGENASE. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H.U. 3rd Edition, Verlag Chemie. pp 163-171.

BIBLIOGRAFIA

21. ELLEN Y FREIDRICH WERNER SCHMIDT, 1983, 3.3 GLUTAMATE DEHYDROGENASE. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H.U: 3rd Edition, Verlag Chemie. pp 216-227.
22. GIOVANNI CERIOTTI, 1983, 4.3 ORNITHINE CARBAMOYLTRANSFERASE. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H.U. 3rd Edition, Verlag Chemie. pp 319-325.
23. ROBERT REJ Y MOGENS HORDER, 1983, 6.6 ASPARTATE AMINOTRANSFERASE. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H.U. 3rd Edition, Verlag Chemie. pp 416-427.
24. MOGENS HORDER Y ROBERT REJ, 1983, 6.2 ALANINE AMINOTRANSFERASE. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H.U. 3rd Edition, Verlag Chemie. pp 444-449.
25. DIAZ MUÑOZ M., 1983, TESIS: Estudio sobre la acción de la adenosina en la hepatotoxicidad aguda producida por tetracloruro de carbon. UNAM.
26. ROSA JL. BARTRONS R. TAULER A. 1992. Gene expression on regulatory enzymes of glycolisis gluconeogenesis in regenerating rat liver. Biochem J. 287, 113-116.

BIBLIOGRAFIA

27. EGUCHI K, et al. 1992, Developmental changes of glutamate dehydrogenase activity in rat liver mitochondria and its enhancement by branched-chain amino acids. *Biol-Neonate*, 62, 83.

28. MICHAELOPOULOS, G. 1990, Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB* 4, 176-187.

29. RIVERA V. S., LOPEZ B. F., HERNANDEZ M. R. 1994. Liberación de enzimas intracelulares como posible señal para la iniciación del proceso de la regeneración hepática. XX CONGRESO NACIONAL DE LA SOC. MEX. BIOQ. ZACATECAS, 252.

30. LENHINGER, 1984. *Bioquímica*, Ed. Omega, España, pg 250-251.