

01672

1
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DEL NIVEL DE LOS LÍPIDOS DIETÉTICOS SOBRE LA
RELACIÓN GLUTATIÓN REDUCIDO-GLUTATIÓN OXIDADO(GSH/GSSG)
HEPÁTICO Y SANGUÍNEO EN LAS RATAS INTOXICADAS EN FORMA AGUDA
CON ETANOL

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS:

Alimentación y Nutrición Animal
PRESENTADA POR

ALMA EUGENIA ROCHA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

COMITÉ TUTORAL:

M EN C MARTHA ZENTELLA DE PIÑA

DR. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN

DR. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ

DR. MARIO CALCAGNO MONTANS

DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

DR. GUILLERMO TÉLLEZ ISAIÁS



MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Alma E. Rocha Hdez.
ALMA EUGENIA ROCHA HERNÁNDEZ

DEDICATORIA

**Cut not the wings of your dreams, because they are the heart beat of your soul.
A. B.**

Dedico este trabajo a:

Oralia y a Leopoldo:

a José Eduardo:

a Eloisa, Hernando, Rodrigo; María Magdalena y Polito:

a Martha, Olga y Leopoldo.

A mis alumnos, recordándoles que:

**"Si palos de ciego en la bioquímica no quieres dar...
por la nutrición siempre debes de empezar."**

A mis maestros.

A los trabajadores Universitarios.

A mis amigos.

Pero sobre todo a los que discrepan conmigo...

por motivarme para superarme.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

La parte experimental de este trabajo, titulado: "Efecto del nivel dietético sobre la relación glutatión reducido-glutatión oxidado (GSH/GSSG) hepático y sanguíneo en las ratas intoxicadas en forma aguda con etanol", fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El financiamiento para su desarrollo lo otorgó la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del donativo del proyecto IN-210094, y el Director del mismo fue el Dr. Francisco José Trigo Tavera. El Comité Tutoral estuvo formado por la M. en C. Martha Zentella de Piña, el Dr. Alberto Huberman Wajsman, el Dr. Héctor Sumano López, el Dr. Mario Calcagno Montans, el Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez y el Dr. Guillermo Téllez Isaías. Las determinaciones de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico las realizó la QFB Yolanda Saldaña de Delgadillo. La MVZ Ivonne Caballero Cruz realizó las determinaciones de etanol y acetaldehído mediante cromatografía de gases. El estudio histopatológico lo realizó el Dr. Andrés E. Castell R. La administración del donativo estuvo a cargo del Lic. Alejandro Roque. Los alumnos: PMVZ Enrique Moreno Hernández, Xochitl Navarrete, Norma Juárez, Carlos Grijalva, Biól Gabriela Fernández S., Alma Elena Ibarra, al señor Gabriel Moreno y al Dr. José María Farías apoyaron durante la realización de los experimentos.

Al personal del Bioterio General y al del Bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina gracias por su apoyo.

Al personal de la hemerobiblioteca J.J. Izquierdo de la Facultad de Medicina.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Donald J. Reed por su invitación a asistir a su laboratorio en la Universidad del estado de Oregon con el objeto de aprender a aplicar los métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución. Asimismo, agradecer la gran hospitalidad y valiosa amistad de su familia.

Agradezco a Corwin y Brigida Willard por su hospitalidad y su ayuda, a Marda Brown por su paciencia, a Jovana Pandelova por su amistad, a Debbie Mustachi por su ayuda.

A todos ellos,
GRACIAS.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora de esta tesis egresó de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

Siendo pasante de la carrera fue nombrada Ayudante de Profesor en el Departamento de Producción Animal: Aves y colaboró con la División de Estudios de Posgrado en la elaboración de los primeros textos del Sistema de Universidad Abierta para la F.M.V.Z. sobre manejo y medio ambiente de las aves. Becada por CONACYT y por el Banco de México realizó la Maestría en Animal Science, Major in Poultry Nutrition en la Universidad del Estado de Iowa. Durante seis años fue la Coordinadora del Area de Bioquímica en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. y la Coordinadora de la Investigación dentro del mismo Departamento. Fungió como Coordinadora de la Investigación en el Departamento de Producción Animal: Aves de la F.M.V.Z. Y actualmente es la Coordinadora de la materia de Alimentación de las Aves en la Especialidad del Sistema de Universidad Abierta de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M.

Dentro de las actividades de Doctorado instrumentó dos técnicas para HPLC, fue colaboradora de dos y participa en uno mas de los proyectos de investigación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

Ha dirigido 18 tesis de licenciatura y una de maestría.

La autora ha sido invitada por el Dr. Donald J. Reed de la Universidad del Estado de Oregon para participar en el proyecto de patogénesis de catarata utilizando ratones que son deficientes en la enzima gama glutamil transpeptidasa dentro del programa de post-doctorado.

RESUMEN

ROCHA HERNÁNDEZ ALMA EUGENIA. Efecto del nivel de los lípidos dietéticos sobre la relación glutatión reducido-glutatión oxidado (GSH/GSSG) hepático y sanguíneo en la rata intoxicada en forma aguda con etanol. (Bajo la dirección de Francisco Trigo Tavera, Martha Zentella de Piña, Alberto Huberman Wajsman, Héctor Sumano López, Mario Calcagno Montans, Andrés Eliú Castell Rodríguez y Guillermo Téllez Isaías).

Esta tesis versa sobre el control de las alteraciones celulares producidas durante la intoxicación con etanol mediante la inclusión de diferentes porcentajes de lípidos en la dieta, como una herramienta para el desarrollo de formas racionales de profilaxis y terapia. Los objetivos fueron investigar el efecto de incluir diferentes (5% ó 15%) porcentajes de aceite de maíz, aceite de cártamo, manteca de cerdo y sebo de res en la dieta e intoxicadas de manera aguda con etanol (63%), sobre la reserva de glutatión hepático y sanguíneo, así como comparar las morfologías del hígado en los distintos tratamientos. La tesis incluyó tres fases experimentales. La Fase I incluyó los siguientes grupos experimentales: 1) 5% de aceite de maíz en la dieta, alimentadas *ad lib.*; 2) 15% de aceite de maíz en la dieta, alimentadas *ad lib.*; 3) 15% de aceite de maíz en la dieta, en un programa de alimentación restringida. Las ratas fueron alimentadas con dietas semi-purificadas durante un mes, y un grupo fue intoxicado de manera aguda (5g/Kg) con etanol (63%) por vía oral, otro grupo recibió una dosis intermedia (2.5g/Kg) de etanol. Se obtuvieron muestras de sangre del plexo retro-orbital, y muestras de hígado para la determinación de GSHt, 8 h después de la intoxicación. Se tomaron muestras de sangre de los grupos 1 y 3, para la medición de acetaldehído y de etanol. Las correlaciones entre el consumo de etanol y el GSHt del hígado fueron $y=7.34-0.22X$, $R^2=-0.99$; $y=7.48-0.30X$, $R^2=-0.97$; y, $y=4.34-0.66X$, $R^2=-0.76$, en los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. El acetaldehído y el etanol en sangre del grupo 1 fueron significativamente menor y mayor, respectivamente que los del grupo 3. En la Fase II se aplicaron dos técnicas de HPLC para determinar glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), una mediante la adición Michell a una doble ligadura con los factores de respuesta: $y=1.07X+1.8$ y $y=0.83X+0.3$ para GSH y GSSG respectivamente; y la otra mediante la sustitución nucleofílica de un carbón halogenado con los factores de respuesta: $y=1.48X+1.45$ y $y=0.68X+2.35$ para GSH y GSSG respectivamente. Mediante el segundo método fue posible medir el GSSG con 17% más precisión. La fase III incluyó los siguientes grupos experimentales: a) 5% de aceite de maíz, b) 5% aceite de cártamo, c) 5% manteca de cerdo, d) 5% sebo de res, e) 15% manteca de cerdo (50%) + aceite de maíz (50%) en la dieta, f) 15% aceite de maíz, g) aceite de cártamo, h) 15% manteca de cerdo, i) 15% sebo de res, j) 15% aceite de maíz (50%) + manteca de cerdo (50%). Las ratas fueron alimentadas *ad lib.* con dietas semi-purificadas durante un mes y un grupo fue intoxicado de manera aguda con etanol (v.o). Se obtuvieron muestras de sangre de la aorta posterior, y de hígado para la determinación de GSHt, GSH y GSSG 8 h después de la intoxicación. Se midieron las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB) de algunos grupos. El GSSG sanguíneo aumento, y el GSH sanguíneo disminuyó por efecto de la etanolemia aguda. Fue mayor la elevación del GSHt en sangre de aorta posterior causada por el etanol en las ratas que consumieron aceite de maíz que en las que consumieron manteca de cerdo. Las SRATB aumentaron más en hígado en las ratas alimentadas con aceite de maíz por efecto de la

etanolemía aguda, que en las alimentadas con las otras fuentes de grasa probadas. El etanol provocó esteatosis multivacuolar perilobulillar en el grupo *a* y esteatosis multivacuolar centrolobulillar en el grupo *e*. El etanol no provocó esteatosis hepática en las ratas que consumieron 5% ó 15% de aceite de cártamo, manteca de cerdo o sebo de res en la dieta. Palabras clave: aceite de maíz, aceite de cártamo, manteca de cerdo, sebo de res, glutatión oxidado, glutatión reducido, glutatión total, sangre, hígado, ratas, esteatosis hepática, etanol, HPLC.

SUMMARY

ALMA EUGENIA ROCHA HERNANDEZ. The effect of dietary lipid level on acutely ethanol intoxicated rat liver and blood reduced glutathione-oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG).

This thesis deals with the control of the cellular alterations generated during the ethanol intoxication by means of different inclusions of dietary lipids, as a tool for the development of rational ways for therapy and prophylaxis. The objectives of this study were to investigate the effect of different (5% or 15%) percentages of several dietary lipids sources: corn oil, safflower oil, lard and tallow, and ethanol intoxication on the rat liver and blood total glutathione (GSHt) reserve, as well as to compare the liver morphology in the different treatments. The thesis included three experimental phases. Phase I experiments included the following experimental groups: 1) 5% corn oil in the diet, fed *ad lib.*; 2) 15% corn oil in the diet, fed *ad lib.*; 3) 15% corn oil in the diet, feeding restricted. Rats were fed the semi-purified diets during one month, and one group was acutely (5g/Kg) ethanol (63%) orally intoxicated; another group received an intermediate (2.5g/Kg) ethanol dose. Blood from the retro-orbital plexus, and liver samples were obtained for GSHt determination after 8 h of ethanol intoxication. Blood samples were obtained for acetaldehyde and ethanol determinations. The correlations between ethanol consumption and liver total glutathione were: $y=7.34-0.22X$; $R^2=-0.99$; $y=7.48-0.30X$, $R^2=-0.97$; $y=4.34-0.66X$, $R^2=-0.76$, in groups 1, 2 and 3, respectively. Group 1 acetaldehyde and ethanol were significantly lower and higher, respectively, than in group 3. In Phase II experiments two HPLC techniques were applied for reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) determination, one by a Michell addition to a double bond with response factors $y=1.07X+1.8$ and $y=0.83X+0.3$ for GSH and GSSG respectively, and the other technique by a nucleophilic substitution of an halogenated carbon with response factors $y=1.48X+1.45$ and $y=0.68X+2.35$ for GSH and GSSG respectively, the second one being 17% more accurate for GSSG determination. Phase III included the following experimental groups: a) 5% corn oil, b) 5% safflower oil; c) 5% lard; d) 5% tallow e) 5% corn oil (50) + lard (50%); f) 15% corn oil; g) 15% safflower oil; h) 15% lard i) 15% tallow and j) 15% corn oil (50%) + lard (50%). Rats were fed *ad lib.* semi-purified diets during one month. One group was acutely ethanol orally intoxicated. Blood from posterior aorta and liver samples were obtained for GSHt, GSH and GSSG determinations 8 h after intoxication. Also, liver tiobarbituric reactive substances (TBARS) of some groups were measured. Acute ethanol intoxication caused an increase of blood GSSG, an a decreased GSH of blood. The elevation of blood GSHt caused by ethanol, was bigger in corn oil than in lard fed rats. Liver TBARS of corn oil fed rats increased more than with the other dietary lipids sources tested. Ethanol caused multivacuolar perilobular steatosis in group a; while multivacuolar centrolobular steatosis was observed in group e. Ethanol caused no liver steatosis in 5% or 15% safflower oil, lard or tallow fed rats.

Key words: corn oil, safflower oil, lard, tallow, oxidized glutathione, reduced glutathione, total glutathione, blood, liver, rats, liver steatosis, ethanol, HPLC.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El uso de diferentes porcentajes de lípidos en la dieta.	2
1.2 El glutatión.	7
1.2.1 Antecedentes históricos.	8
1.3 Hipótesis.	11
1.4 Objetivos.	11
Capítulo 2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1 Animales y Alimento.	12
2.2 Diseño experimental.	13
2.3 Obtención de las muestras	14
2.4 Determinación de glutatión mediante espectrofotometría.	14
2.5 Determinación de glutatión oxidado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	15
2.6 Procesamiento de tejidos para histopatología	16
2.7 Análisis estadístico.	17
Capítulo 3. RESULTADOS	18
Capítulo 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	67
Capítulo 5. REFERENCIAS	74

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Efecto del porcentaje de aceite de girasol en la dieta sobre las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB) y el glutatión reducido (GSH) de ratas. 22
- Cuadro 2. Efecto del aceite de coco (10%) y del aceite de soya (10%) de la dieta sobre el glutatión reducido (GSH) y las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB) en el hígado de la rata. 23
- Cuadro 3. Composición lipídica del aceite de maíz, de las membranas celulares y del retículo endoplásmico del hígado de ratas que consumieron aceite de maíz. 24
- Cuadro 4. Dietas experimentales con diferentes contenidos de lípidos. 25
- Cuadro 5. Composición lipídica de diversas materias primas. 26
- Cuadro 6. Composición de las dietas. 27
- Cuadro 7. Modificación de la reserva de glutatión total (GSht) hepático por efecto de la intoxicación aguda con etanol de la rata que consume diferentes cantidades de aceite de maíz en la dieta. 28
- Cuadro 8. Modificación de la reserva de glutatión total (GSht) en la sangre por efecto de la intoxicación aguda con etanol (5g/Kg), de la rata que consume diferentes cantidades de aceite de maíz en la dieta. 29

	pág.
Cuadro 9. Porcentaje de elevación del glutatión total (GSht) en la sangre de la rata después de 8 horas de intoxicación aguda con etanol. Métodos: acoplado de ácido di-tio-nitrobenzoico (DTNB) y glutatión reductasa y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	30
Cuadro 10. Modificación de la relación GSH/GSSG por el tipo de grasa en la dieta y la intoxicación aguda con etanol.	31
Cuadro 11. Porcentaje de elevación del glutatión reducido (GSH) y del glutatión oxidado (GSSG) en la sangre de aorta posterior de la rata por efecto de la etanolemia aguda.	32
Cuadro 12. Modificación del glutatión total (GSht) en la sangre y en el hígado de ratas por el tipo de grasa en la dieta y la intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	33
Cuadro 13. Modificación de la morfología hepática de la rata por el tipo y la cantidad de grasa en la dieta después de 8 h de la intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	34
Cuadro 14. Consumo voluntario de alimento de las ratas machos con una ración normal (12% del total de calorías) o alta (35% del total de calorías) en lípidos.	35
Cuadro 15. Consumo de alimento diario de ratas machos bajo un programa de restricción alimenticia con una dieta alta (15%) en aceite de maíz.	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Correlación entre el consumo de etanol y el glutatión total (GSHt) en el hígado de la rata. 37
- Figura 2. Correlación entre el consumo de etanol y el glutatión total (GSHt) en la sangre de ratas que consumen 5% ó 15% de aceite de maíz en la dieta. 38
- Figura 3. Curvas estándares mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) de los aductos de glutatión reducido-N-etil-maleimida (GSH-NEM) y de glutatión oxidado (GSSG). 39
- Figura 4. Curva estándar de los aductos de glutatión reducido-N-etil-maleimida (GSH-NEM). 40
- Figura 5. Modificación del glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) en la sangre de la rata que consume aceite de maíz por la intoxicación aguda con etanol. 41
- Figura 6. Modificación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en sangre de rata que consume manteca de cerdo por la intoxicación aguda de etanol. 42
- Figura 7. Modificación de glutatión reducido hepático por la intoxicación aguda con etanol en la rata que consume manteca de cerdo. 43

	pág
Figura 8. Modificación del glutati3n total (GSHt) en la sangre de la rata por el tipo de grasa en la dieta.	44
Figura 9. Efecto del etanol sobre las sustancias reactivas con el 1cido tiobarbit3rico (SRATB) de la rata que consume 5% de aceite de ma3z.	45
Figura 10. Efecto del etanol sobre las sustancias reactivas con el 1cido tiobarbit3rico (SRATB) de la rata que consume 15% de aceite de ma3z.	46
Figura 11. Sustancias reactivas con el 1cido tiobarbit3rico (SRATB) en el h3gado de ratas alimentadas con 15% de aceite de ma3z en la dieta durante un mes y 8 horas despu3s de ser intoxicadas de manera aguda con etanol (5g/Kg).	47
Figura 12. El acetaldehido en sangre de rata alimentada con 15% de aceite de ma3z en un programa de restricci3n alimenticia aumenta 8 horas despu3s de la intoxicaci3n aguda con etanol (5g/Kg).	48
Figura 13. El etanol en sangre de rata alimentada con 15% de aceite de ma3z en un programa de restricci3n alimenticia disminuye 8 horas despu3s de la intoxicaci3n aguda con etanol (5g/Kg).	49
Figura 14. Fotomicrograf3a de h3gado de rata que consumi3 5% de aceite de ma3z en la dieta.	50

	pág
Figura 15. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de aceite de maíz en la dieta durante un mes y 8 horas después de intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	51
Figura 16. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de aceite de maíz durante un mes.	52
Figura 17. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de aceite de maíz en la dieta durante un mes y después de 8 horas de la intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	53
Figura 18. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de aceite de cártamo durante un mes.	54
Figura 19. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de aceite de cártamo en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	55
Figura 20. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de aceite de cártamo en la dieta durante un mes.	56
Figura 21. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de aceite de cártamo en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	57
Figura 22. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de sebo de res en la dieta durante un mes.	58

	pág
Figura 23. Fotomicrografía de rata que consumió 5% de sebo de res en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	59
Figura 24. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de sebo de res en la dieta durante un mes.	60
Figura 25. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de sebo de res en la dieta durante un mes y después de 8 horas de intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	61
Figura 26. Fotomicrografía de hígado rata que consumió 5% de manteca de cerdo.	62
Figura 27. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de manteca de cerdo durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	63
Figura 28. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de manteca de cerdo durante un mes.	64
Figura 29. Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de manteca de cerdo en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).	65
Figura 30. Automuestreador para cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	66

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

<i>ad lib.</i>	A libre acceso.
ADH	Alcohol Deshidrogenasa.
BSO	DL-Butionina -(S,R)-sulfoximina.
EDTA	N,N-1,2-Etanedilbis (N-(carboximetil) glicina).
E.M.	Energía metabolizada.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
GSHt	Glutación total.
GST	Glutación transferasa.
I.P.	Vía intraperitoneal.
V.O.	Vía orogástrica.
MEOS	Sistema de oxidación microsomal del etanol.
NEM	N-etil maleimida.
SRATB	Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico.
TAG	Total de ácidos grasos.
BPDS	Batofenantrolina.
FDNB	Fluorodinitrobenceno.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
KOH	Hidróxido de potasio.
ATB	Acido tiobarbitúrico.
p.h.	peso húmedo.
DTNB	Acido 5',5-di-tio-bis (2-nitrobenzoico).

INTRODUCCIÓN

El alcoholismo y la obesidad en el ser humano han llegado a ser problemas prioritarios en el campo de la salud pública y la nutrición. El empleo del etanol como droga psicotrópica está legalmente aceptado por la mayoría de los gobiernos y de las religiones en el mundo, a pesar de que llega a producir adicción. En 1986, la cirrosis hepática ocupó el noveno lugar entre las principales causas de mortalidad en la población mexicana (17).

Se ha observado que la ingestión de alcohol facilita, en su primera fase el desempeño de ciertas tareas: la mejora en la conducta o de la ejecución se debe, en realidad, a que ciertas inhibiciones corticales desaparecen (45).

El etanol es considerado como un neurotóxico (78). Su metabolismo ocurre principalmente en el hígado e inhibe la gluconeogénesis. Es producido continuamente por la fermentación microbiana en el intestino grueso de los mamíferos y es metabolizado en el hígado, de la misma manera que lo es el alcohol ingerido (37). El consumo agudo de etanol inhibe la síntesis y provoca un aumento en la eliminación del GSH (66,68).

El hepatocito tiene cinco vías principales para el metabolismo del etanol, cada una ubicada en diferentes compartimientos celulares. La principal es la vía de la Alcohol deshidrogenasa (ADH) del citosol o de las fracciones solubles de la célula. La segunda vía la constituye el Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) P450 IIE1 del retículo endoplasmático. La tercera vía la representa la catalasa de los peroxisomas. La cuarta y la quinta son no enzimáticas.

Aunque se ha descrito que el etanol es metabolizado principalmente mediante la vía de la ADH (34), todas las vías metabólicas de oxidación del etanol conducen a la producción de acetaldehído, el cual es transformado en acetato en la mitocondria (52).

El acetaldehído es el metabolito activo del etanol y puede afectar a muchos tejidos, especialmente al hígado (44). Promueve la lipoperoxidación o bien, se une covalentemente a las proteínas (51), al citocromo P450 (9), a macromoléculas hepáticas (42), a las proteínas circulantes como la albúmina (19) y a la hemoglobina (68). Además, el acetaldehído se

puede unir a las proteínas del citoesqueleto como la tubulina, fijándose a los grupos sulfhidrilo y a la lisina de la tubulina e impidiendo su polimerización (38).

En la enfermedad alcohólica del hígado hay disminución de los microtúbulos hepáticos (47). Una de las funciones de los microtúbulos hepáticos es promover el transporte intracelular de proteínas y su secreción. El individuo que ingiere alcohol crónicamente está expuesto a la acumulación de proteínas en el hígado, que corresponden a la mitad del aumento del peso que ocasiona el consumo crónico del etanol (8). La otra mitad del aumento del peso seco del hígado, corresponde a lípidos (44).

1.1 EL USO DE DIFERENTES PORCENTAJES DE LÍPIDOS EN LA DIETA

En la literatura se menciona que el efecto de utilizar alto porcentaje de aceite de maíz en la ración de ratas se reflejó en la baja del glutatión reducido y en el aumento de las Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB) en la mucosa del colon (37).

En ratones atímicos alimentados con dietas altas en grasa (23%) con tres diferentes cantidades de ácido linoleico (12%, 8% y 2%), el carcinoma y la metástasis fueron significativamente mayores en el ratón alimentado con 12% y 8% comparado con el que consumió 2% de ácido linoleico (59).

Las investigaciones realizadas para observar el efecto de la utilización de diferentes fuentes de lípidos (vegetales, animales, o ambas), han incluido:

ORIGEN VEGETAL

Aceite de maíz, aceite de soya, aceite de girasol.

ORIGEN ANIMAL

Aceite de pescado, aceite de hígado de bacalao, manteca de cerdo y sebo de res.

Además del ácido eicosapentanoico, también se ha estudiado el efecto de no incluir grasa en la ración, así como el de incluir colesterol.

También se han reportado los efectos de utilizar diferentes porcentajes de proteína y de carbohidratos en la ración.

Las variables sobre las que se ha estudiado los efectos de la utilización de diferentes fuentes y de diversos porcentajes de lípidos en la ración son:

Esteatosis (71), envejecimiento (20), aprendizaje, formación de tejido neoplásico (7), lipoperoxidación en miocardio (38) y en hígado, actividad del MEOS, actividad de la ADH, actividad de la GST, contenido de ácido oleico y de colesterol en las membranas sinápticas del cerebro, excreción de carnitina, triglicéridos hepáticos, producción de radicales libres, glutatión, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, catalasa en los glóbulos rojos y cambios ultraestructurales hepáticos.

No se ha investigado el efecto de incluir un alto porcentaje de lípidos en la ración de ratas, sobre el GSH del hígado. Tampoco se ha reportado el efecto de un alto porcentaje de lípidos en la intoxicación aguda por etanol, sobre el GSH y las SRATB del hígado de rata.

Se ha estudiado el efecto de la composición de la dieta sobre las alteraciones provocadas por la ingestión prolongada de etanol. Al mantener niveles de etanol altos en sangre, durante 15 a 85 días en ratas que consumían dietas líquidas bajas en grasa (4.9% de las calorías totales), el grado de esteatosis se correlacionó de manera positiva con la concentración de alcohol en sangre. Se confirmó que dichos niveles altos de alcohol en la sangre correlacionaron con la severidad de la patología hepática inducida por el etanol (56).

Por otra parte, al observar el efecto del consumo del etanol sobre el citocromo P450 IIE1 y al comparar el efecto de una dieta baja con otra normal en grasa, se comprobó que la grasa de la dieta, por sí sola, puede potenciar la inducción de la actividad del MEOS (42).

El efecto del consumo de una dieta baja en carbohidratos y alta en grasa fue un aumento en la excreción de carnitina urinaria. El mecanismo por medio del cual se aumenta la síntesis, se modifica la redistribución tisular de carnitina o ambos procesos, aún no ha sido determinado (13). Sin embargo, existe la hipótesis de que la L-carnitina puede atrapar el exceso de acetilos que derivan tanto del acetato libre formado a partir de la oxidación del etanol como de la CoA, la cual se acumula como resultado de la disminución del flujo del Ciclo de Krebs que induce el etanol (1).

Se ha estudiado tanto la cantidad como la calidad de los lípidos sobre las modificaciones que ocasiona en el metabolismo el consumo del etanol. Así, se observó que en ratas que consumen manteca de cerdo, el metabolismo del etanol mediante la ADH y el MEOS, es más acelerado que en las ratas que consumieron aceite de maíz o sebo de res. El consumo de etanol por las ratas que consumieron manteca de cerdo tuvo que ser más elevado para alcanzar los mismos niveles de etanol sanguíneo que en las ratas que consumieron aceite de maíz o sebo de res (51).

También se ha observado que una dieta alta en grasa y enriquecida con colesterol (0.5% de colesterol, 5% de aceite de cacahuete y 5% de manteca de cerdo), induce a un desequilibrio en las defensas antioxidantes del corazón, lo que resulta en un aumento de la lipoperoxidación del miocardio (38).

Se ha demostrado que los pequeños cambios en el patrón de ácidos grasos parecen ser capaces de modular las propiedades neurales hacia un neurotóxico como el etanol, ya que al administrar crónicamente el etanol a ratas durante dos generaciones y al comparar el efecto de administrar en la dieta diferentes fuentes de lípidos, como aceite de girasol (el cual está exento de ácidos grasos n-3), aceite de soya (rico en ácido linoleico), o de aceite de girasol más aceite de hígado de bacalao (este último es alto en contenido de ácidos grasos de cadena larga), se observó, al analizar las membranas plasmáticas del cerebro, que con el uso de aceite de soya, aumentaron el ácido oleico y el colesterol, sin ocurrir cambios en la fluidez, mientras que con el aceite de girasol, disminuyó la fluidez de la membrana. Cuando se añadió el aceite de girasol con aceite de hígado de bacalao, entonces los ácidos oleico y alfa-linoleico aumentaron, mientras que la fluidez del área apolar de las membranas plasmáticas sinápticas disminuyó (78).

Los ácidos grasos poliinsaturados del cerebro disminuyen progresivamente con la edad. El porcentaje de 20:4omega6 y de 33:6omega6 disminuyen con la edad y aumentan los 18:1omega9 y los 22:6omega3. La manteca de cerdo contiene microcantidades de 22:6omega3. Este último es retenido ávidamente en el cerebro (31). Se comprobó que las ratas que consumieron manteca de cerdo, oleinato o aceite de cártamo adicionado con alfa

tocopherol, aprendieron mejor (caja de Skinner) que las que consumieron aceite de cártamo (31).

El porcentaje y el tipo de lípidos de la dieta regulan la actividad de las proteínas de la membrana del hepatocito. Sin embargo, el porcentaje de proteína en la dieta también es importante en los cambios de la célula. Al alimentar a ratas con aceite de pescado (5%) o con una dieta sin grasa, se observó que la actividad de la glutatión transferasa (GST) fue mayor en la dieta con aceite de pescado y más baja con la dieta sin grasa. La dieta con 5% de aceite maíz condujo a una actividad intermedia de dicha enzima (75).

En otra investigación, al administrar a ratas en crecimiento, 5% ó 20% de aceite de maíz más 5%, ó 20% de soya, durante 4 semanas, la dieta alta en lípidos aumentó significativamente las SRATB hepáticos del grupo con soya. La concentración de GSH no mostró una correlación lineal con la dieta baja en proteína. Se reportó que al administrar colesterol (1 a 1.15%) en la dieta de las ratas, se aumentó la susceptibilidad del hígado a la lipoperoxidación, disminuyeron la glutatión peroxidasa y las deshidrogenasas de la vía de las pentosas (70).

Se sugiere que la deficiencia en proteína, asociada con el consumo alto en lípidos acelera el daño peroxidativo de los tejidos, al aumentar la formación de radicales libres del oxígeno (33). Además, el efecto de un nivel alto de aceite de pescado provocó la disminución significativa de los triglicéridos hepáticos (11).

El efecto de administrar una dieta baja en lípidos y adicionada con etanol durante dos semanas fue el de producir menos radicales libres que una dieta alta en lípidos (55).

Se ha observado que una dieta alta en grasa, aumentó el desarrollo de tejido neoplásico (7). Además, con consumo de 1000 mg al día por Kg de peso al día de ácido eicosapentanoico, el contenido de GSH y las actividades de glutatión S-transferasa (37, 38, 73), de glutatión peroxidasa (2, 11) y de glutatión reductasa, aumentaron significativamente, también aumentó 50% la actividad de la acil-CoA-oxidasa y de la catalasa hepática (18). Asimismo, al administrar dietas con 5% ó 15% de aceite de girasol durante 26 semanas a ratones de 6 semanas, se observó un aumento de la cantidad de SRATB en el hígado con la

dieta alta en lípidos (Cuadro 1) (2). Asimismo el consumo de 10% de aceite de soya en la dieta provocó un aumento significativo de las SRATB en el hígado de las ratas comparado con las que consumieron 10% de aceite de coco en la dieta (Cuadro 2) (35).

Al comparar la actividad de las enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y glucosa 6-fostato deshidrogenasa en el hígado y de la catalasa en glóbulos rojos de ratas alimentadas con 2%, 5%, 10%, 15% ó 20% de aceite de soya con 8% de lactoalbúmina o bien, con 5% ó 20% de aceite de soya con 20% de lactoalbúmina durante 8 semanas, se observó que las actividades de las enzimas antioxidantes disminuían mas drásticamente al aumentar el nivel de aceite de soya en los grupos alimentados con proteína baja, que en aquellos con una dieta normal en proteína. El aumento gradual del aceite de soya en la dieta baja en proteína, aumentó las concentraciones de SRATB tisulares (33). Por otro lado, se ha observado una correlación positiva entre la producción de SRATB y la degradación de ácidos grasos insaturados bajo las mismas condiciones experimentales (70).

Estudios recientes sugieren que el alcohol puede disminuir más que aumentar la susceptibilidad de las células a la lipoperoxidación. El alcoholismo crónico parece inducir un mecanismo específico desintoxicante que es activado por el alcohol (25).

Los cambios ultraestructurales provocados por el consumo de etanol se caracterizan por la proliferación del retículo endoplasmático liso hepático (42). En el Cuadro No. 3 se muestra la composición lipídica de las membranas celulares y del retículo endoplásmico de ratas que consumieron aceite de maíz (35, 75).

El consumo crónico de etanol se asocia con la proliferación de las membranas hepáticas como un sistema de adaptación para la oxidación del etanol, la cual es diferente a la catalasa y a la ADH, siendo el retículo endoplásmico el sitio donde se metaboliza el etanol (40). El sistema de oxidación del etanol MEOS depende del citocromo P-450 (69).

Hace falta demostrar si la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados aumenta después de la ingestión de etanol bajo diferentes proporciones de lípidos en la dieta.

1.2 EL GLUTATIÓN

En 1922 el inglés Frederick Gowland Hopkins aisla en diferentes tejidos una molécula dipeptídica (formada por cisteína y ácido glutámico, fácilmente oxidable) a la que llamó glutatión.

En 1926 Pice, Pinhey, Kendal *et al.*, dan a conocer su estructura formada por ácido glutámico, cisteína y glicina.

En 1953 Colowick *et al.*, estudiaron algunos aspectos sobre la síntesis, el metabolismo y las propiedades fisicoquímicas del glutatión, así como su relación con patologías fisiológicas en el ser vivo. En 1970 Tuckey y Kilgour realizaron estudios sobre los niveles de glutatión en los eritrocitos de carnero. En 1971 y 1973 Flone *et al.*, realizaron un modelo que intentó explicar el mecanismo de acción del glutatión y de las enzimas que se involucran en su síntesis, encontrando gran relación con el ciclo de la gama glutamil cisteína.

En 1976 Arias y Jakoby insisten en la relación del glutatión con el metabolismo de drogas y los compuestos endógenos en el hígado, tema que se retomó en 1978 por Sies y Wendel, y que hasta la fecha sigue siendo tema de estudio (36).

Atroschi en 1979, Moreno *et al.*, en 1987, Tuñón *et al.*, en 1989 determinaron los niveles de glutatión en diferentes tejidos, asociando algunos datos a diversos estados patológicos de tejidos y de especies animales.

Una molécula que juega un papel importante en el sistema antioxidante de la célula es el glutatión que es un tripéptido que contiene un grupo sulfhidrilo libre, el cual sirve como una sustancia amortiguadora que mantiene a los residuos de la cisteína de la hemoglobina y de otras proteínas de las células en su forma reducida. La relación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) es generalmente de 500 (40), sin embargo, existen reportes de que puede variar entre 5 y 20 (72). La forma reducida juega un papel importante en la desintoxicación celular reaccionando con peróxido de hidrógeno y con peróxidos orgánicos (76). Un 30% de glutatión por debajo del nivel normal, puede resultar en el metabolismo alterado por xenobióticos y aumenta la toxicidad de los metabolitos (56).

La biosíntesis del glutatión ocurre en muchos de los tejidos de los mamíferos, especialmente el hígado y el riñón. Un factor de control importante en la velocidad de síntesis de GSH, además del contenido de ATP, de L-glutamato y de glicina, es el nivel de L-cisteína en los tejidos (57).

Las funciones celulares del glutatión son la de proteger la integridad estructural y funcional de los ácidos grasos insaturados, modificando a los radicales libres y descomponiendo a los hidroperóxidos, además de que regula la actividad enzimática de la célula normal (5,30,79).

El glutatión evita la peroxidación lipídica de los ácidos grasos y forma compuestos conjugados con los epóxidos por medio de la glutatión S-epóxidotransferasa, glutatión S-alquiltransferasa y la glutatión S-transferasa. Dichos compuestos son excretados como tal o como ácido mercaptúrico a través de la orina o de la bilis (5,30).

Además, el glutatión interviene en la síntesis de hormonas esteroideas y prostaglandinas.

Entre las enzimas cuya actividad es modificada por la cantidad de disulfuros, o sea, activándose o inhibiéndose, están la fructosa 1,6 bisfosfatasa (50), la fosfofructocinasa (27) y la glucogeno sintetasa (21), las cuales catalizan reacciones opuestas y tienen papeles especiales en la gluconeogénesis y la glucólisis respectivamente.

La baja de GSH en el tejido hepático se puede deber a su oxidación, a su translocación al medio extrahepático, como glutatión libre y como conjugado de acetaldehído, derivado del etanol (73).

1.2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El consumo agudo de etanol, provoca la disminución drástica del glutatión hepático (71). Es necesario investigar si este efecto es el mismo, bajo diferentes porcentajes de lípidos en la dieta.

El acetaldehído proveniente del metabolismo del etanol, reacciona con el GSH en forma no enzimática (73).

Se ha observado que el total de glutatión-S transferasa hepática aumenta casi al doble en las ratas deficientes en selenio. Se ha sugerido que en animales deficientes en selenio existe la glutatión-S transferasa no dependiente del selenio como respuesta a niveles aumentados de sustratos hidropoxidados (16).

El consumo agudo de etanol provoca la disminución en la actividad de la GSH transferasa y la actividad de la GSH peroxidasa disminuye después del consumo crónico de etanol (63). La concentración más alta de etanol en la sangre se alcanza después de tres horas de ingerirlo y esto coincide con la baja de GSH hepático, produciéndose la máxima respuesta a las 6 horas (72).

Los radicales libres son moléculas independientes que poseen un electrón impar, lo que las hace moléculas inestables, capaces de asociarse con cualquier átomo, siendo por esto altamente tóxicos (5). Dichas moléculas se forman durante los procesos metabólicos de la célula, durante la descarga respiratoria, por la reducción incompleta de las moléculas y por la transformación de los xenobióticos (56). Los radicales libres se unen a los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana formando dienos conjugados, proceso que puede ser cuantificado por la formación de malondialdehído (64).

Para protegerse de un exceso de radicales libres, la célula cuenta con dos mecanismos complementarios: una batería de enzimas, entre las que se encuentran la citocromo oxidasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (79). Y con un grupo de atrapadores fisiológicos entre los que se encuentran, las vitaminas A, C y E, el ácido úrico, el GSH y la bilirrubina (30). El GSH participa de manera importante en la desintoxicación reaccionando con peróxido de hidrógeno y con peróxidos orgánicos (52), y es mantenido en su forma reducida por una flavoenzima (21).

Algunos de los factores que aumentan la formación de los radicales libres, son la ausencia de glucosa, lo cual también disminuye la concentración de GSH por lo que las células blanco quedan más expuestas al daño por dichos radicales (5).

Así, la falla en la transformación de GSSG en GSH en los glóbulos rojos de pacientes diabéticos se debe a la actividad reducida de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, cuya actividad se ha comprobado que está disminuida en los diabéticos (15).

Los compuestos implicados en el daño celular son principalmente compuestos derivados del oxígeno. Algunos de los más comunes son el ión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el singulete de oxígeno (14). Los radicales hidroxilo son considerablemente más reactivos y por lo tanto más tóxicos que el peróxido de hidrógeno o que el superóxido. El origen de los radicales hidroxilos, radica en la interacción del peróxido y del anión superóxido en la reacción de Haber-Weiss, la velocidad de la cual es aumentada en presencia de iones de cobre o de hierro (56).

El sitio activo de la glutatión peroxidasa contiene un residuo del poco común aminoácido selenocisteína, en el que el átomo de azufre de la cisteína es reemplazado por un átomo de selenio. Presumiblemente el grupo -SeH de este residuo tiene propiedades ventajosas en el mecanismo de ésta y de otras enzimas que contienen selenio (39).

Las especies activas del oxígeno conducen a la oxidación de los tioles celulares y éstos inhiben a las translocasas del Ca^{2+} , conduciendo a la elevación sostenida del Ca^{2+} y a la activación de procesos catabólicos dependientes de Ca^{2+} , con la pérdida de la integridad de la membrana, la degradación de fosfolípidos, la degradación del DNA, la degradación proteínica, la destrucción del citoesqueleto y la muerte celular (54).

1.3 OBJETIVOS

1. Conocer si los cambios cuantitativos de los lípidos de la dieta modifican la poza de glutatión en el hígado y en la sangre.
2. Investigar el objetivo 1 después de ocho horas de intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).
3. Conocer si la morfología del hígado es modificada por el consumo de diversas fuentes de lípidos y por la intoxicación aguda con etanol (5g/Kg).

1.4 HIPÓTESIS

1. La relación de glutatión reducido/glutatión oxidado en el hígado y en la sangre, es modificada por la ingestión de diferentes proporciones de lípidos en la dieta.
2. La proporción de aceite de maíz, de aceite de cártamo, de manteca de cerdo y de sebo de res en la dieta modifica el efecto de la intoxicación aguda de etanol sobre el glutatión.
3. La morfología hepática de la rata intoxicada con etanol esta determinada por el tipo de lípidos que consume en la dieta.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 ANIMALES Y ALIMENTO

Se utilizaron ratas Wistar machos de aproximadamente 120 g de peso corporal que fueron destetadas a los 28 días de edad. Estos animales no habían recibido otro alimento que la leche materna. Las dietas experimentales (Cuadro 4) fueron isoproteínicas e isocalóricas y diferentes en el contenido de lípidos, los cuales consistieron en aceite de maíz, aceite de cártamo, sebo de res o manteca de cerdo (Cuadro 5). A partir de cada fuente de lípidos, se preparó una dieta con 5% y una dieta con 15% de lípidos. Una de las dietas contenían 5% de cada una de las fuentes de lípidos (dieta normal en lípidos) y la otra contenía 15% de la fuente de lípidos (dieta alta en lípidos). La dieta normal en lípidos fue formulada para cubrir las necesidades que indica el NRC (53). Las dietas fueron administradas en forma de comprimidos cilíndricos que se prepararon en el Departamento de Nutrición del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias en el Km 14.5 de la carretera México-Toluca. Las dietas fueron almacenadas a 4° C, y diariamente fue renovado el alimento administrado a las ratas. En todos los grupos, excepto en uno en el que se proporcionó alimento con aceite de maíz en un programa de restricción alimenticia, las ratas fueron alimentadas a libertad.

El programa de restricción alimenticia de las ratas consistió en proporcionar la misma cantidad de alimento a las ratas con 15% y con 5% de lípidos en la dieta. Ya que las ratas con 15% de lípidos en la dieta cuando se dejan *ad libitum*, consumen alrededor de 50% más de alimento.

Cada rata fue instalada en una jaula individual, con el objeto de llevar un control del consumo de alimento. Las ratas fueron pesadas al inicio y al final de cada experimento.

En la dieta experimental normal en contenido de lípidos, la proteína (caseína) constituyó el 30.74% de las calorías, los carbohidratos fueron a partir de almidón y azúcar refinada y constituyeron el 57.80%, y los lípidos constituyeron el 12% del total de calorías.

En la dieta experimental que fue alta en contenido de lípidos, la proteína (caseína) constituyó el 30.74% de las calorías, los carbohidratos el 34% y los lípidos el 35.21%

(Cuadro 6). Las condiciones ambientales fueron las mismas, antes y después de comenzar cada experimento. El fotoperíodo en el que fueron mantenidas las ratas, fue de 12 horas de luz y 12 de obscuridad. Los animales fueron sacrificados a las 9:00 a.m.

El trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, con el apoyo de los proyectos DGAPA IN208992 e IN210094.

2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Esta tesis se divide en tres fases:

Fase I: se alimentaron en un programa de alimentación restringida y en un programa de alimentación a libre acceso lotes de ocho ratas de destete tardío, a cuatro de las cuales se les administró alimento con 5% y a cuatro alimento con 15% de aceite de maíz durante 28 días. Al final de los 28 días, fueron sometidas a ayuno de 24 horas y luego, a dos de cada cuatro ratas se les intoxicó con 5g/kg de etanol vía O.G. Otro grupo recibió una dosis de 2.5g/kg y también hubo un grupo control al cual se le administró glucosa en sustitución de las calorías del etanol. Después de 8 horas de la intoxicación se les anestesió levemente (alrededor de 45 segundos) con éter para luego obtener una muestra de sangre del plexo retro-orbital y una muestra del lóbulo derecho del hígado.

Fase II: se aplicó el métodos de Reed *et al.* (57) para la determinación mediante HPLC de GSH y GSSG en hígado y el método de Asensi *et al.* (6) en el cual se utiliza N-etilmaleimida para evitar la oxidación de GSH.

Fase III: se alimentaron lotes de ocho ratas de destete tardío, a cuatro de las cuales se les suministró alimento con 5% de aceite de maíz, aceite de cártamo, manteca de cerdo o sebo de res y a las otras cuatro ratas se les proporcionó alimento con 15% de dichas fuentes de lípidos. Al final de los 28 días a dos de cada cuatro ratas se les intoxicó con 5g/Kg de etanol (63%) vía O.G. Después de 8 horas de la intoxicación las ratas fueron anestesiadas levemente con éter, se incidió la piel a nivel abdominal para diseccionar la arteria aorta posterior a nivel de las vértebras lumbares, obteniéndose aproximadamente 5 ml de sangre y posteriormente una muestra del lóbulo derecho del hígado.

A un ml de la muestra de sangre se le añadió 1 ml de ácido perclórico (12%) para la determinación de glutatión total (GSHt), a otro ml de la muestra de sangre se le añadió 1 ml de ácido perclórico+NEM para la determinación de glutatión oxidado (3). Los 8 ml de sangre restante fueron centrifugados a 3,000g durante 4 minutos para la separación del plasma. El plasma se mezcló 1:1 con ácido perclórico+ 1 mM BPDS + 40 mM NEM y se derivatizó según el método de Asensi *et al.* (6) para la determinación de glutatión oxidado por HPLC.

2.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de sangre y de hígado de las ratas, ocho horas después de la intoxicación aguda con etanol.

De las ratas utilizadas en los experimentos de la Fase I, la muestra de sangre se obtuvo del plexo retro-orbital mediante capilar heparinizado.

Las muestras de sangre de las ratas usadas en los experimentos de la Fase III se obtuvieron a partir de la arteria aorta posterior mediante jeringa heparinizada. En todas las muestras de sangre se determinó GSHt y GSSG (3) mediante espectrofotometría. En las muestras de plasma de sangre de aorta posterior se determinó glutatión oxidado mediante HPLC según Asensi *et al.* (6).

Las muestras de hígado fueron utilizadas para determinar igualmente GSHt y GSSG mediante espectrofotometría (3) y GSSG mediante HPLC según Asensi *et al.* (6).

2.4 DETERMINACIÓN DE GLUTATION MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRIA

Para realizar la determinación de GSHt según el método I de Akerboom *et al.* (3), se empleó una alícuota de 10µl de la muestra, siguiendo la reducción de DTNB por espectrofotometría a 412 nm durante 5 minutos.

Para ambos, el GSHt y el GSSG, los cálculos se basaron en las curvas estándar que fueron preparadas de manera individual para cada experimento. El valor de GSH fue calculado por la diferencia de GSHt menos GSSG.

Para realizar las determinaciones de GSSG, se emplearon 500 µl de la muestra, siguiendo la desaparición de NADPH por espectrofotometría a 340 nm, según el método IV de Akerboom *et al.* (3).

2.5 DETERMINACIÓN DE GSSG MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).

La determinación de GSSG mediante la técnica descrita por Asensi *et al.* (6), tiene la ventaja de evitar la oxidación del GSH, ya que utiliza N-etilmaleimida (NEM), como atrapador de tioles, diluido en el ácido perclórico con el que se precipita la proteína de la sangre y se homogeneiza el hígado. Mediante este método, la oxidación del GSH en sangre es de sólo 0.13±0.28% vs. 24±6 por el método de Reed *et al.* (57). El cual utiliza la carboximetilación como medio de evitar la oxidación del GSH en una etapa posterior de la derivatización de la muestra, permitiendo por el tiempo transcurrido, la oxidación mayor del GSH.

El método de Asensi *et al.* (6) consiste en mezclar 1:1 12% ácido perclórico + 2mM BPDS + 40mM NEM con la muestra de sangre o de plasma. Para homogeneizar la muestra (aprox. 250 mg peso húmedo) de hígado se utiliza 1:8 partes de 6% de ácido perclórico + 1mM BPDS + 40mM NEM. Posteriormente se centrifuga la muestra a 15,000 g durante 5 minutos. Se obtienen aproximadamente 2ml de sobrenadante, se añaden 200 ml de 1mM gamma Glu-Glu, y 40 ml de 1mM cresol púrpura (indicador de pH). Se mezcla y neutraliza con 2M KOH + 0.3 M MOPS. Se centrifuga a 15,000 g durante 5 minutos.

Añadir 4 ml de 1% FDNB (diluido en etanol). Incubar durante toda la noche. Se evapora el etanol, y luego reconstituir con 4 ml de 80% metanol. Se analizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, marca Beckman System Gold con un módulo

con detector programable System Gold 166, un módulo de solventes programable System Gold 126. Se usó una columna LC3-aminopropil y un autoanalizador (Figura 30).

El NEM fué descrito en 1949 por Friedman. Su potente actividad antimetabólica se correlaciona con su habilidad de reaccionar con grupos sulfhidrilo. El ácido maleico, la maleimida y la citraconimida son antimetabólicos, pero no reaccionan con los grupos sulfhidrilo.

Abajo de pH 7, el NEM es un reactivo altamente específico para grupos sulfhidrilo de proteínas. A pH de 7, su velocidad de reacción con tioles simples es aproximadamente 1000 veces mayor que con compuestos amino simples. A pH mayores de 7, la reacción de NEM con grupos amino aumenta. Para proteínas sin grupos azufrados, NEM puede utilizarse como un reactivo específico de grupos amino (Figura 12).

DETERMINACION DE SUSTANCIAS REACTIVAS CON EL ACIDO TIOBARBITURICO (SRATB)

Las SRATB fueron determinadas siguiendo el método de Zentella *et al.* (77) en el homogenado de hígado, haciendo pasar éste a través de un filtro de gasa; después, una alícuota de 0.2 ml fue incubada con 1.0 ml de amortiguador de fosfato (pH 7.0) 0.15 M durante 30 min. a 37° C, luego se añadieron: 1.5 ml de ácido acético (20%) (pH 2.5) y 1.5 ml ATB (0.8%). La mezcla se colocó en agua en ebullición durante 45 min., los tubos fueron colocados en hielo y ya fríos se añadió 1.5 ml de KCl (2%) y 5 ml de butanolpiridina (15:1) se mezclaron vigorosamente y se midió la absorbencia a 532 nm.

2.6 PROCESAMIENTO DE TEJIDOS PARA HISTOPATOLOGÍA

A las ratas se les anestesió levemente con éter para tomar muestras del lóbulo izquierdo del hígado de aproximadamente 0.5 centímetro cúbicos, que se fijaron en etanol al 100% o en el fijador de Carnoi durante 3 horas. Las muestras fueron procesadas para

incluirlas en parafina y se realizaron cortes de 7 microm que fueron teñidos con Hematoxilona-Eosina o con el ácido peryódico de Schiff , la morfología hepática fue analizada y descrita en cada caso.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de este experimento, fueron evaluados por medio del análisis de varianza (65), y se hicieron correlaciones entre el consumo de etanol y el GSIIt en la sangre y en el hígado.

3. RESULTADOS

Los experimentos realizados en la Fase I de este trabajo arrojaron los siguientes resultados:

Se muestra el efecto del consumo de 15% de aceite de maíz en un programa de alimentación restringida ($y= 4.34-0.166x$, $R^2= -0.76$) sobre el glutatión total (GSht) hepático vs el consumo de 15% de aceite de maíz ($y= 7.34-0.22x$, $R^2= -0.99$) ó de 5% de aceite de maíz con alimentación *ad lib.* ($y= 7.48- 0.30x$, $R^2= -0.97$) en la rata después de 8 horas de intoxicación aguda con etanol (Figura 1).

Al correlacionar la dosis de etanol con los μ moles de GSht/ml de sangre se observó una correlación positiva en las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz en un programa con restricción alimenticia ($y= 0.78+0.55x$, $R^2= 0.73$), en las ratas que consumieron 5% de aceite de maíz en un programa *ad lib.* ($y= 0.786+0.132x$, $R^2=0.873$) 15% aceite de maíz alimentadas *ad lib.* ($y= 0.853+ 0.101x$, $R^2= 0.959$) (Figura 2).

En el Cuadro No. 7 se muestra el efecto del consumo del etanol sobre el GSht (μ moles/g p.h.) hepático de las ratas que consumieron 5% ó 15% de aceite de maíz en un programa de alimentación *ad lib.*, y el de las que consumieron 15% de aceite de maíz en un programa de restricción alimenticia. Se observó que hubo una disminución significativa ($P<0.05$) del GSht hepático por efecto de la etanolemia aguda en las ratas que consumieron 5% de aceite de maíz (7.36 ± 0.82 sin etanol y 6.26 ± 1.42 con etanol); en las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz el GSht hepático disminuyó significativamente por efecto de la etanolemia aguda (7.40 ± 1.02 sin etanol y 5.78 ± 0.76 con etanol). Sin embargo, en las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz en un programa de restricción alimenticia la intoxicación aguda con etanol no provocó una disminución en el GSht hepático (4.44 ± 1.50 sin etanol y 4.22 ± 1.72 con etanol).

Se observó una diferencia significativa ($P<0.05$) entre el GSht sanguíneo de las ratas control que consumieron 5% ó 15% de aceite de maíz vs las que consumieron 15% en un programa de alimentación restringida (0.83 ± 0.23 , 0.89 ± 0.12 y 1.64 ± 0.60 respectivamente); y una diferencia altamente significativa ($P< 0.01$) entre el GSht sanguíneo de las ratas que

consumieron 5% ó 15% de aceite *ad lib.* vs las que consumieron 15% de aceite en un programa de restricción alimenticia (1.15 ± 1.34 , 1.05 ± 0.24 y 1.40 ± 0.37 , respectivamente) (Cuadro No. 8).

En los experimentos realizados en la Fase II de este trabajo se observaron los siguientes resultados:

Se aplicaron dos métodos de HPLC para medir GSSG, el de Asensi *et al.* (6) ($y=0.68x+2.35$, la correlación de nmoles de GSSG/ml vs área del pico) detectó el GSSG con 17% más precisión que el de Fariss *et al.* (22) (Figura 3). Mediante el método de Asensi se obtienen tres aductos de GSH-NEM que aparecen a los tiempos 5.67, 13.05 y 14.30 minutos (Figura 4). Y se recomienda correr un estándar cada vez que se corran muestras con el objeto de detectar los tiempos de elusión de estos compuestos.

Los experimentos realizados en la fase III de este trabajo muestran los siguientes resultados:

Se observó un aumento del GSHt en la sangre de aorta posterior después de la intoxicación aguda con etanol en las ratas que consumieron 5% aceite de maíz (138% y 108% por el método acoplado de DTNB y glutatión reductasa y mediante HPLC), y en las que consumieron 15% alimentadas *ad lib.* (118% y 214% medidos por el método de DTNB y glutatión reductasa y HPLC, respectivamente) (Cuadro No. 9)

La disminución de la relación GSH/GSSG en la sangre por efecto del etanol es un reflejo del aumento del GSSG y la disminución del GSH (Figura 5) y es independiente de la fuente de grasa consumida: 5% de aceite de maíz (13.3 sin etanol s.e vs 0.9 con etanol c.e.), 15% de aceite de maíz (1.3 s.e. vs 0.1 c.e.), 5% de manteca de cerdo (39.4% s.e. vs 13.8 c.e.), ó 15% manteca de cerdo (26.7 s.e. vs 3.0 c.e.) (Cuadro No. 10; figuras 5, 6 y 7).

La intoxicación con etanol provocó un descenso del 56% (0.893 μ moles de GSH/ml s.e. y 0.504 μ moles de GSH/ml c.e.) en el GSH de la sangre de las ratas que consumieron 5% de aceite de maíz, y un descenso del 32% (0.454 μ moles de GSH/ml s.e. y 0.146 μ moles

de GSH/ml c.e.) en la rata que consumió 15% de aceite de maíz. El GSSG aumentó en un 788% en la rata que consumió 5% de aceite de maíz después de ocho horas de intoxicación con etanol (0.067 μ moles de GSSG/ml s.e. y 1.573 μ moles de GSSG/ml c.e.); en la rata que consumió 15% de aceite de maíz aumentó 454% después de la intoxicación con etanol (0.346 μ moles de GSSG/ml s.e. y 1.573 μ moles de GSSG/ml c.e.) (Cuadro 12).

El GSHt en la sangre (μ moles/ml) no se modificó por efecto de la etanolemia aguda en las ratas que consumieron 5% de aceite de maíz (0.960 \pm 0.175 sin etanol s.e. vs 1.178 \pm 0.396 con etanol c.e.), 15% de aceite de maíz (0.965 \pm 0.153 s.e. vs 1.291 \pm 0.265 c.e.), 5% de manteca de cerdo (1.615 s.e. vs 0.68 \pm 0.42 c.e.), 15% de manteca de cerdo (1.677 s.e vs 1.740 c.e), 5% de una mezcla al 50% de aceite de maíz mas manteca de cerdo (0.729 \pm 0.126 s.e. vs 0.934 \pm 0.393 c.e.), ó 15% de una mezcla al 50% de aceite de maíz más manteca de cerdo (0.797 \pm 0.300 s.e. vs 1.061 \pm 0.139 c.e.) (Cuadro No. 11 y Figura 8).

Se midieron las SRATB (nmoles/g de proteína en hígado) en las ratas que consumieron 5% aceite de maíz encontrando una elevación de éstas por efecto de la etanolemia aguda (control 0.249; dosis única de 2.5 g/Kg de peso, 0.321y 5g/Kg 0.377). (Figura 9); de igual manera en las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz *ad lib.* las SRATB se elevaron por efecto de la etanolemia aguda (control 0.6, 2.5 g/Kg peso 0.77 y 5 g/Kg 1.14) (Figura 10).

En las ratas alimentadas con aceite de maíz en un programa con restricción alimenticia también se observó el mismo efecto del etanol sobre las SRATB (control 0.576 sin etanol s.e., 0.659 con etanol 5g/Kg) (Figura 11).

El acetaldehído (μ moles/ml de sangre) aumentó de manera más evidente en las ratas alimentadas con 15% de aceite de maíz con restricción alimenticia (0.120) comparadas con las que consumieron 5% de aceite de maíz alimentadas *ad lib* (0.139) después de 8 horas de la intoxicación (Figura 12).

El etanol (μ moles/ml) en la sangre de las ratas alimentadas con 5% de aceite de maíz (41.56) se mantuvo por encima del etanol sanguíneo de las ratas alimentadas con 15% de aceite de maíz con restricción alimenticia (0.141) (Figura 13).

HISTOPATOLOGÍA

Los resultados histopatológicos se resumen en el cuadro No. 13. El consumo de la dieta con 5% de aceite de maíz durante un mes reveló esteatosis univacuolar periportal (Figura 14). La intoxicación aguda con etanol provocó esteatosis multivacuolar periportal de las ratas que consumieron 5% de aceite de maíz en un programa de alimentación *ad lib.* (Figura 15).

El consumo de la dieta con 15% de aceite de maíz reveló esteatosis univacuolar centrolobulillar (Figura 16). La intoxicación aguda con etanol provocó esteatosis multivacuolar centrolobulillar de las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz en un programa de alimentación *ad lib.* (Figura 17).

Los hígados de las ratas que consumieron 5% de aceite de cártamo fueron normales (Figura 18). La intoxicación aguda con etanol de ratas que consumieron 5% de aceite de cártamo provocó esteatosis univacuolar periportal (Figura 19).

El consumo de 15% de aceite de cártamo provocó esteatosis univacuolar difusa leve (Figura 20). La intoxicación aguda con etanol provocó esteatosis univacuolar periportal en las ratas que consumieron 15% de aceite de cártamo (Figura 21).

El consumo de las dietas con 5% de las fuentes de grasa animal: manteca de cerdo o sebo de res, en un programa de alimentación *ad lib.*, reveló esteatosis univacuolar periportal moderada (Figuras 22 y 26), la intoxicación aguda con etanol no modificó la morfología hepática de las ratas que consumieron manteca de cerdo y sebo de res (Figuras 23 y 25).

El consumo de las dietas con 15% de las fuentes de grasa animal: manteca de cerdo o sebo de res, en un programa de alimentación *ad lib.* reveló esteatosis univacuolar heterogénea moderada (Figuras 24 y 28); la intoxicación aguda con etanol no modificó la morfología hepática de las ratas que consumieron 15% de manteca de cerdo y sebo de res (Figuras 25 y 29).

Cuadro No. 1

Efecto del porcentaje de aceite de girasol en la dieta sobre las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB) y el glutatión reducido (GSH) en el hígado de ratas.

	SRATB	GSH
ACEITE DE GIRASOL	(nmol/g de hígado)	(μ mol/g de hígado)
5%	23.6	27.6
15%	45.5	46.1

Fuente: Ahotupa *et al.*: Dietary fat- and phenobarbital- induced alterations in hepatic antioxidant functions in mice. *Carcinogenesis*. 14(6):1225-1228 (1993).

Cuadro No. 2

Efecto del aceite de coco (10%) y del aceite de soya (10%) de la dieta sobre el glutatión reducido (GSH) y las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB) hepático de la rata.

Fuente de lipidos	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	SRATB (nmol/mg)
Aceite de coco	12.3 ± 2.3	0.68 ± 0.1
Aceite de soya	10.5 ± 1.9	4.43 ± 0.3

Fuente: Kautiainen A. *et al.*: In vivo hemoglobin dosimetry of malonaldehyde and ethene in mice after induction of lipid peroxidation. Effects of membrane lipid fatty acid composition. *Carcinogenesis*. 112 (6):1097-1102 (1991).

Cuadro No. 3

Composición lipídica del aceite de maíz, de las membranas celulares y del retículo endoplásmico del hígado de ratas que consumieron aceite de maíz.

	aceite de maíz ^a	membrana hepática ^b	retículo endoplásmico ^c
Acido graso	(%)	(mol% ± DS)	(% ± DS)
C12:0		0.2 ± 0.1	
C14:0	12	1.1 ± 0.2	nd*
C16:0	2	19.3 ± 1.5	20.16 ± 0.42
C:16:1	27	5.6 ± 0.6	0.70 ± 0.05
C18:0		12.7 ± 0.8	28.93 ± 0.27
C18:1		22.0 ± 1.9 (n-9)	4.10 ± 0.15
C18:2 (n-6)	57	12.6 ± 0.4	9.75 ± 0.31
C18:3 (n-3)	1	0.3 ± 0.1	
C20:3 (n-9)		1.6 ± 0.2	
C20:3 (n-6)		2.2 ± 0.2	nd*
C20:4 (n-6)		14.4 ± 1.0	27.18 ± 0.56
C20:5 (n-6)		0.4 ± 0.1	
C22:4 (n-6)		0.2 ± 0.1	
C22:5 (n-3)		1.2 ± 0.2	
C22:6 (n-3)		0.2 ± 0.1	nd*
C18-22 (n-6)		6.1 ± 0.4	2.61 ± 0.10
C18-22 (n-3)		30.6 ± 1.6	
C18-22 (n-9)		7.1 ± 0.6	

nd* no detectable

^a Fuente: Yeshajahu Pomeranz. *Functional Properties of Food Components*, Academic Press Inc. 1985.

^b Fuente: Kautiainen A. *et al.*: In vivo hemoglobin dosimetry of malonaldehyde and ethene in mice after induction of lipid peroxidation. Effects of membrane lipid fatty acid composition. *Carcinogenesis*. 112(6):1097-1102 (1991).

^c Fuente: Yang, E.K, *et al.*: Dietary lipids coinduce xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Biochimica et Biophysica*, 1168:52-58 (1993).

Cuadro No. 4

Dietas experimentales con diferentes contenidos de lípidos.

Ingredientes	Inclusión (%)	
	Baja en grasa	Alta en grasa
Caseína	25.00	25.00
Almidón	13.00	13.00
Azúcar glass	41.75	19.75
Salvado	4.00	4.00
Lípidos*	5.00	15.00
DL-metionina	0.15	0.15
Minerales ^a	0.05	0.05
Vitaminas ^b	0.50	0.50
Colina	1.50	1.50
Carbonato de Ca	0.27	0.27
Ortosfostato	2.00	2.00
NaCl	0.30	0.30
Vehículo	6.45	18.55
Total	100.00	100.00

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

^a Minerales (%): CaCO₃, 29.29; Ca₂HPO₄.2H₂O, 0.43; KH₂PO₄, 34.31; NaCl, 25.06; MgSO₄.7H₂O, 9.98; Fe (C₆H₅O₇) 6H₂O; CuSO₄, 0.156; MnSO₄ H₂O, 0.121; ZnCl₂, 0.020; KI, 0.0005;

^b Vitaminas (mg/kg dieta): Vit. A concentrada (500,000 UI/g), 18; Vit D concentrada (Colecalciferol 400,000 UI/g), 2.5; alfa tocoferol, 50; ácido ascórbico, 450; inositol, 50; Cloruro de colina, 750 (adicionado como solución al 50); menadiona, 22.5

Análisis calculado		
Proteína cruda (%)	24	24
E.M. (kcal/kg)	3300	3300
Calcio (%)	0.5	0.5
Total aminoácidos azufrados	1.16	1.16
Lisina disponible (%)	1.52	1.52

Cuadro No. 5

Composición lipídica de diversas materias primas

	aceite de maíz		aceite de cártamo		sebo de res		manteca de cerdo	
	a	c	b	c	b	c	b	c
C14:0	12		-		2		1	
C16:0	2	12.4	6.4	2-10	35	35.4	23	28.7
C 16:1	27	0.1		<0.5		2.7		2.1
C18:0	-	1.9	3.1	1-10	16	36.5	9	19.6
C18:1	-	26.9	13.8	7-42	44	24.5	46	40.9
C18:2	57	57	-	55-81	2	0.9	14	8.7
C18:3	1	0.7	72.9	<1.0	0.4	-	1.0	-

^a Yeshajahu Pomeranz. Functional Properties of Food Components, Academic Press Inc. 1985.

^b Yang, E.K., *et al.*: Dietary lipids coinduce xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1168:52-58 (1993).

^c Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Poultry. Ninth Edition, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1994.

Cuadro No. 6
Composición de las dietas

	Aporte de calorías (% de la dieta)	
	DIETA 1	DIETA 2
Aceite de maíz (%)	5	15
Nutrientes:		
Proteínas	30.74	30.74
Carbohidratos	57.80	34.00
Lípidos	12.00	35.21

Cuadro No. 7

Modificación de la reserva de glutatión total (GSHt) hepático ($\mu\text{mol/g p.h.}$) por efecto de la intoxicación aguda con etanol en la rata que consume diferentes cantidades de aceite de maíz en la dieta.

Programa de alimentación	Porcentaje de aceite de maíz en la dieta	Consumo promedio de aceite de maíz/rata/día (g)	GSHt	
			sin etanol	con etanol (5g/Kg)
<i>ad libitum</i>	5%	0.6	7.36 \pm 0.82 ^a (8)	6.26 \pm 1.42 ^b (8)
<i>ad libitum</i>	15%	3.0	7.40 \pm 1.02 ^a (8)	5.78 \pm 0.76 ^b (8)
restringida	15%	1.5	4.44 \pm 1.50 (8)	4.22 \pm 1.72 (8)

Número en renglones con literales distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Cuadro No. 8

Modificación de la reserva del glutatión total (GSHt) en la sangre ($\mu\text{mol/ml.}$) por efecto de la intoxicación aguda (5g/Kg) en la rata que consume diferentes cantidades de aceite de maíz en la dieta.

Programa de alimentación	Porcentaje de aceite de maíz en la dieta	Consumo promedio de aceite de maíz/rata/día (g)	GSHt	
			sin etanol	con etanol (5g/Kg)
<i>ad libitum</i>	5%	0.6	0.83±0.23 ^a (8)	1.15±0.34 ^b (8)
<i>ad libitum</i>	15%	3.0	0.89±0.12 ^a (8)	1.05±0.24 ^b (8)
restringida	15%	1.5	1.64±0.60 ^c (8)	1.40±0.37 ^d (8)

Números en renglones con literales distintas difieren estadísticamente

^{a,b} (P< 0.05)

^{c,d} (P<0.01)

Cuadro No. 9

Porcentaje de elevación del glutatión total (GSht) en sangre de rata después de 8 horas de intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol. Métodos: acoplado de ácido 5',5-di-tio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB) y glutatión reductasa y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Método utilizado	Porcentaje de aceite de maíz en la dieta	
	5%	15%
Método acoplado de DTNB y glutatión reductasa	138 (8)	118 (1)
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	108 (8)	214 (1)

El 100% se consideró al valor obtenido en las ratas antes de ser intoxicadas con etanol.

Cuadro No. 10

Modificación de la relación GSH/GSSG por el tipo de grasa en la dieta
y la intoxicación aguda con control.

Tipo de grasa	%	Hígado		Sangre	
		control	etanol	control	etanol
manteca de cerdo	5	1.8 (1)	3.4 (1)	39.4 (1)	13.8 (1)
	15	20.9 (1)	1.7 (1)	26.7 (1)	3.0 (1)
sebo de res	5	3.1 (1)	12.9 (1)		
	15	3.3 (1)	3.1 (1)		
aceite de maíz	5			13.3 (1)	0.9 (1)
	15			1.3 (1)	0.1 (1)

Cuadro No. 11

Porcentaje de elevación del glutatión reducido (GSH) y del glutatión oxidado (GSSG) en la sangre de aorta posterior de la rata por efecto de la etanolemia aguda.

	Porcentaje de aceite de maíz en la dieta	
	5%	15%
GSSG	788 (1)	454 (1)
GSH	56 (1)	32 (1)

Determinación de glutatión oxidado mediante HPLC Asensi *et al.* (6).

Cuadro No. 12

Modificación del glutation total (GSHt) en la sangre ($\mu\text{moles/ml}$) y en el hígado ($\mu\text{moles/g}$) de ratas Wistar por el tipo de grasa en la dieta y la intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol

%	Tipo de grasa	plasma		sangre		hígado	
		control	etanol	control	etanol	control	etanol
5	aceite de maíz			0.960 \pm 0.175 (7)	1.178 \pm 0.396 (7)	6.07 \pm 0.177 (2)	4.58 (2)
15	aceite de maíz			0.965 \pm 0.153 (8)	1.291 \pm 0.265 (8)	4.09 \pm 0.848 (2)	4.69 (2)
5	manteca de cerdo			1.615 (1)	1.68 \pm 0.042 (2)	6.45 \pm 0.800 (3)	5.66 \pm 0.835 (4)
15	manteca de cerdo			1.677 (1)	1.740 (1)	5.18 \pm 0.771 (4)	5.765 \pm 0.198 (4)
5	aceite de maíz + manteca*	0.133 \pm 0.073 (8)	0.085 \pm 0.004 (2)	0.729 \pm 0.126 (8)	0.934 \pm 0.393 (6)	5.29 \pm 0.658 (8)	4.61 \pm 0.326 (3)
15	aceite de maíz + manteca*	0.081 \pm 0.006 (8)	0.090 \pm 0.004 (2)	0.797 \pm 0.300 (8)	1.061 \pm 0.139 (6)	4.78 \pm 0.44 (9)	5.37 \pm 0.428 (5)

*50% aceite de maíz + 50% manteca de cerdo

Cuadro No. 13

Modificación de la morfología hepática de la rata Wistar por el tipo y la cantidad de grasa en la dieta después de 8 horas de la intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol.

Fuente de grasa	DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DEL HÍGADO	
	control	etanol
5% aceite de maíz	Esteatosis univacuolar periportal	Esteatosis multivacuolar periportal
15% aceite de maíz	Esteatosis univacuolar centrolobulillar	Esteatosis multivacuolar centrolobulillar
5% aceite de cártamo	Hígado normal	Esteatosis univacuolar periportal
15% aceite de cártamo	Esteatosis univacuolar difusa leve	Esteatosis univacuolar moderada leve difusa
5% grasa animal *	Esteatosis univacuolar moderada periportal	
15% grasa animal *	Esteatosis univacuolar heterogénea moderada	

* Manteca de cerdo o sebo de res

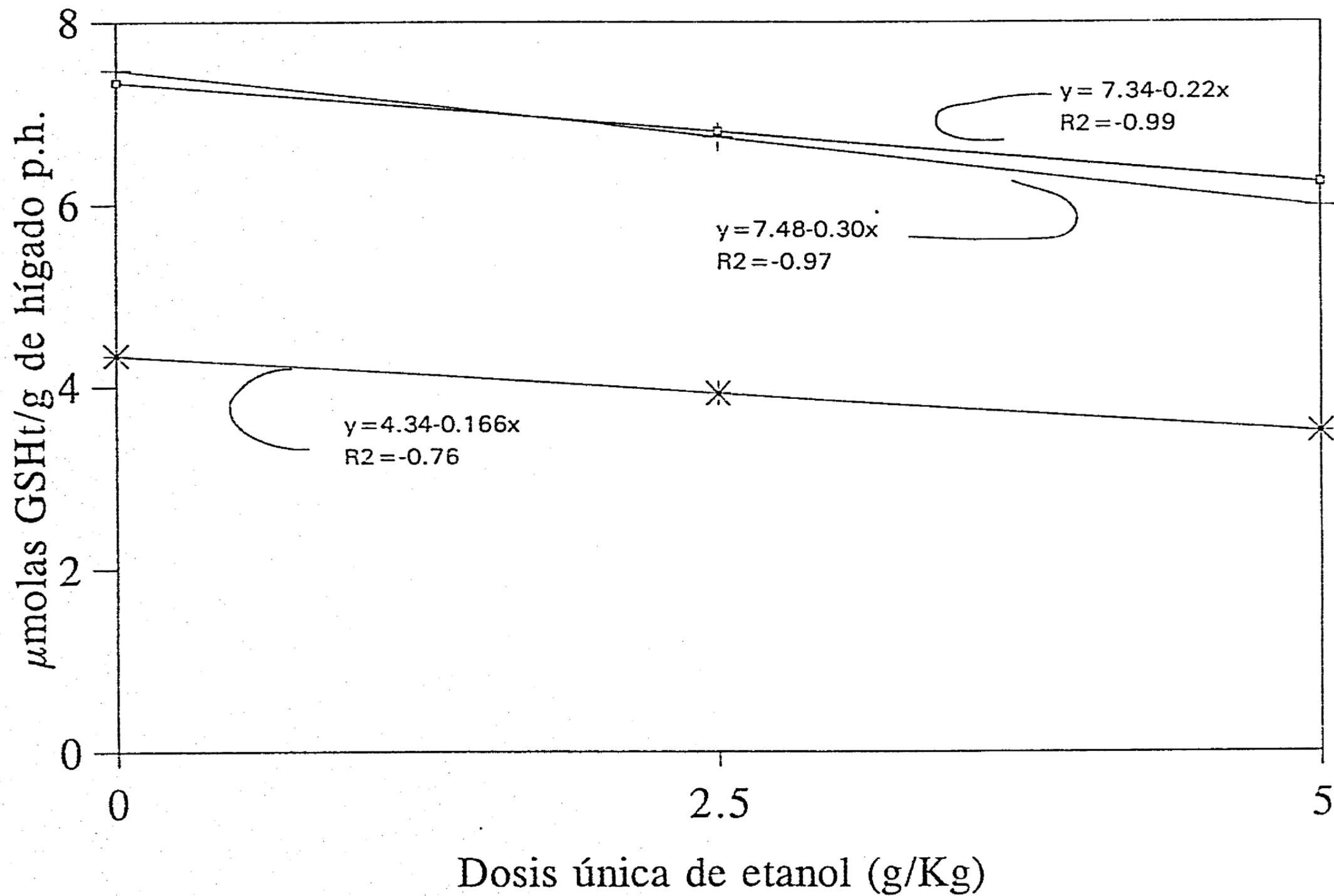
Cuadro No. 14

Consumo voluntario de alimento de las ratas machos con una dieta baja (12% del total de calorías) o alta (35% del total de calorías) en lípidos.

Aceite de maíz en la ración (%)	Consumo voluntario de alimento (g/rata/día)	Consumo de aceite de maíz (g)
5	12.4	0.62
15	21.6	3.24

Cuadro No. 15
Consumo de alimento diario de ratas machos bajo un programa de restricción alimenticia con una dieta alta (15%) en aceite de maíz.

Consumo de alimento (g/rata/día)	Consumo de aceite (g)
12.4	1.5



□ 3.5 + 0.7 * 1.5

FIGURA 1. Correlación entre el consumo de etanol y el glutatión total (GSHt) en el hígado de la rata.

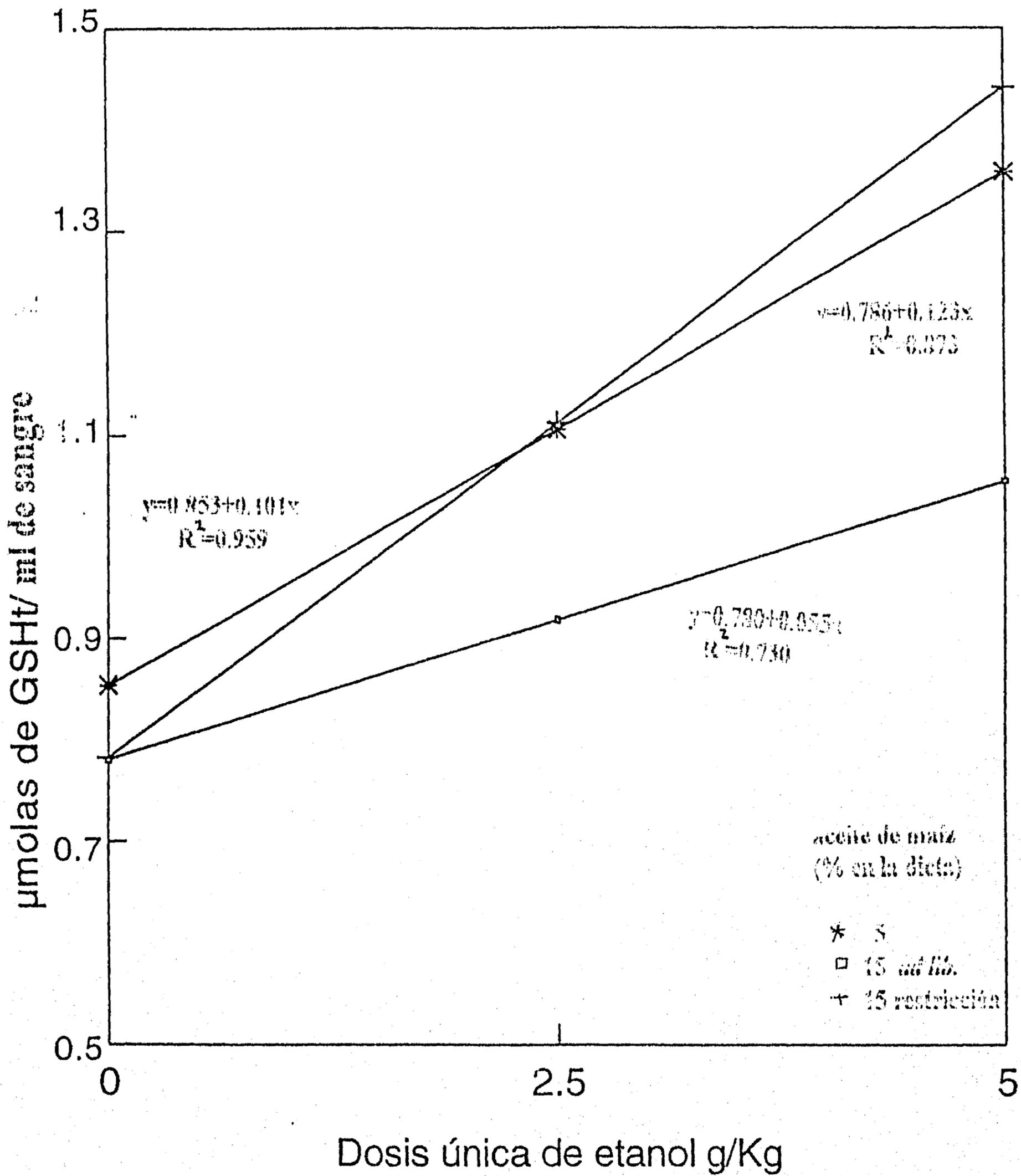


Figura 2. Correlación entre el consumo de etanol y glutatión total (GSht) en la sangre de ratas que consumen 5% ó 15% de aceite de maíz en la dieta.

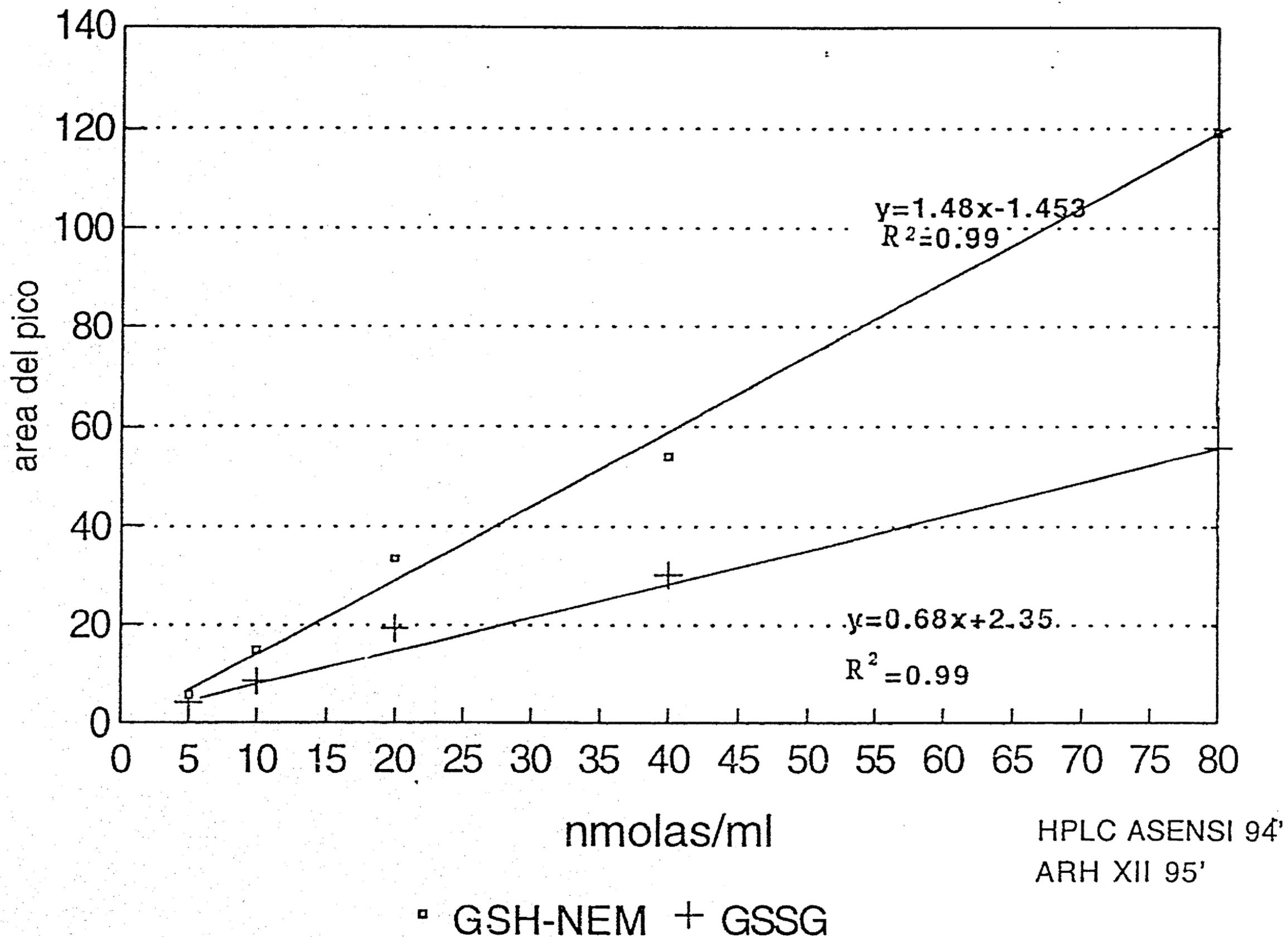


Figura 3. Curvas estándares mediante HPLC de los aductos de glutatión reducido-N-etilmaleimida (GSH-NEM) y de glutatión oxidado (GSSG).

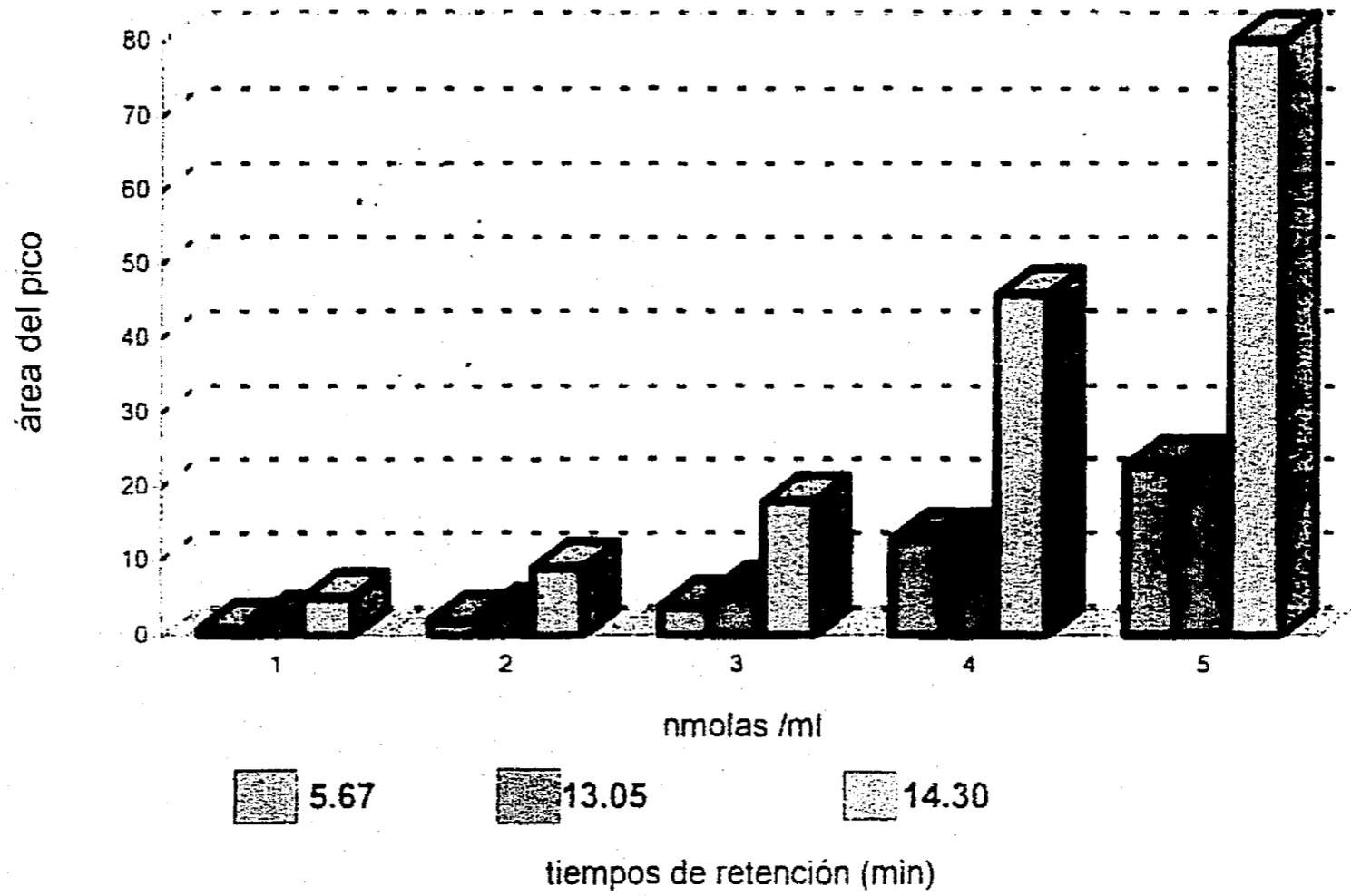
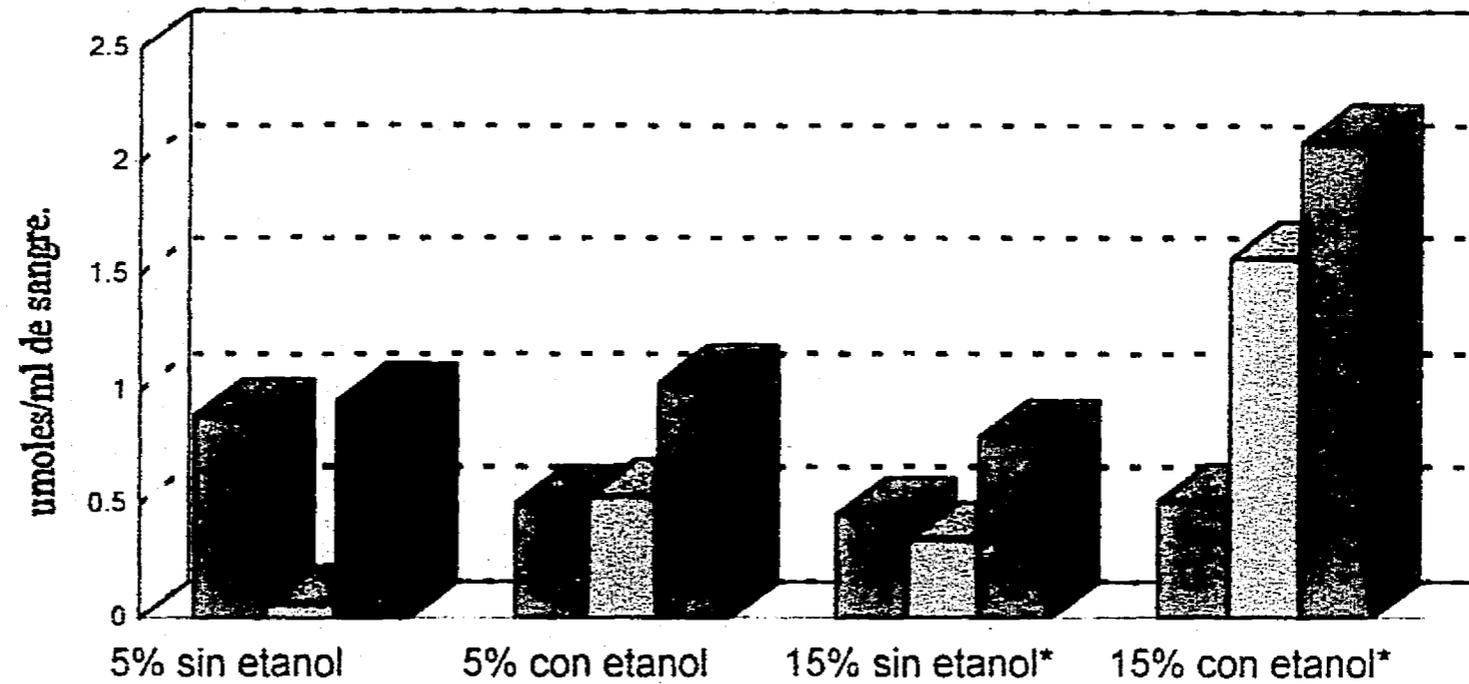


Figura 4 . Curvas de las aductos de GSH-NEM



n=1

método = HPLC

* 15% aceite de maíz con restricción alimenticia

Tratamientos

■ GSH □ GSSG ■ GSht

Figura 5. Modificación del glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) en la sangre de rata que consume aceite de maíz, por la intoxicación aguda con eyanol.

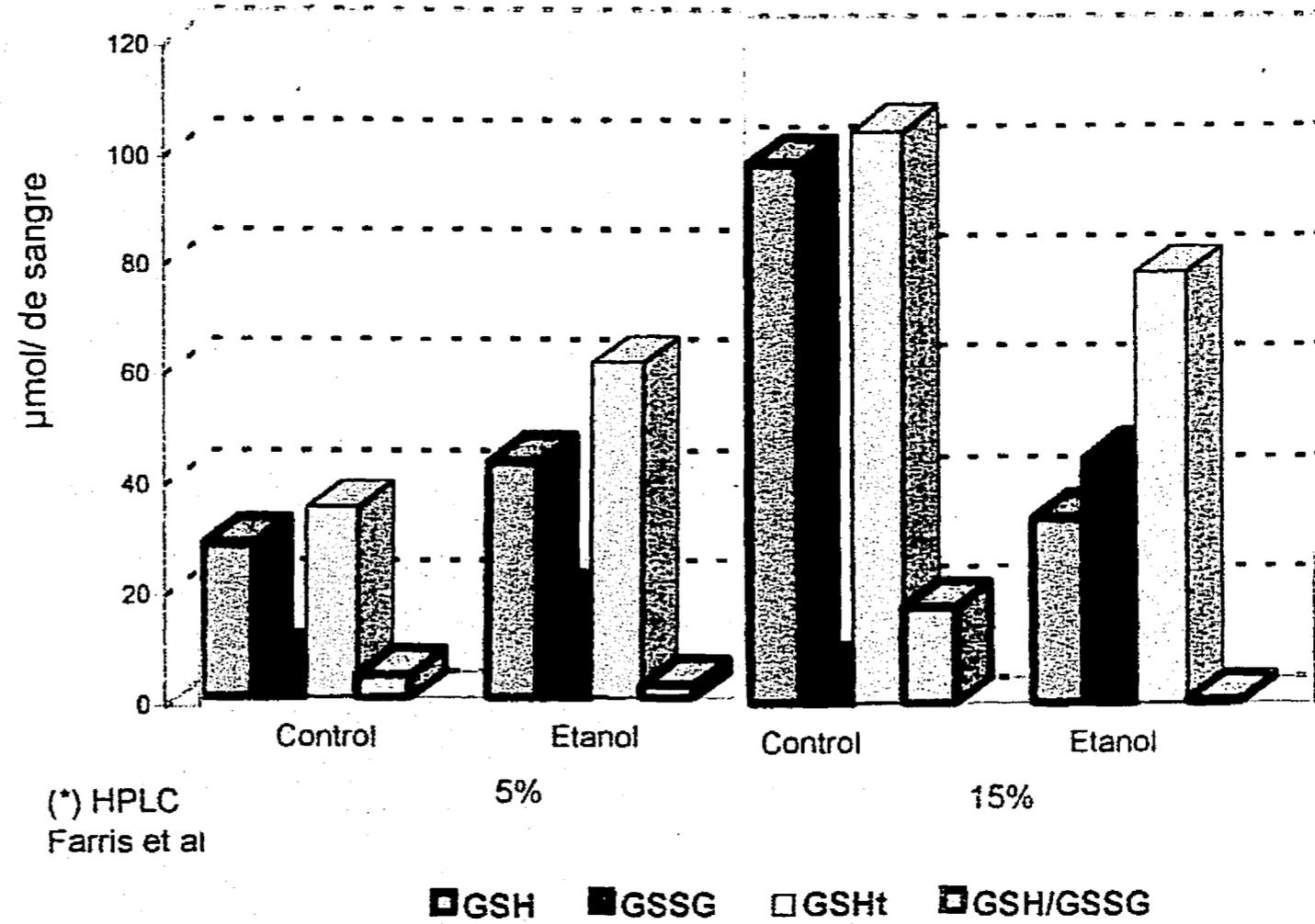


Figura 6. Modificación del glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en sangre de rata que consume manteca de cerdo por la intoxicación aguda de etanol.

n=1

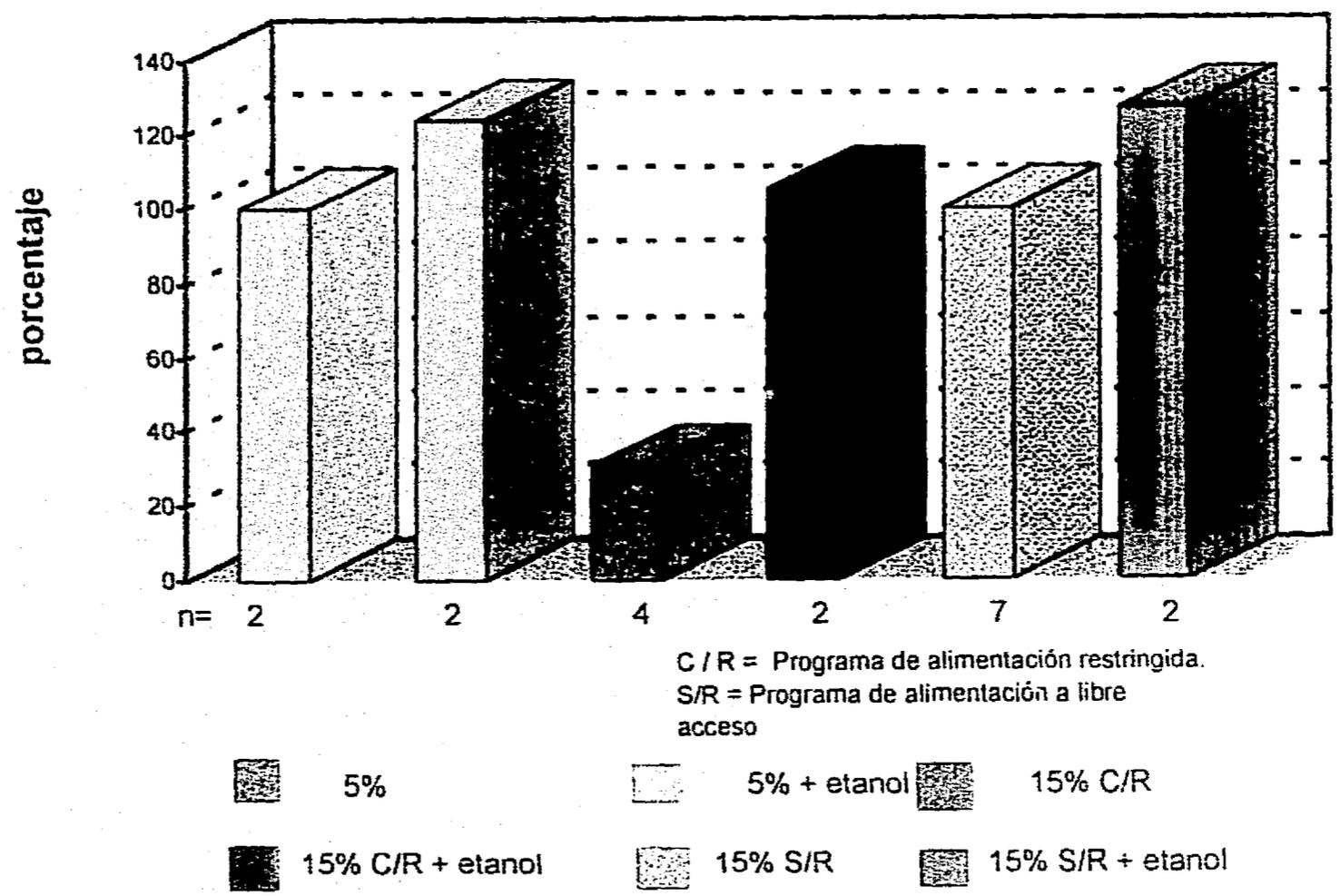


Fig. 7 Modificación de glutatión reducida (GSH) hepático por la intoxicación aguda (5g/kg) en la rata que consume manteca de cerdo.

n=1

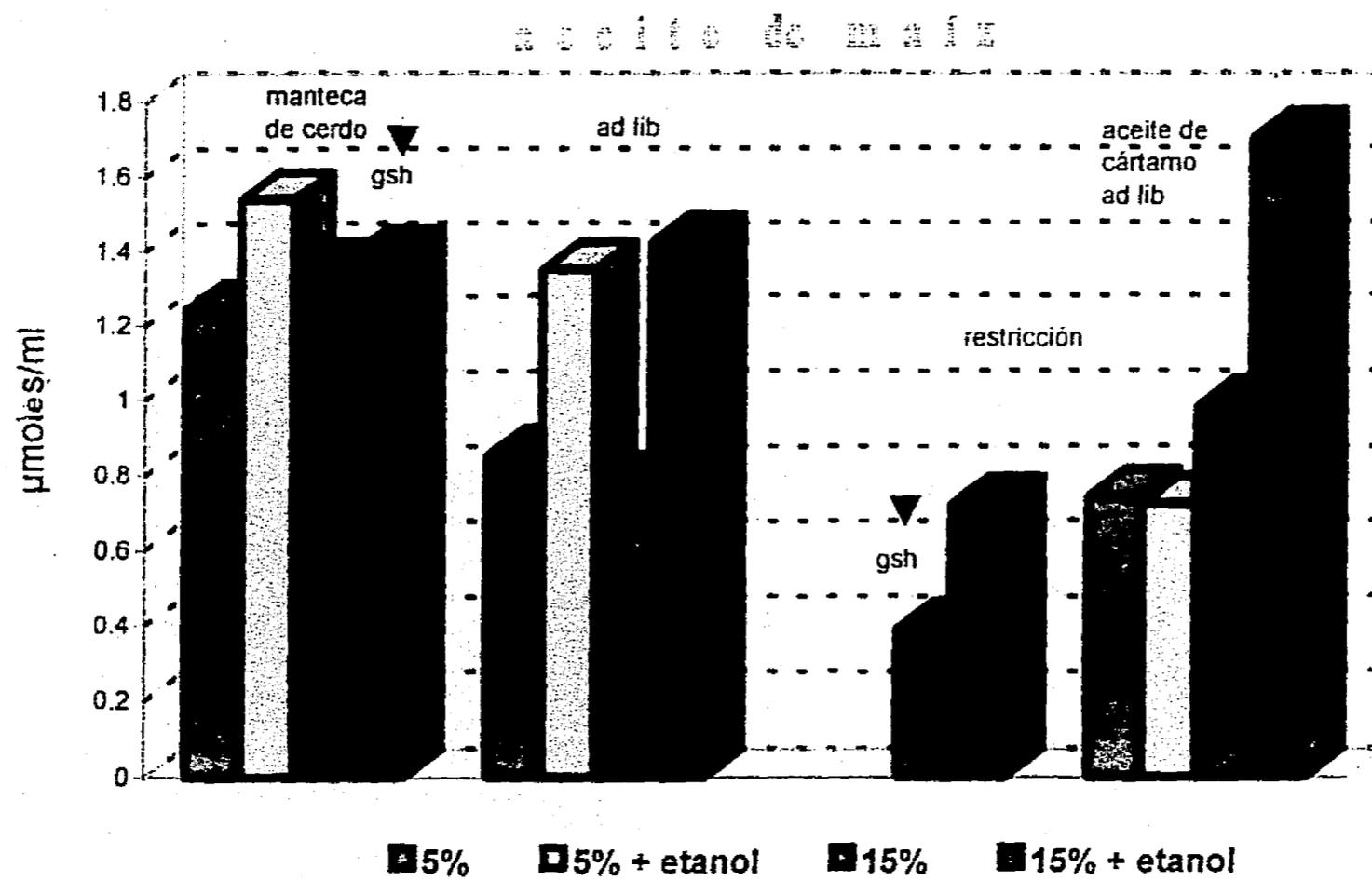


Figura 8 Modificación del glutatión total (GSht) en la sangre de rata por el tipo de grasa en la dieta.

n=1

5% aceite de maíz

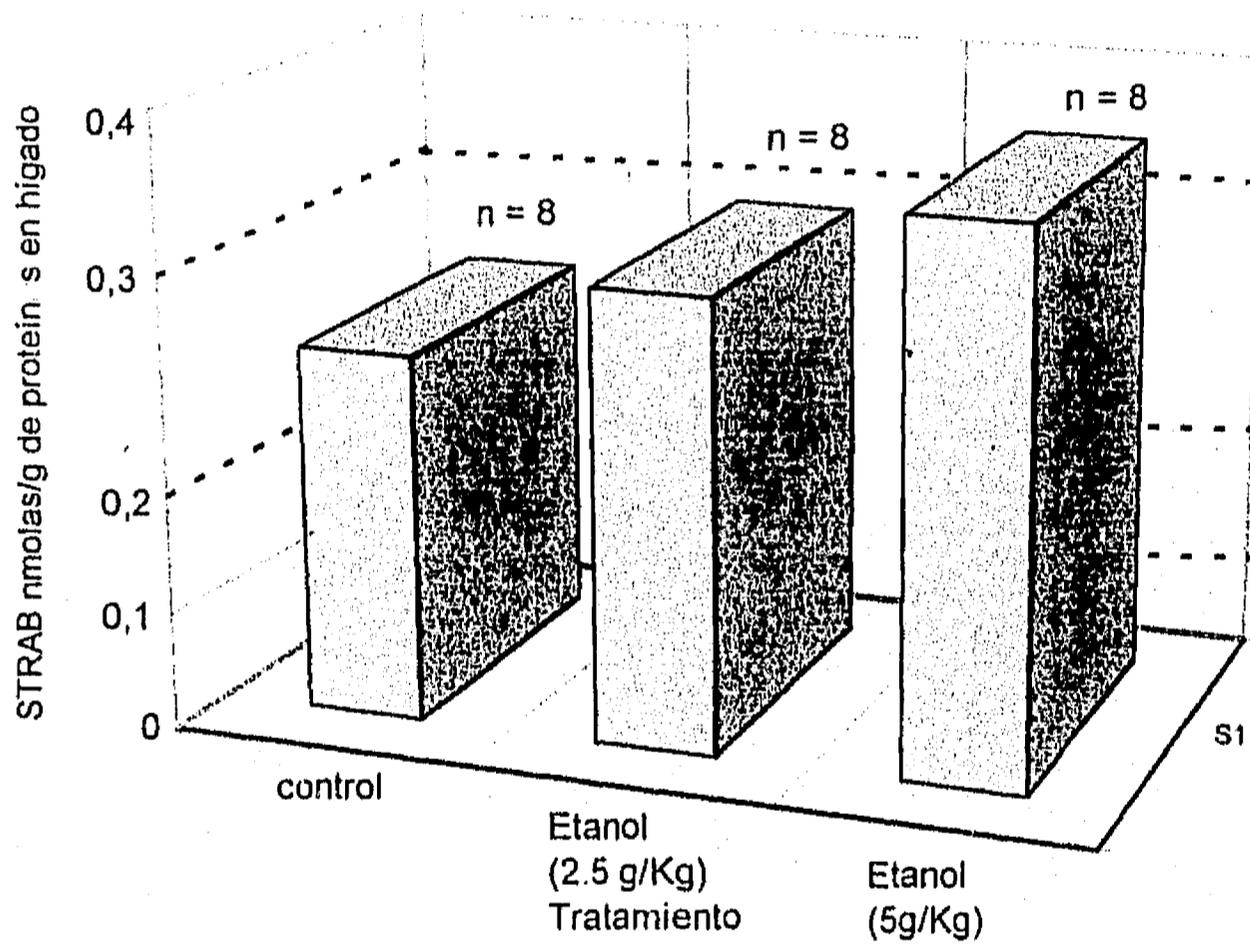


Figura 9 Efecto del etanol sobre las sustancias relacionadas con el ácido tiobarbitúrico (STRAB) de la rata que consume 5% de aceite de maíz.

15% aceite de maíz

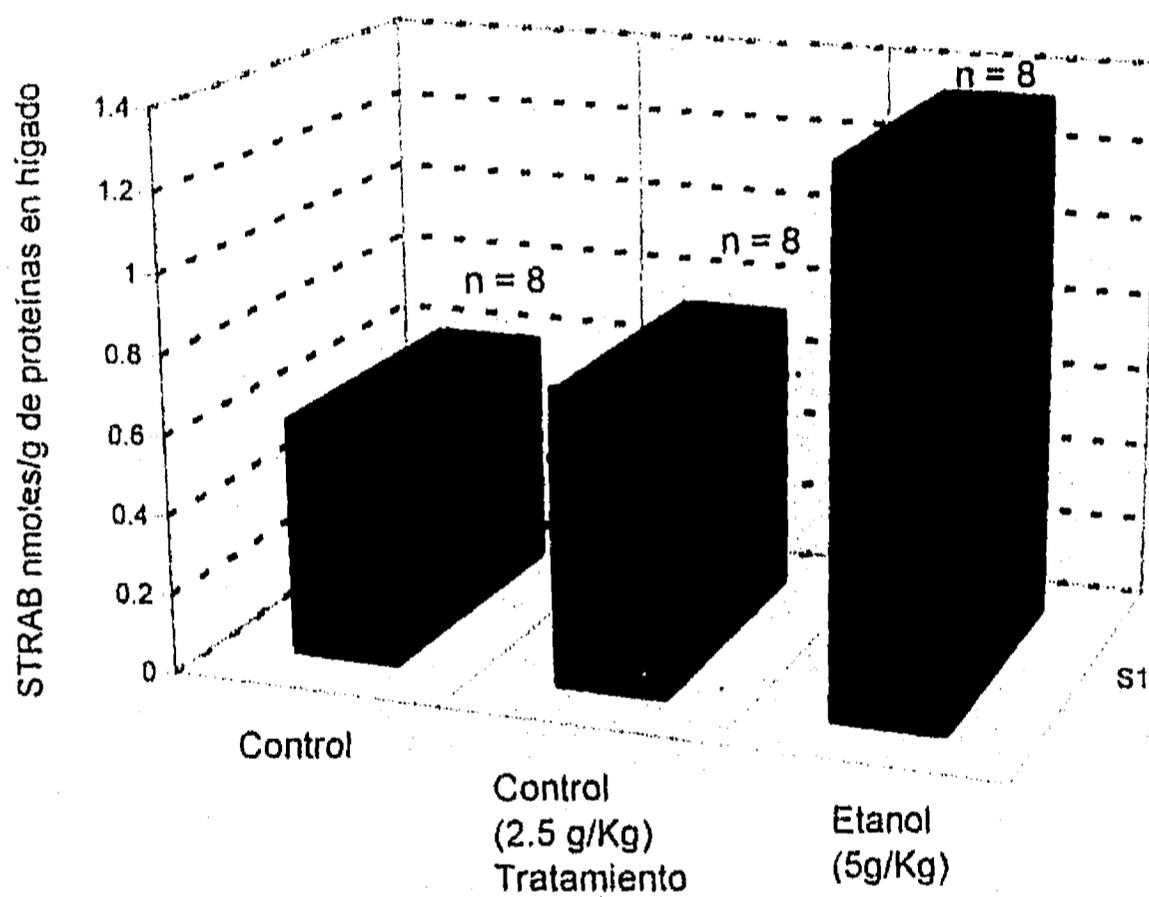


Figura 10 Efecto del etanol sobre las sustancias relacionadas con el ácido tiobarbitúrico (STRAB) de la rata que consume 15% de aceite de maíz

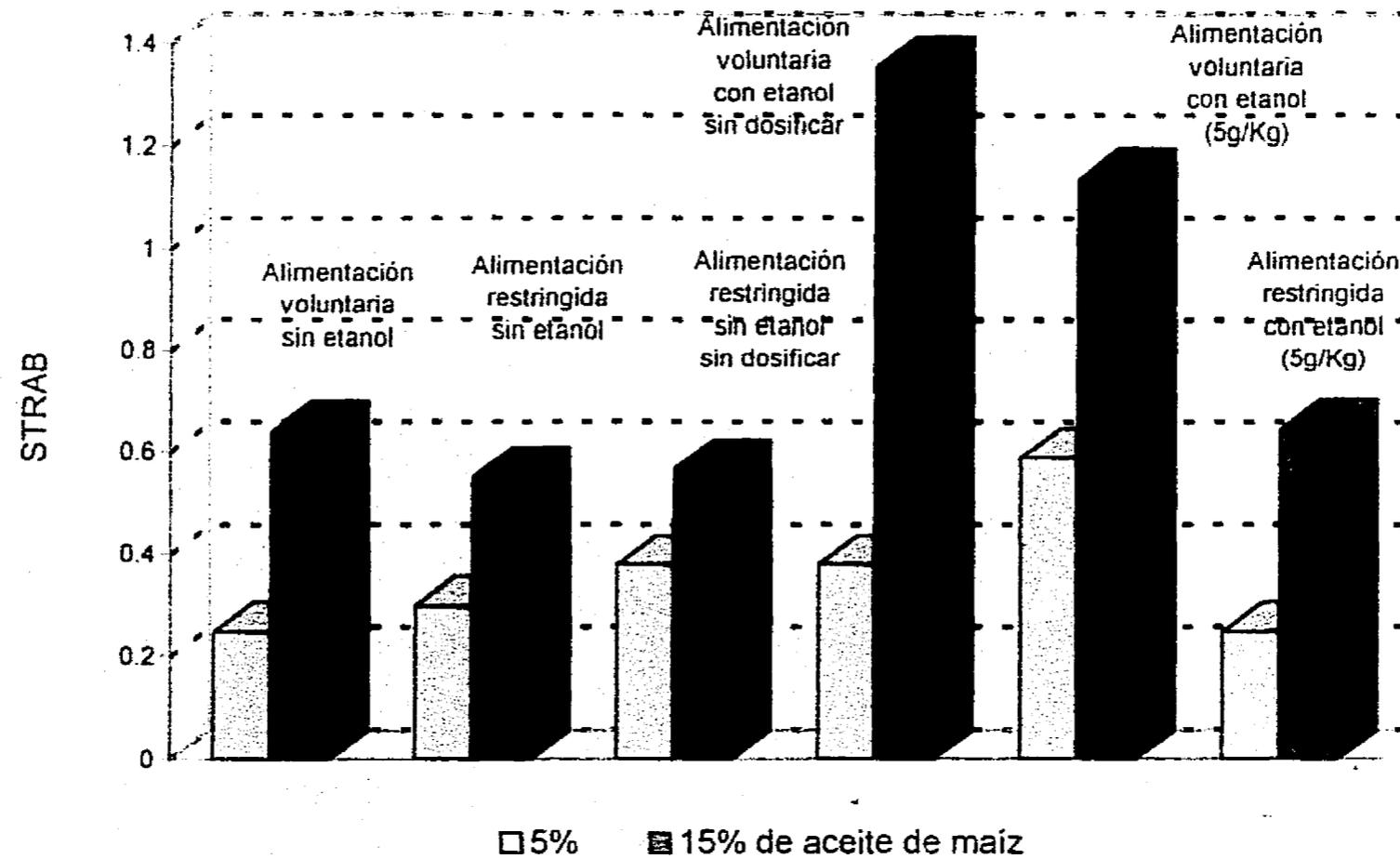


Figura 11 Sustancia relacionadas con el ácido tiobarbitúrico (STRAB) en el hígado de ratas alimentadas con 5 ó 15% de aceite de maíz en la dieta durante un mes y 8 horas después de ser intoxicadas de manera aguda (5g/Kg) con etanol.

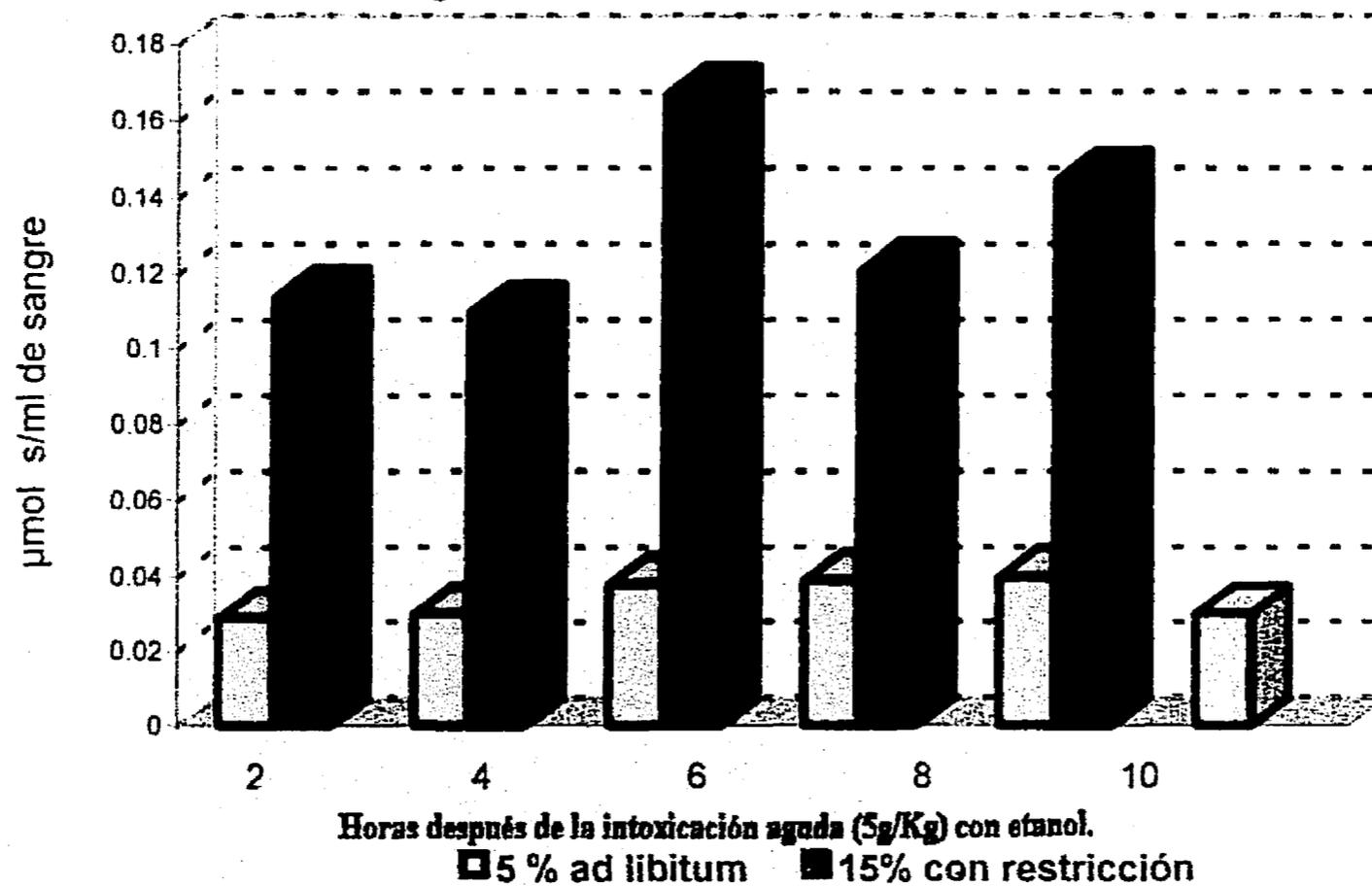
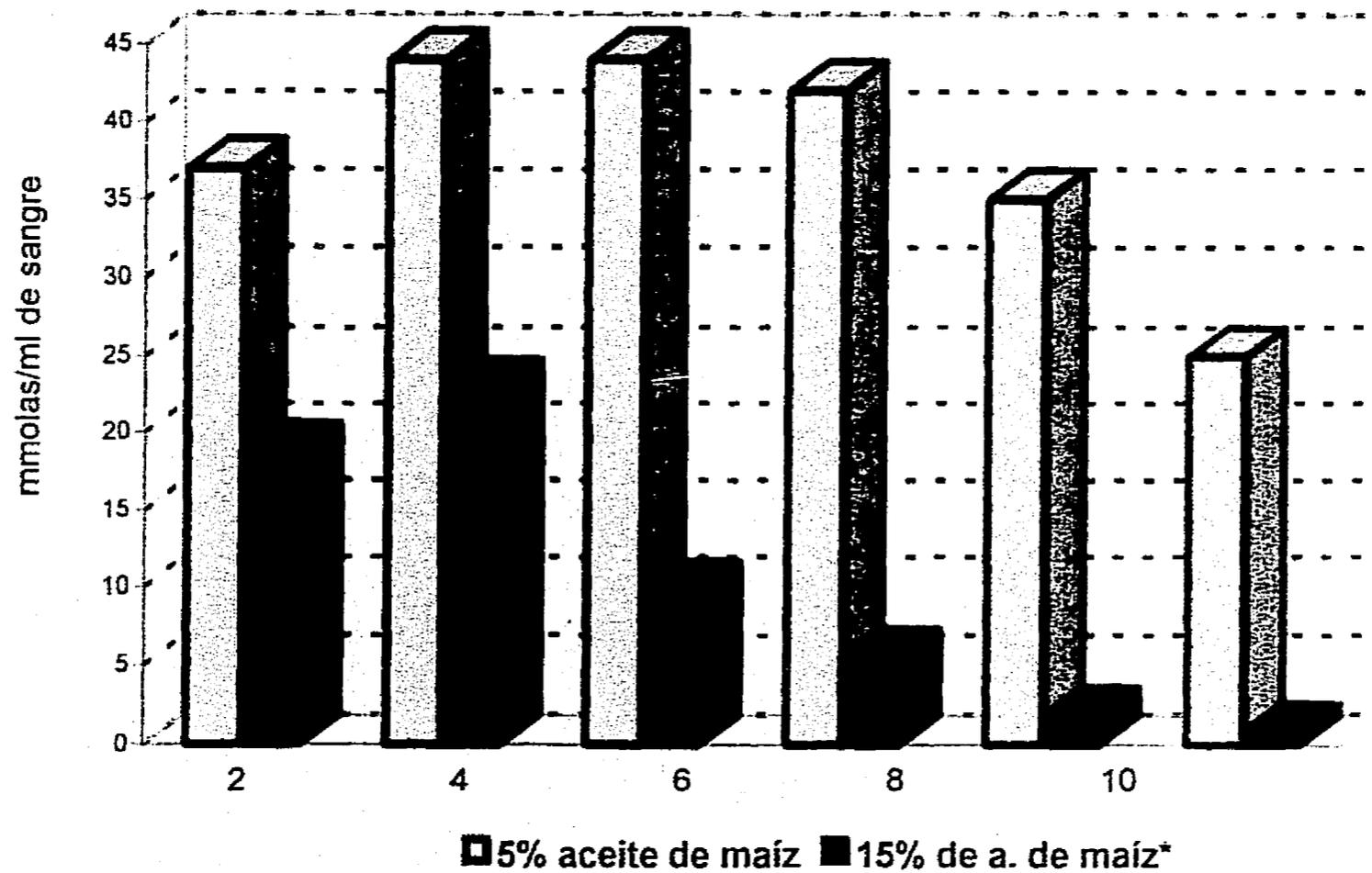


Figura 12 El acetaldehído en sangre de rata alimentada con 15% de aceite de maíz en un programa de restricción alimenticia aumenta 8 horas después de la intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol.

n=1



horas después de la intoxicación aguda (5g/kg) con etanol

Figura 13 El etanol en sangre de rata alimentada con 15% de aceite de maiz en un programa de restricción alimenticia disminuye 8 horas después de la intoxicación aguda (5g/kg) con etanol.

n=1



Figura 14 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de aceite de maiz en la dieta. Se observa esteatosis univacuolar periportal (*). 10X.

VC= vena central

P= espacio porta

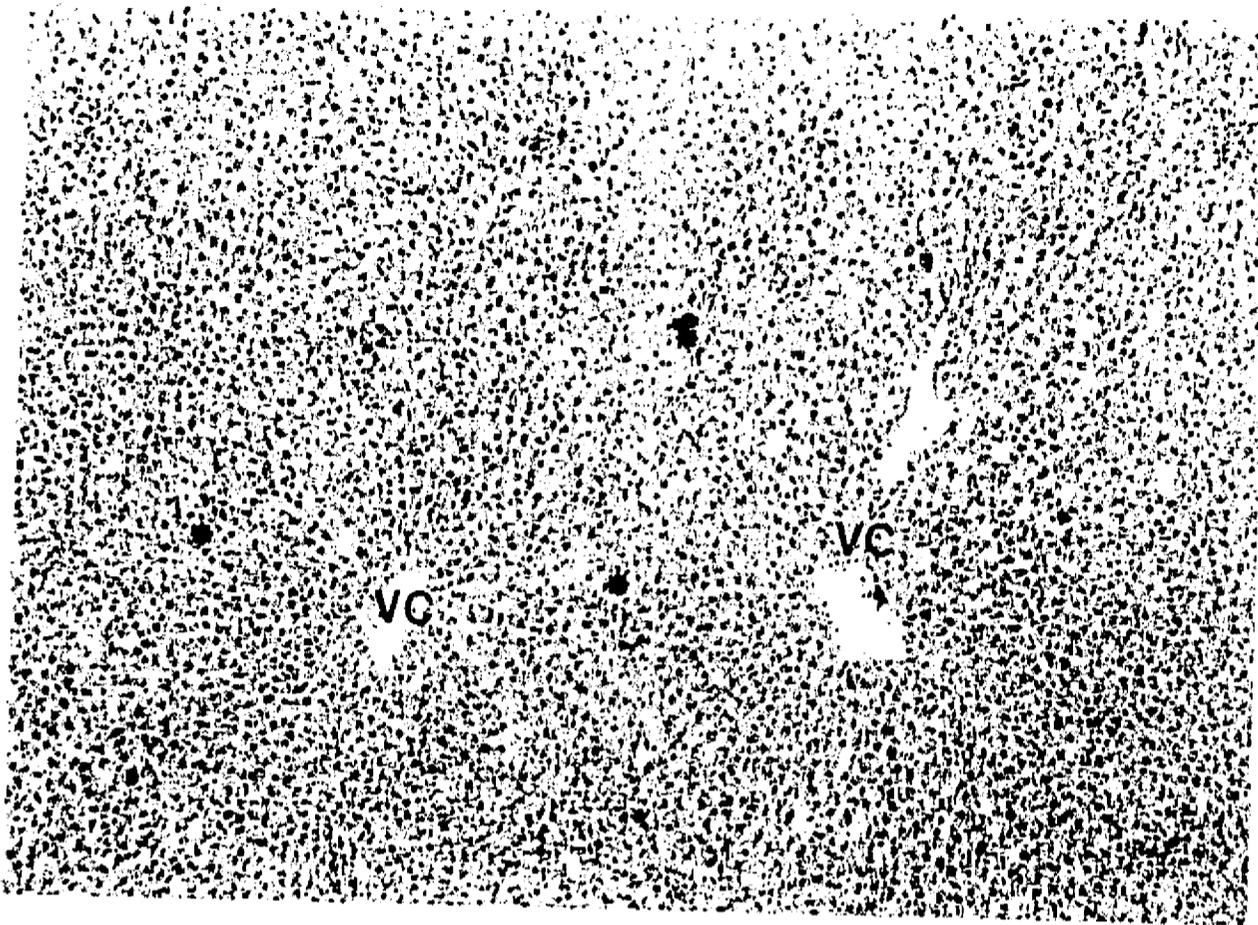


Figura 15 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de aceite de maíz en la dieta durante un mes y 8 horas después de intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol (63%). Se observa esteatosis multivacuolar en la zona perilobulillar (*). 10X.

VC= vena central

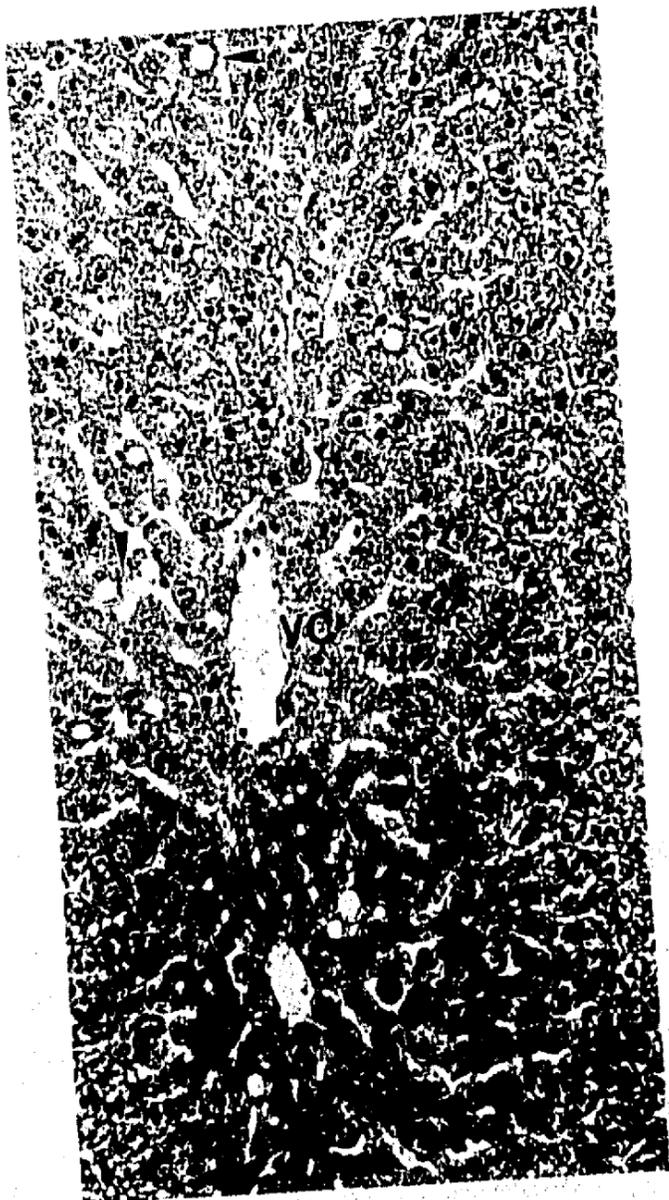


Figura 16 Fotomicrografia de hígado de rata que consumió 15% de aceite de maíz durante un mes. Se observa esteatosis univacuolar en la zona centrolobulillar (▲). 25X.

VC= vena central

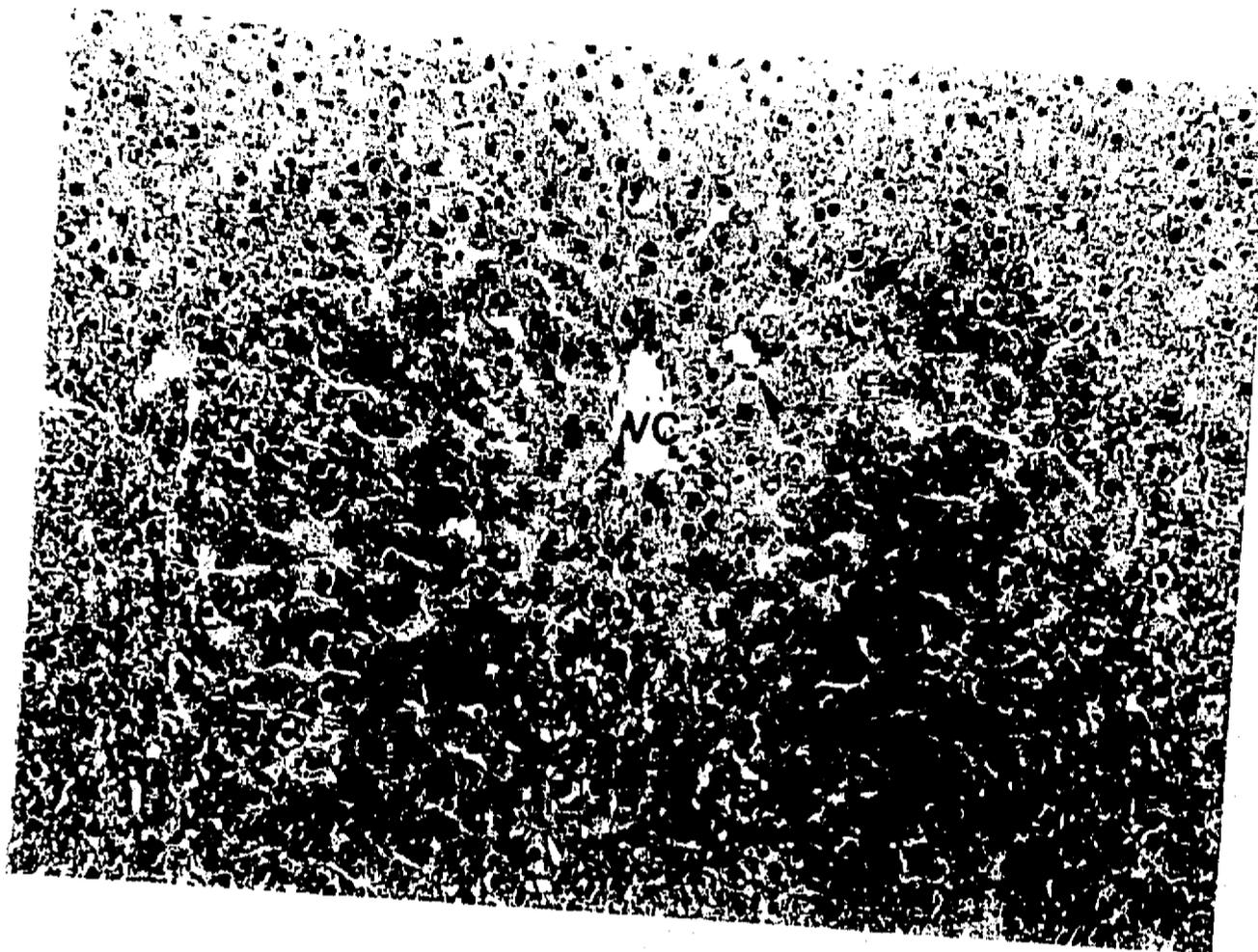


Figura 17 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de aceite de maíz en la dieta durante un mes y después de 8 horas de la intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol (63%). Se observa esteatosis univacuolar centrolobulillar (▲). 25X.

VC= vena central

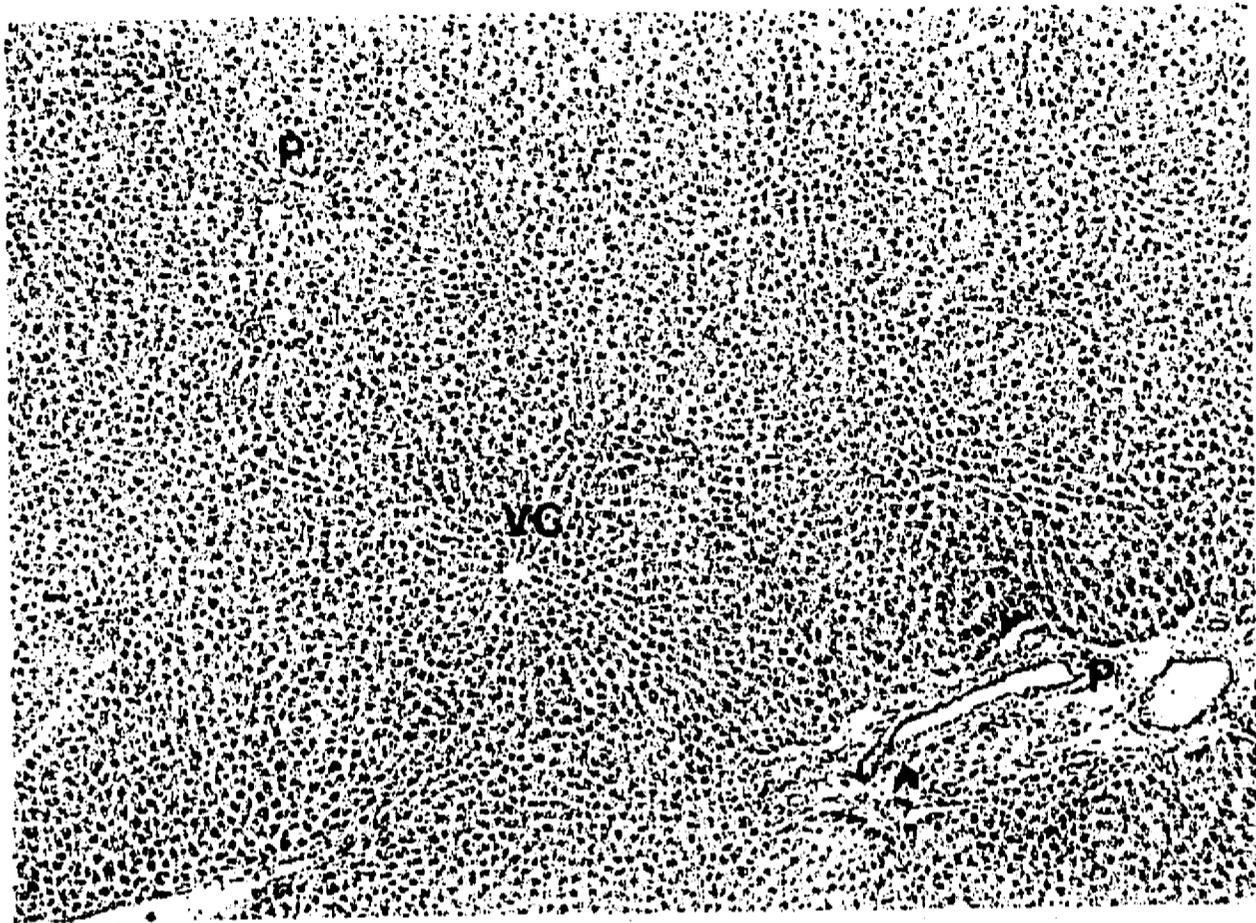


Figura 18 Fotomicrografia de hígado de rata que consumió 5% de aceite de cártamo durante un mes. Se observa hígado normal. 25X

VC= vena central

P= espacio porta

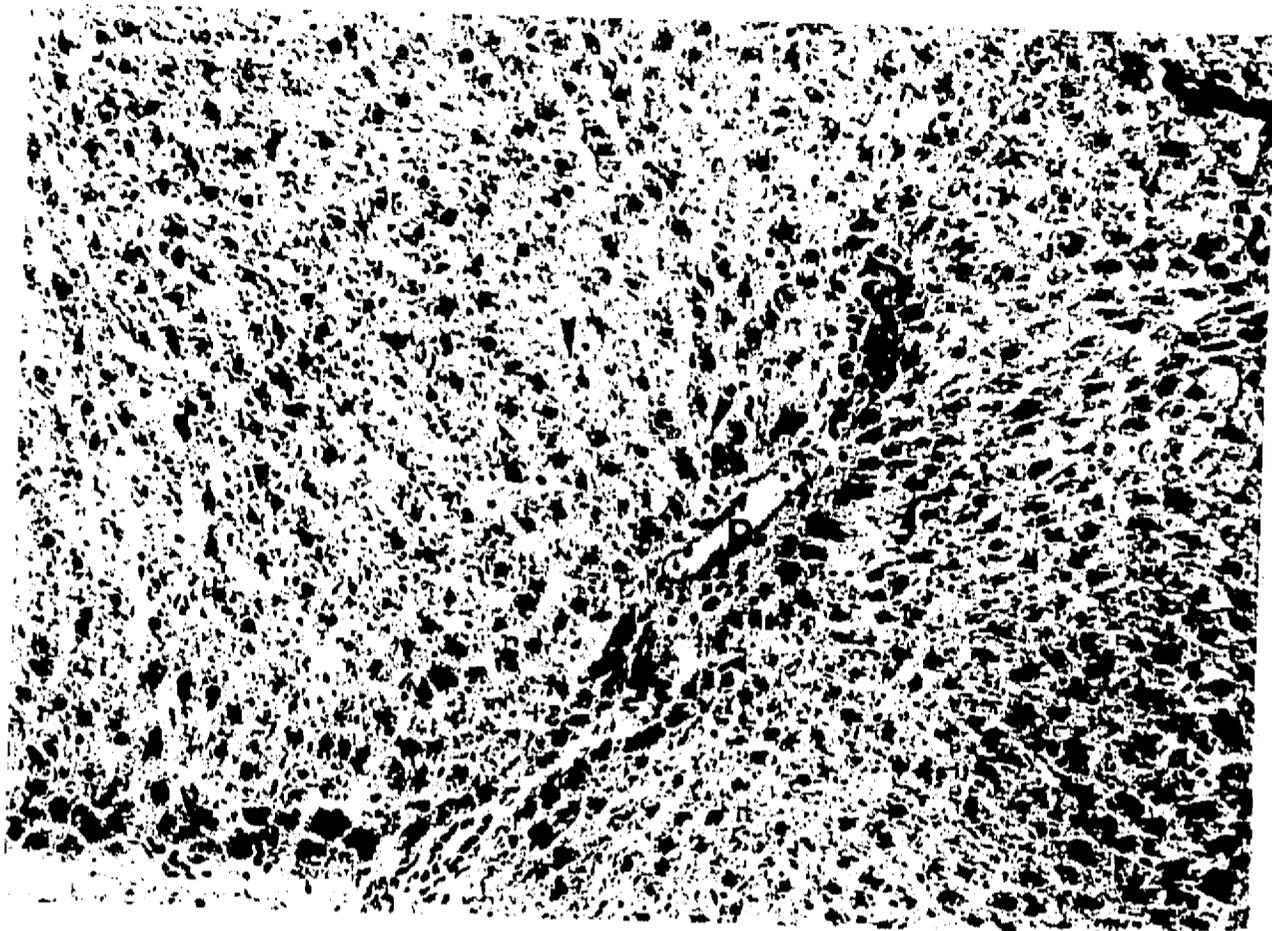


Figura 19 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de aceite de cártamo en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol (63%). Se observa hígado normal. 25X.

P= espacio porta

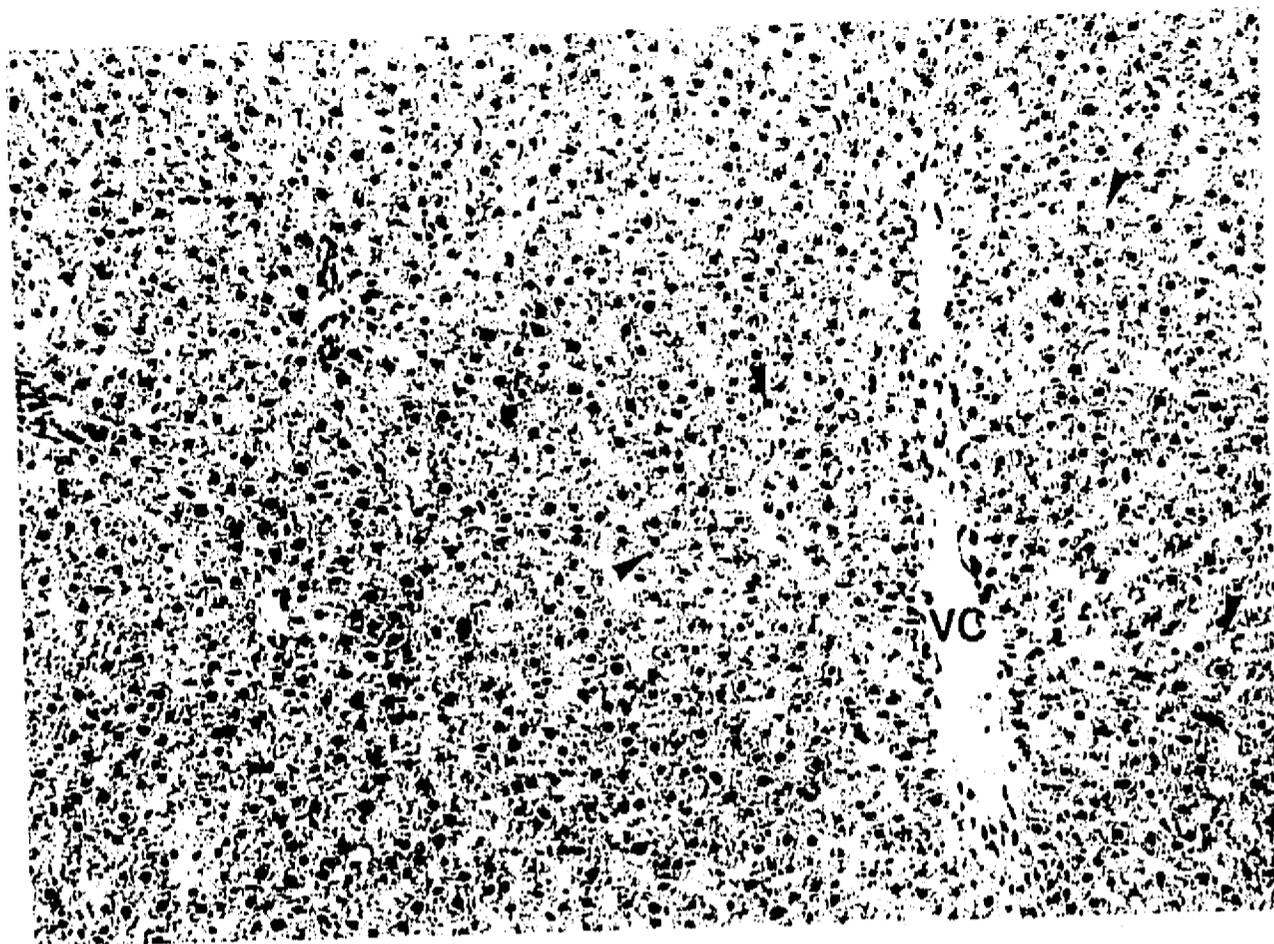


Figura 20 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de aceite de cártamo en la dieta durante un mes. Se observa esteatosis univacuolar de moderada a leve (▲).
25X.

VC= vena central

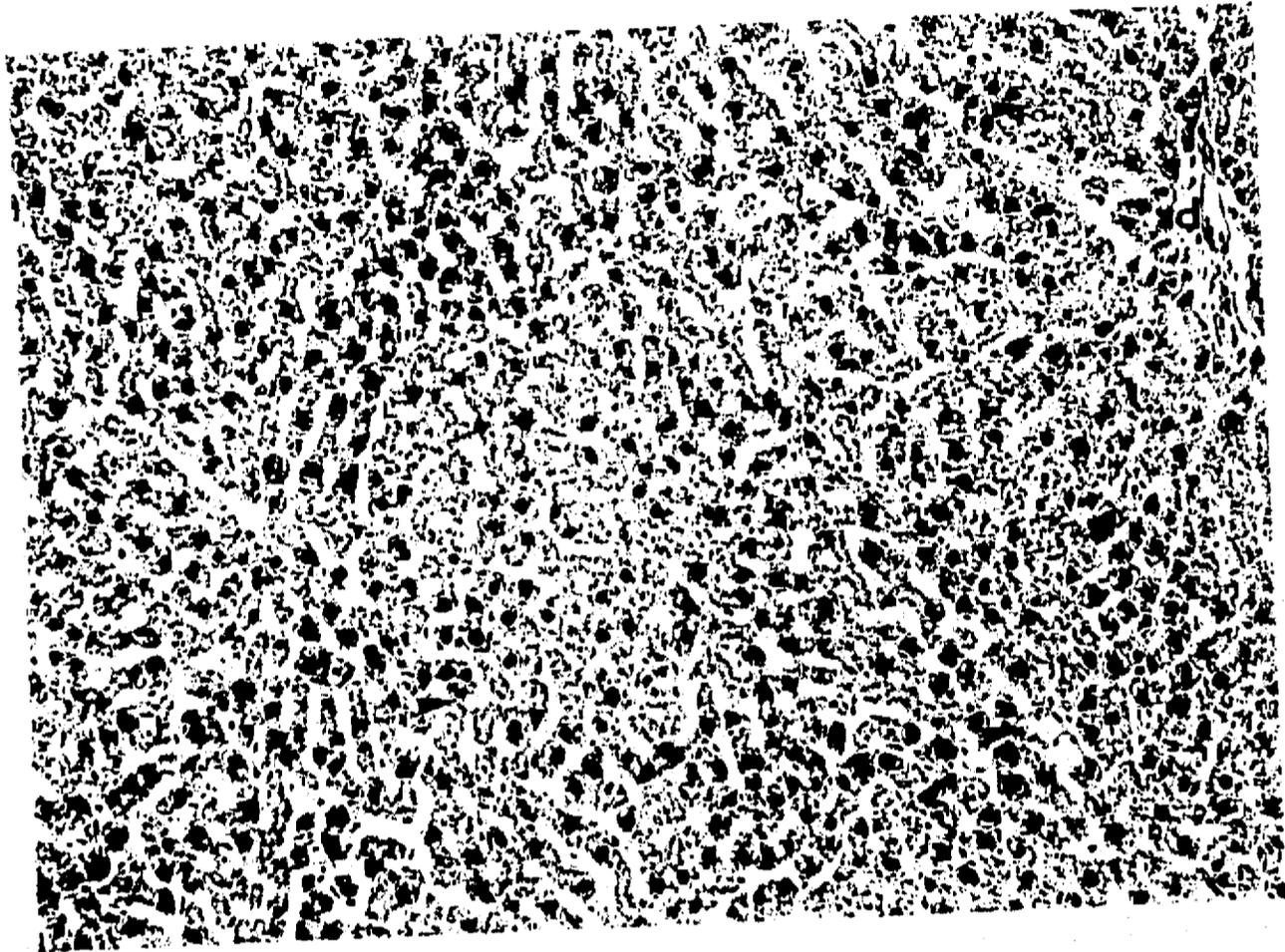


Figura 21 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de aceite de cártamo en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol (63%) . Se observa esteatosis univacuolar de moderada a leve difusa (A). 25X.

P= espacio porta

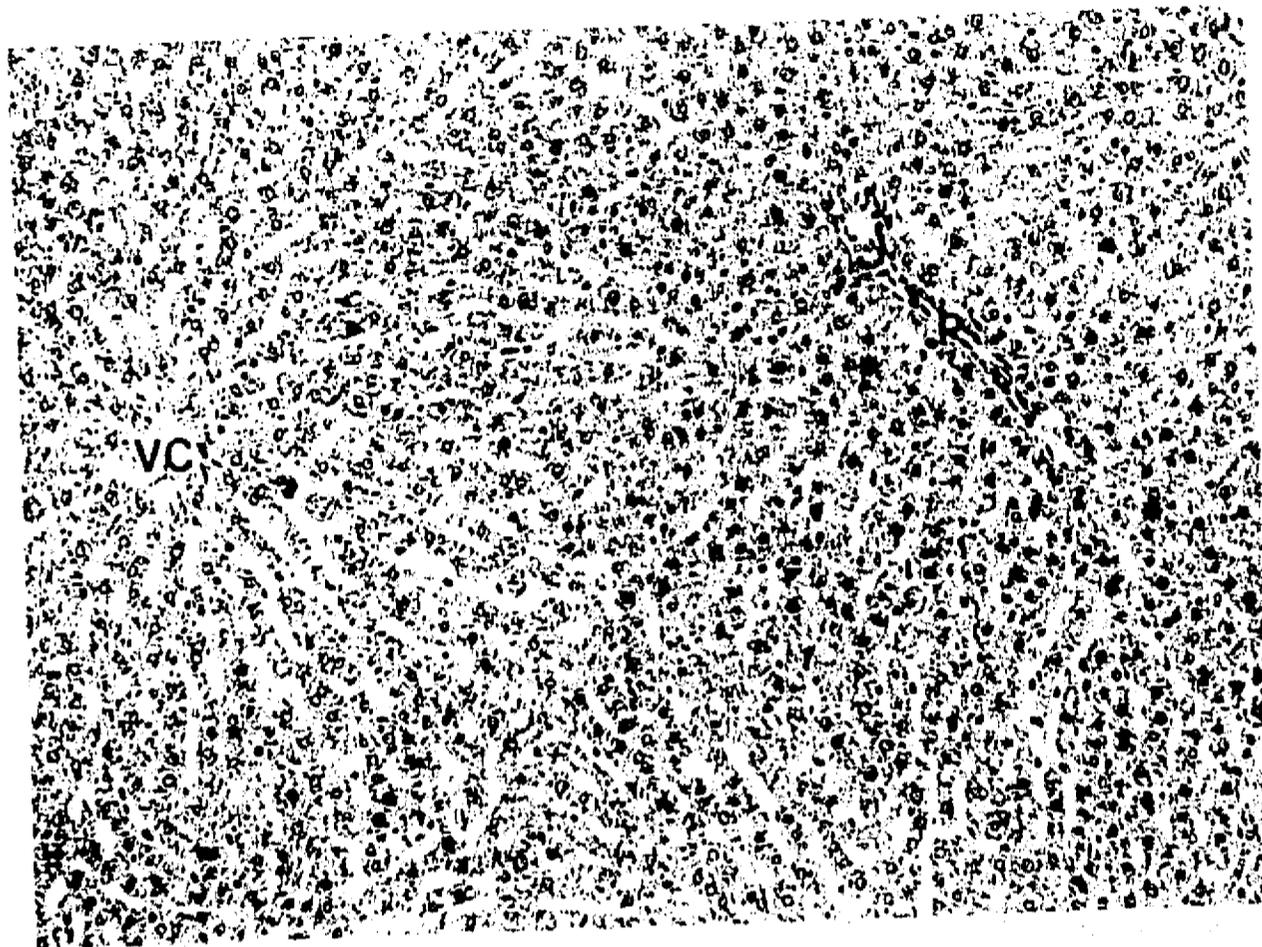


Figura 22 Fotomicrografia de hígado de rata que consumió 5% de sebo de res en la dieta durante un mes. Se observa esteatosis univacuolar moderada periportal (*). 25X

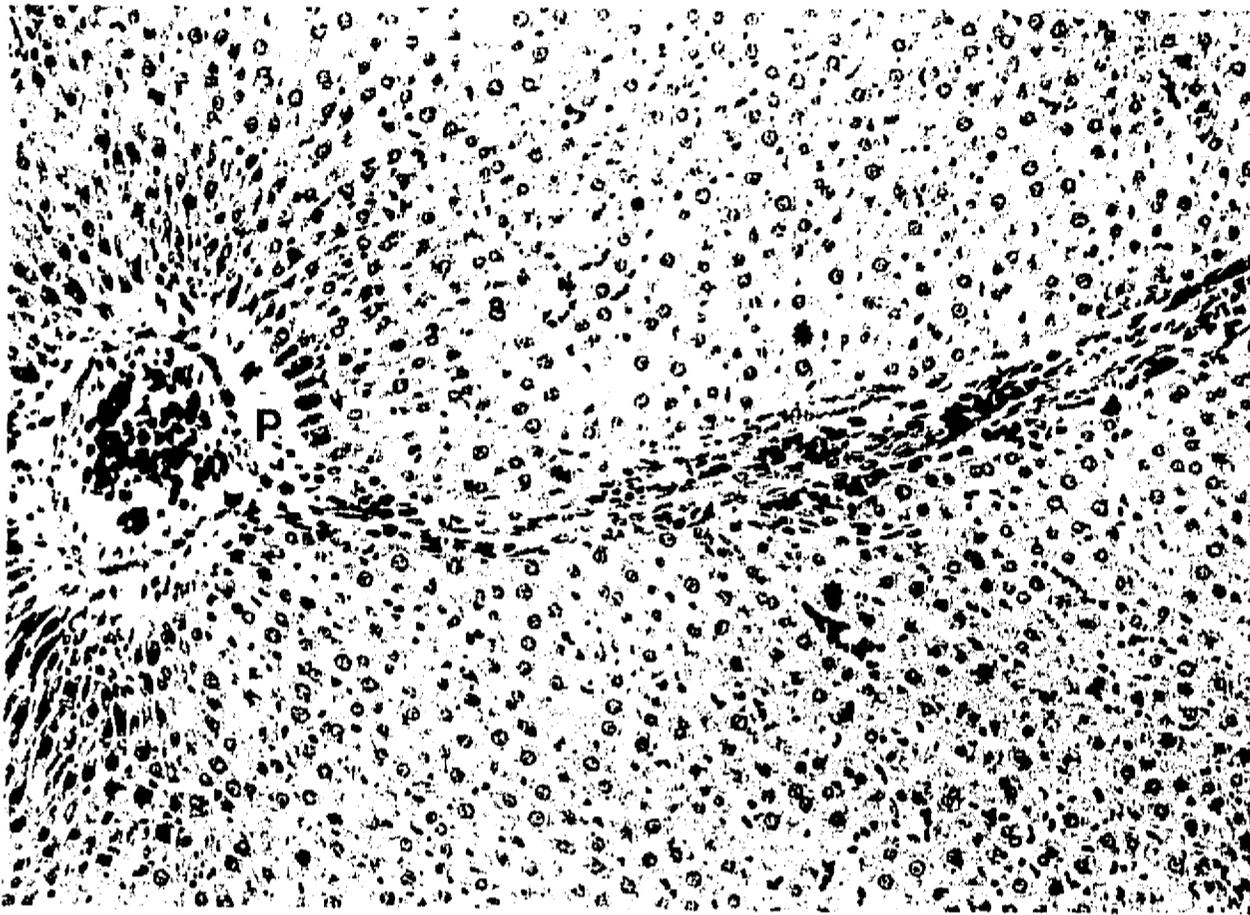


Figura 23 Fotomicrografía de rata que consumió 5% de sebo de res en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol (63%). Se observa esteatosis univacuolar moderada periportal (*). 25X.

VC= vena central

P= espacio porta

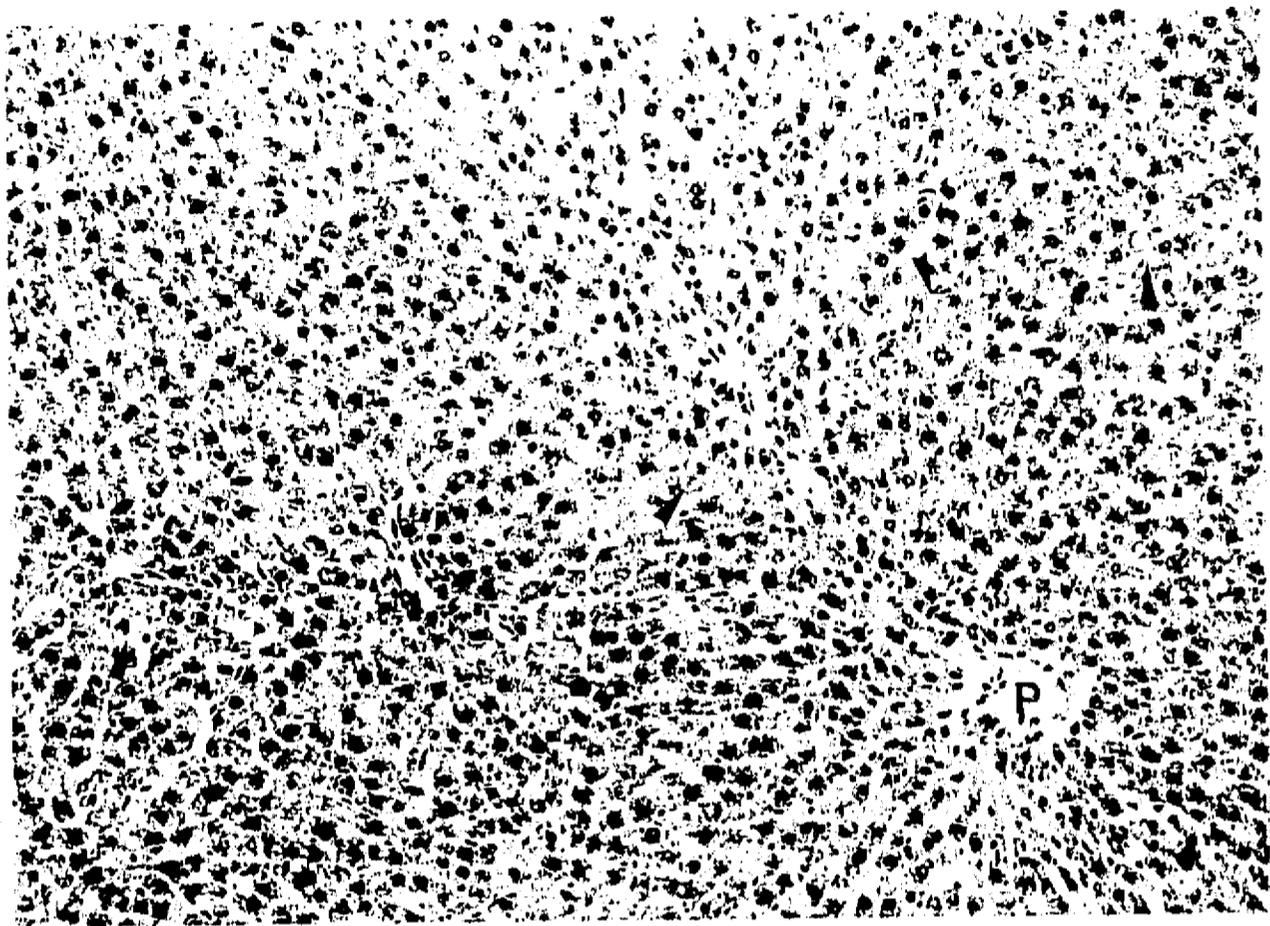


Figura 24 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de sebo de res en la dieta durante un mes. Se observa esteatosis univacuolar heterogénea moderada (A). 25X.

P= espacio porta

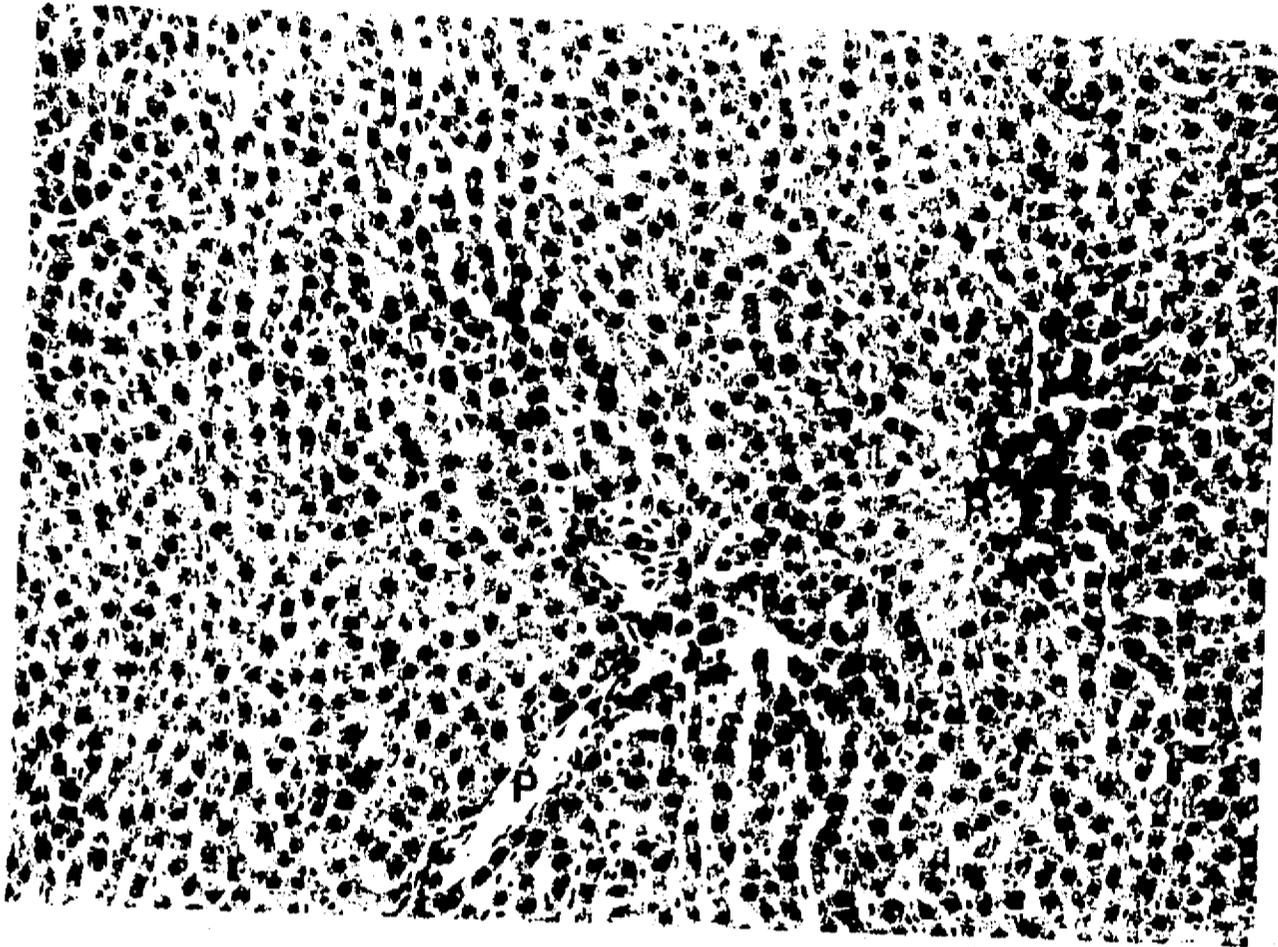


Figura 25 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de sebo de res en la dieta durante un mes y después de 8 horas de intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol (63%). Se observa esteatosis univacuolar moderada heterogénea (*). 25X.

P= espacio porta

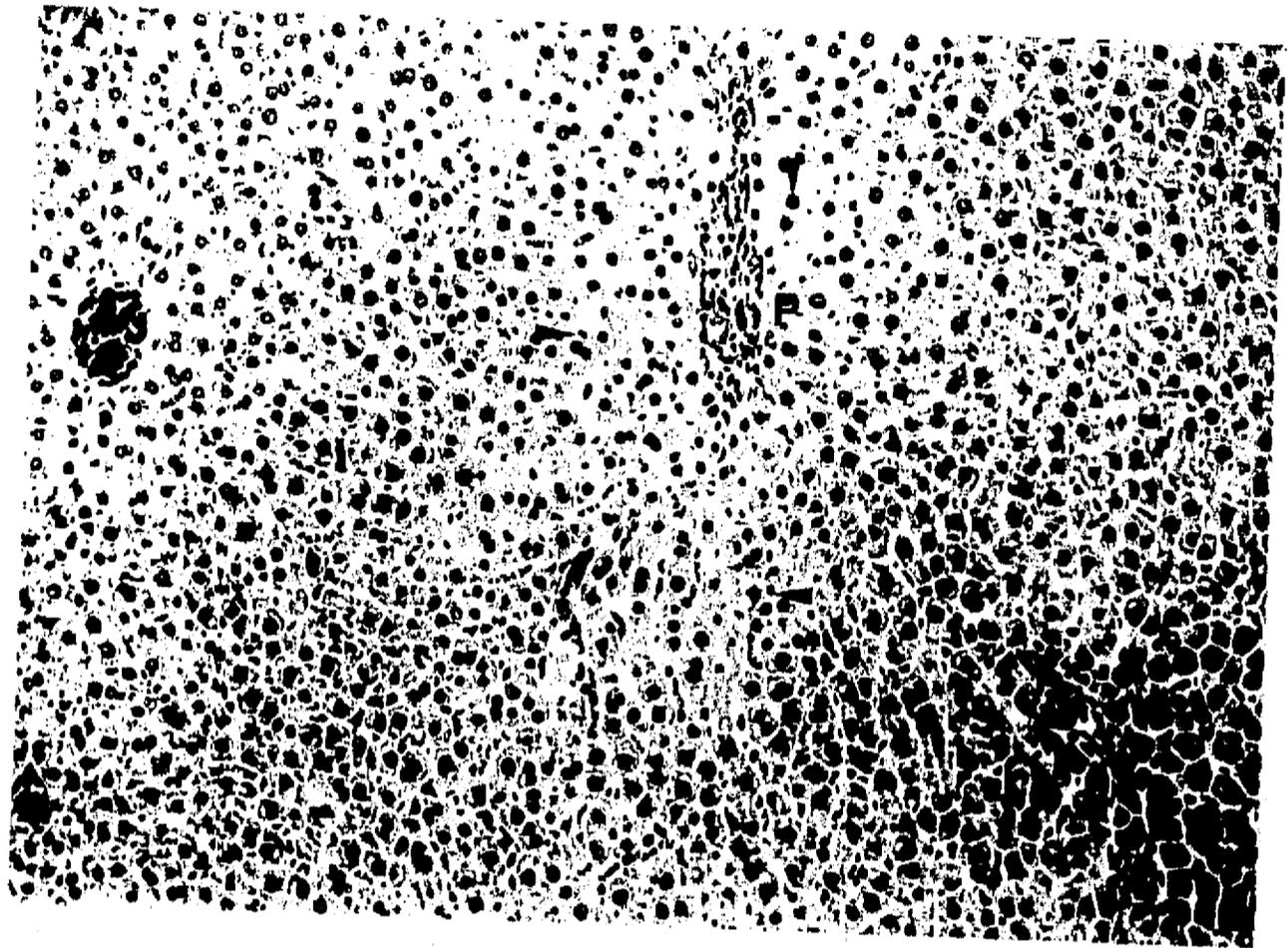


Figura 26 Fotomicrografia de ligado rata que consumió 5% de manteca de cerdo. Se observa esteatosis univacuolar moderada periportal (▲). 25X.

P= espacio porta

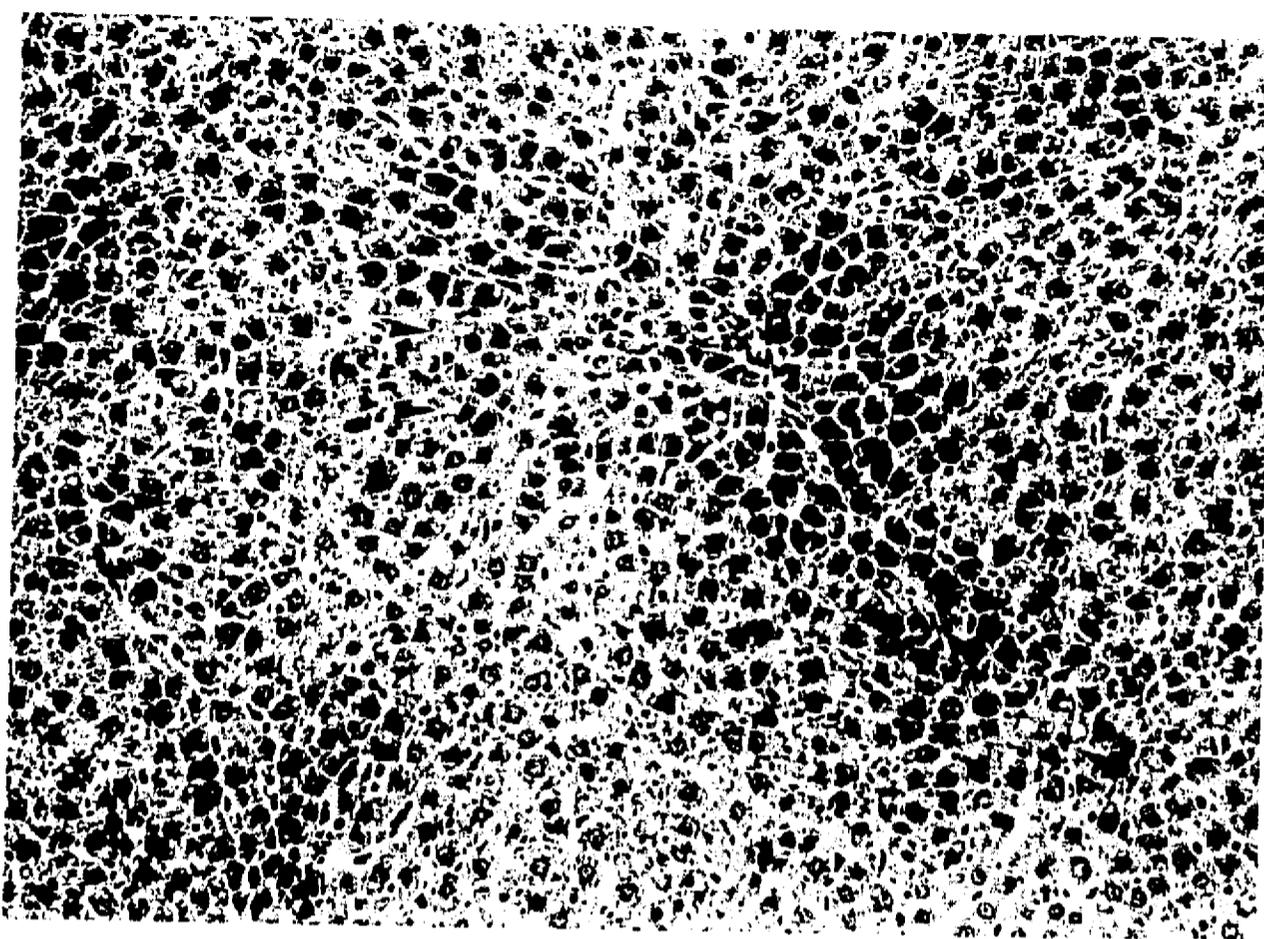


Figura 27 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 5% de manteca de cerdo durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol. Se observa esteatosis univacuolar moderada periportal (▲). 25X..

P= espacio porta

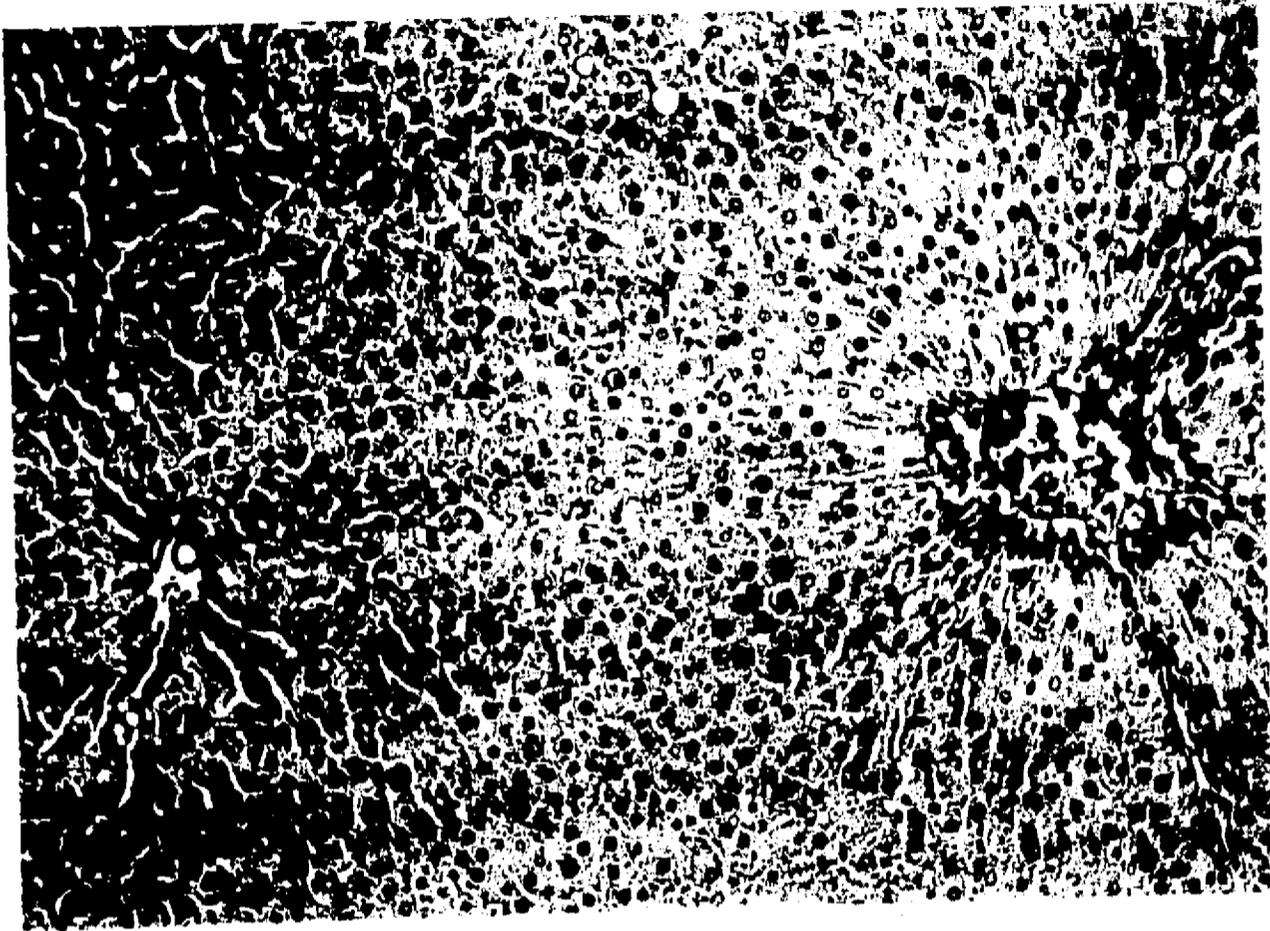


Figura 28 Fotomicrografia de hígado de rata que consumió 15% de manteca de cerdo durante un mes. Se observa esteatosis univacuolar heterogénea moderada (▲). 25X.

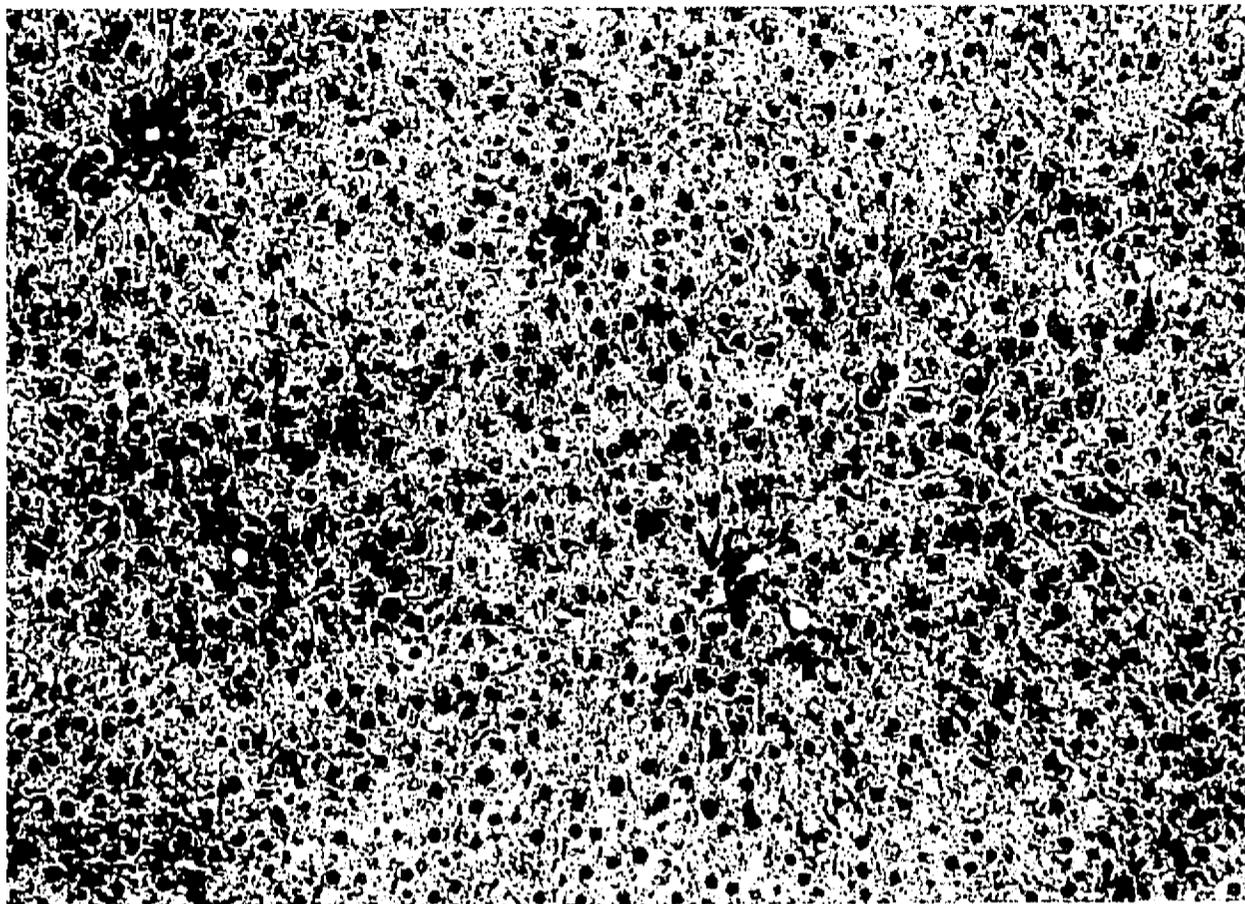
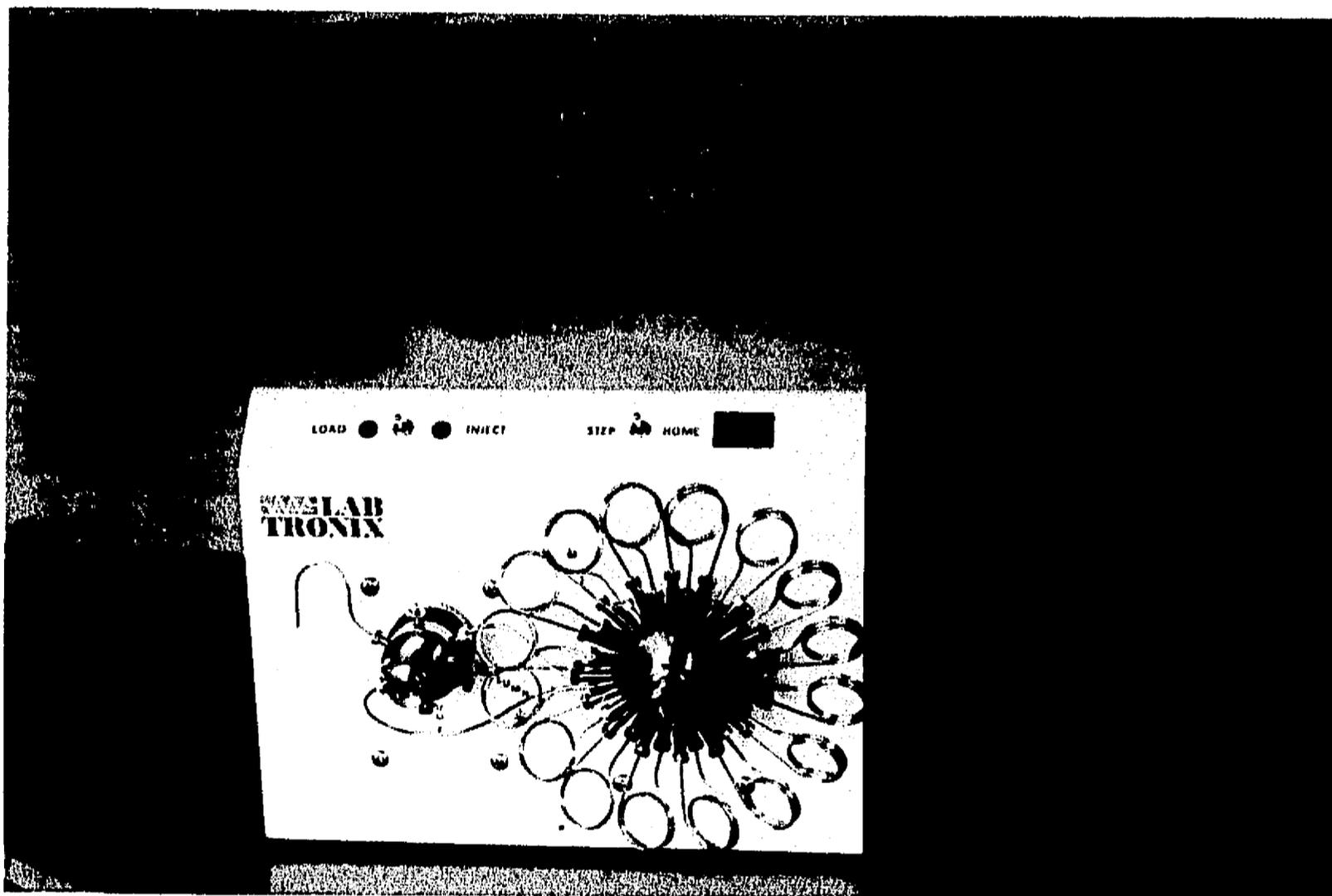


Figura 29 Fotomicrografía de hígado de rata que consumió 15% de manteca de cerdo en la dieta durante un mes y después de 8 horas de una intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol (63%). Se observa esteatosis univacuolar moderada heterogénea (▲). 25X.

VC= vena central

P= espacio porta

Figura 30 Automuestreador para HPLC



4. DISCUSIÓN

El GSHt y el GSH en la sangre.

Se ha reportado (23) un marcado aumento del glutatión total plasmático después de 3h de una intoxicación aguda con etanol. En este trabajo se encontró que después de ocho horas, el GSHt y el GSSG en la sangre del plexo retro-orbital y la de la aorta posterior continúan aumentando.

La disminución de GSH en la sangre encontrada por efecto de la intoxicación aguda con etanol contrasta con lo reportado por Sies, *et al.* (64): "La salida, principalmente sinusoidal, de GSH hepático es estimulada por la vasopresina, la fenilefrina y la adrenalina".

Mills (48) reportó que cada ml de sangre completa contiene alrededor de 800 nmol de GSH. En este trabajo se encontró un valor similar (893 nmoles de GSH/ml de sangre) en la rata que consumió 5% de aceite de maíz. Sin embargo, en la rata que consumió 15% de aceite de maíz el GSH fue de 454 nmoles/ml de sangre; un 50% menos. El exceso en el consumo de aceite de maíz ocasionó que hubiera 50% menos de GSH en la sangre de las ratas control.

En este trabajo se constato mediante HPLC, que la intoxicación aguda con etanol aumentó 788% la cantidad de GSSG y disminuyó 56% el GSH en la sangre de aorta posterior. Speisky, *et al.* (66) reportó 47% mas GSH en sangre de la vena cava post-hepática inferior de la rata intoxicada de manera aguda con etanol. Sin embargo en este trabajo se observó un efecto inverso de la etanolemia aguda en la sangre de aorta posterior ya que se observó que el GSH disminuyó un 56%.

La relacion GSH/ GSSG y el GSSG

La relación GSH/GSSG puede variar entre 5 y 20 in vivo (72). Mediante HPLC, en este trabajo se observó que la relación GSH/GSSG en la sangre de ratas que consumieron 5% de aceite de maíz (13.3 sin etanol s.e. vs 0.9 con etanol c.e.), 15% de aceite de maíz (1.3 s.e. vs 0.1 c.e.), 5% de manteca de cerdo (39.4 s.e vs 13.8 c.e.) ó 15% de manteca de cerdo (26.7 s.e. vs 3.0 c.e.) (Cuadro 11) disminuyó después de 8 h de la intoxicación aguda con

etanol. La oxidación del GSH y del NADPH causa que se libere calcio de la mitocondria y de los compartimientos extramitocondriales (10).

La consecuencia de la acumulación de grasa manifestada como esteatosis multivacuolar en los hepatocitos, ocho horas después de haber sido intoxicadas con etanol de manera aguda, de las ratas que consumieron aceite de maíz en la dieta durante un mes podría repercutir en la disminución del ATP, del potasio, del aminoisobutirato y en la actividad de enzimas citosólicas. Esto, probablemente debido al efecto detergente de los ácidos grasos sobre las membranas (58). Dicha esteatosis podría atribuirse al aumento de la cantidad de GSSG en las ratas que consumieron aceite de maíz.

Según Brigelius *et al.* (12), la cantidad presente de disulfuros mezclados proteicos hepáticos se encuentra en el rango de 20 a 30 nmoles/g de hígado. Sería interesante investigar si estos valores se ven modificados por el consumo de diferentes porcentajes de lípidos en la dieta, ya que en este trabajo se observó 4 veces más GSSG en la sangre de las ratas que consumieron un elevado porcentaje de lípidos en la dieta.

Una posible explicación de la acumulación de grasa en los hepatocitos de las ratas que consumieron aceite de maíz es que aumentó el GSSG en estas ratas. Y, de acuerdo a Nakashima, *et al.* (50) un aumento de GSSG activa a la fructosa 1,6 bisfosfatasa provocando quizá un aumento en la formación de acetyl piruvato de acetyl CoA y quizá de lípidos. La acumulación de lípidos (esteatosis) en la zona alrededor de la zona porta o alrededor de la vena central, en los hígados de las ratas que consumieron 5% ó 15% de aceite de maíz en la dieta se debió probablemente al aumento del GSSG en la sangre.

El GSht en el hígado.

Se cree que la restricción calórica provoca la disminución en la producción de los radicales libres, recomendando para los humanos, 1g de proteína y 0.5g de grasa por cada kilo de peso (74). En este trabajo, la restricción alimenticia de las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz en la dieta, provocó que el GSht del hígado disminuyera, con

respecto a las ratas que consumieron alimento *ad lib.*, sin embargo, tal diferencia no se observó en el GSHt de la sangre.

Las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz en la dieta en un programa de restricción alimenticia, tuvieron un consumo promedio de 1.5 g de aceite/rata/día, un consumo de 132 Kcal/rata/día, y consumieron 12.4 g de alimento al día, en estas ratas hubo una disminución del contenido de GSHt en el hígado de aproximadamente 30% después de 8h de una intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol, esto quizá debido a la activación de la fructosa 1,6 bisfosfatasa, provocando la estimulación de la gluconeogénesis y el aumento de la salida de glucosa del hígado (50).

El GSH en el hígado

El hígado libera GSH principalmente al torrente sanguíneo como parte de un intercambio inter-órganos, manteniendo de esta manera un balance tiol redox en el plasma (4). En este trabajo se observó que el GSH hepático de las ratas que consumieron alimento *ad lib.* disminuyó después de ocho horas de una intoxicación aguda con etanol, sin embargo las ratas que estuvieron bajo un programa de restricción alimenticia, el GSHt se mantuvo por debajo de los niveles de las ratas con alimentación *ad lib.*, no pudiendo observarse el efecto depletor de GSH con la administración aguda de etanol.

Fernández, *et al.* (24) no especificó el tipo de grasa que administró a las ratas al reportar que el efecto de la intoxicación aguda con etanol en la rata ayunada, reveló una disminución significativa en el contenido de GSH hepático (4.1 ± 0.22 μ moles/g de hígado p.h. solución salina vs 2.00 ± 0.15 μ moles de GSH/g de hígado p.h. etanol); en ese trabajo, las ratas recibieron una dieta con 19% de proteína, 41% de grasa y 5% de carbohidratos y las ratas consumieron 310 ± 4 Kcal/Kg/día. Es evidente la importancia de reportar el tipo de lípidos que consumen los animales de laboratorio, pues se observa que los valores reportados por ejemplo por Fernández, *et al.* (24) representan aproximadamente la mitad de los que reportó Halliwell, *et al.* (30).

Las SRATB en el hígado

Hubo una tercera parte de SRATB en los hígados de las ratas que consumieron 5% de aceite de maíz con respecto a las que consumieron 15% en un programa de alimentación *ad lib*, y, en ambos casos, la intoxicación aguda con etanol (5g/Kg) reveló un aumento significativo de las SRATB.

Se observó el doble de acetaldehído y la mitad de etanol en sangre en las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz en un programa de restricción alimenticia comparado con las que consumieron 5% en un programa de alimentación *ad lib*.

MODIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DEL HIGADO POR EL ETANOL.

En 1990 se carecían de evidencias para pensar que los lípidos que se consumen en la dieta determinan el desarrollo de lesiones en el hepatocito (60). Sin embargo en este trabajo se presentan las evidencias de que el consumo de 5% ó de 15% de aceite de maíz provoca esteatosis univacuolar perilobulillar o centrolobulillar, respectivamente; y que después de la intoxicación aguda con etanol hay esteatosis multivacuolar de dichas respectivas áreas del hepatocito. Y que sin embargo, el consumo de aceite de cártamo no reveló esteatosis ni antes ni después del consumo de etanol.

Asimismo, se reportó que el hígado graso era la consecuencia inevitable de la ingestión aguda de etanol (61, 26, 55), y la esteatosis se encuentra principalmente alrededor de la vena central (28). Sin embargo en este trabajo las ratas que consumieron aceite de cártamo, ni las que consumieron manteca de cerdo o sebo de res desarrollaron esteatosis hepática después 8 horas de la intoxicación aguda con etanol. Únicamente las ratas que consumieron aceite de maíz desarrollaron esteatosis perilobulillar o centrolobulillar cuando consumieron 5% ó 15% de dicha fuente de lípidos en un programa de alimentación a libre acceso.

El patrón morfológico de la enfermedad alcohólica aguda ha sido descrito como la acumulación masiva de microvesículas de grasa, el aumento de tamaño del hepatocito y la presencia de pigmento biliar en el citoplasma de los hepatocitos del área perivenular (71).

Sin embargo las microvesículas solamente se observaron en las ratas etanolizadas que habían consumido aceite de maíz, no así en las que consumieron aceite de cártamo, sebo de res o manteca de cerdo.

Las fibrosis específicas de alcoholismo son: pericelular, necrosis hialina esclerótica central y la fibrosis venosa pericentral. Sin embargo la patogénesis y el pronóstico de la lesión del hepatocito no está clara. La cirrosis no es específica de alcoholismo, sin embargo cuando el alcohol induce cirrosis, como primeras lesiones se observa: proliferación miofibroblástica y deposición de colágena alrededor de la vénula hepática conducente a cirrosis hepática; ésta, tiene un patrón micronodular, después de la abstinencia se transforma a macronodular. La cirrosis se caracteriza por fibrosis, formación de nódulos del hepatocito, generalmente con evidencia de regeneración, y distorsión de la arquitectura lobular y vascular. Estos cambios morfológicos del hígado pueden desaparecer cuando el paciente ha dejado de ingerir el alcohol. Por otro lado, los cuerpos de Mallory y la esteatosis pueden permanecer en el hígado cirrosis por muchas semanas. La razón de estas anormalidades aún son desconocidas (26).

Una posible explicación de la permanencia de la esteatosis en tales pacientes, sería que el tipo de grasa consumida en la dieta fuera aceite de maíz.

La cirrosis puede presentarse aún en individuos que tengan una dieta adecuada. Sin embargo, la disminución en el consumo de proteína o la disminución en la absorción de aminoácidos en el hígado pueden potenciar la toxicidad del etanol (45) Por lo general no se detalla en los reportes, en que consiste la "dieta adecuada".

La patogénesis de la oclusión venosa y de la fleboesclerosis en la enfermedad del hígado alcohólico no está clara (46). Sin embargo, se ha propuesto que la formación de lámina basal en la zona acinar 3 se inicia por cambios en el espacio perisinusoidal y que puede contribuir a un mal funcionamiento de la célula hepática (32). En este trabajo, únicamente las ratas que consumieron 15% de aceite de maíz en la dieta en un programa de alimentación a libre acceso desarrollaron esteatosis multivacuolar en el área alrededor de la vena central después de 8 horas de la intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol . Lo cual podría

ser el inicio del cambio en el espacio perisinusoidal mencionado por Horn (32) y que posteriormente se manifestaría como oclusión venosa y fleboesclerosis en la enfermedad del hígado alcohólico.

El exceso en el consumo de grasa aunado a una dieta deficiente en proteína aumenta la lipoperoxidación (62).

CONCLUSIONES

El efecto de la intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol en la rata está influido por el tipo y del porcentaje de lípidos consumidos.

Es necesario que en las publicaciones, el investigador informe sobre la procedencia de la muestra de sangre, del estado de ayuno de los animales, del tipo de grasa incluido en la dieta, del tiempo de consumo de la dieta.

Se puede concluir que la intoxicación aguda (5g/Kg) con etanol, vía O.G. en la rata alimentada con 5% ó 15% de aceite de maíz en la dieta administrada en un programa a libre acceso o restringida (15%) provoca un aumento significativo del GSSG y del GSht en la sangre, y una disminución significativa del GSH.

La intoxicación aguda con etanol provoca esteatosis multivacuolar en el área alrededor de la vena central hepática en las ratas que consumen 15% de aceite de maíz en la dieta que se administró a libre acceso.

El aumento de GSSG en el hígado y en la sangre podría revelar o predisponer a la esteatosis hepática.

En las ratas que consumieron manteca de cerdo o sebo de res no se observó esteatosis provocada por el consumo agudo de etanol, y las ratas control presentaron leve esteatosis difusa heterogénea.

Los hígados de las ratas que consumieron 5% ó 15% de aceite de cártamo no mostraron esteatosis ni antes ni después de la intoxicación con etanol.

Se propone al modelo de las ratas Wistar alimentadas con dietas semi-purificadas en las que se incluya 15% de aceite de maíz para probar fármacos u otras sustancias, que puedan atenuar la esteatosis hepática. provocada por el etanol.

5. REFERENCIAS

1. Adamo, S.; Sliprandi, N.; Di Lisa, F.; Carrara, M.; Azzurro, M.; Sartori, G.; Vita, G. and Ghidini, O.; Effect of L-carnitine on ethanol and acetate plasma levels after oral administration of ethanol in humans. *Alcoholism Clin. and Exp. Res.* 12 (5): 653-654 (1988).
2. Ahotupa, M.; Bereziat, J. C.; Mantyla, E. and Bartsch, H.; Dietary fat- and phenobarbital induced alterations in hepatic antioxidant functions in mice. *Carcinogenesis*, 14:1225-1228 (1993).
3. Akerboom, T. P. and Sies, H.: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymology*, 77:373-382 (1981).
4. Akerboom, T. P. and Sies, H.: Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol.*, 173: 523-534 (1989).
5. Andreoli, P. S.; Mallett, C. P. and Bergstein, J. M.: Role of Glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury. *J. Lab. Clin.*, 108:190-198 (1983).
6. Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardó, F. V.; García de la Asunción, J.; Estrela, J. M. and Vina, J.: A High performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* 217:323-338 (1994).
7. Baldwin, S. and Parker, R. S.: The effects of dietary fat and selenium on development of preneoplastic lesions in rat liver. *Nutr. Cancer*, 8:22-282 (1986).
8. Baraona, E.; Leo, M. A.; Borowsky, S. A. and Lieber, C. S.: Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in the liver. *Sci.*, 190:794-795 (1975).
9. Behrens, B. J.; Hoerner, M.; Lasker, J. M. and Lieber, C. S.: Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P450 IE in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154:584-590 (1988).

10. Bellomo, G.; Jewell, S.A. and Orrenius, S.: The metabolism of menadione impairs the ability of rat liver mitochondria to take up and retain calcium. *J. Biol. Chem.* 257:11558-11562 (1982).
11. Bourre, J. M.; Bonnell, M.; Dumont, O.; Piciott, M.; Calaf, R.; Portugal, H.; Nalbone, G. and Lafont, H.; Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain and liver fatty composition. *Biochem. Biophys. Acta*, 1043; 149-152 (1990).
12. Brigelius, R.; Muckel, C.; Akerboom, T.P.M. and Sies, H.: Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfides. 32: 2529-2534 (1983).
13. Cederblad, G.: Effect of diet on plasma carnitine levels and urinary carnitine excretion in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 145: 725-729 (1980).
14. Comporti, M. and Benedetti, A.; Biology of Disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Inv.*, 53:599-623 (1985).
15. Costagliola, C.: Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients: In vivo and in vitro study. *Clin. Physiol, Biochem.*, 8:204-210. (1985).
16. Chang, M.; Bueges, J. R.; Schols, R. W. and Channa, R. C.: The induction of specific rat liver glutathione S-transferase subunits under Inadequate Selenium nutrition Causes an increase in Prostaglandin F2 Formation. *The J. of Biol. Chem.*
17. Consejo Nacional Alcoholico: Programa contra alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas. Acciones específicas. Secretaría de Salud, México 1987, pp 40, 212, 159.
18. Demoz, A.; Willumsen, N. and Berge, R. K.: Eicosapentanoic acid at hypotrygliceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defence en mice. *Lipids*, 27: 968-971 (1992).
19. Donohue, T.M. Jr; Tuma, D. J. and Sorrell, M. F.: Acetaldehyde adducts with proteins: binding of (14 C) acetaldehyde to serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 220: 239-246 (1983).

20. Eddy, D. E. and Harman, D.: Rat brain fatty acid composition: effect of dietary fat and age. *J. Geronto.* 30 (6) 647-654 (1975).
21. Ernest, M. J. and Kim, K. H. (1973) Regulation of rat liver glucogen synthetase: reversible inactivation of glycogen synthetase by sulphhydryl/disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 248:1550-1555. en: Ondarza, R.N.: Enzyme regulation by biological disulfides. *Biosci. Rep.*, 9:593:604 (1989).
22. Fariss, M.W. and Reed, D.J.: High-perfonmance liquid chromatography of thiols and disulfides dinitrophenol derivatives. *Meth. in Enzimol.* 143:101-109 (1987).
23. Fernández, V.; Fernández, N.; Valenzuela, A. and Videla, L. A.: Time course study of the changes in blood glutathione induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Experientia.* 39:880-882 (1983).
24. Fernández, V. and Videla, I. A.: Effect of acute and chronic ethanol ingestion on the control of reduced glutathione of various tissues of the rat. *Experientia* 37:392-394 (1981).
25. Fink, R.; Clemens, M.R.; Marjot, D. H.; Patsalos, P.; Cawood, P.; Norden A. G.; Iversen, S. A. and Dormandy, T.L.: Increased free-radical activity in alcoholics. *Lancet*, 2:291-294 (1985).
26. Fleming, K. R. and McGee, J.O. D.: Review article. Alcohol induced liver disease. *J. Clin. Pathol.* 37:721-733 (1984).
27. Gilbert, H. F.: Biological disulfides: The third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J. Biol Chem.* 257:12086-12091 (1982).
28. Hall, P.: Pathology and pathogenesis of alcoholic liver disease. Hall P. ed. Edward Arnold. London 1985, Chap. 2.
29. Halladay, P.K.; Hunt, N. H.; Butcher, G. A. and Cowden, W. B.: Antimalarial action of flavin analogues seems not be due to inhibition of glutathione reductase of host erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*, 39:1063-1065 (1990).

30. Halliwell, B.: Oxidants and human disease: some new concepts, *FASEB J.*, 1:358-364 (1987).
31. Harman, D.; Heidricks, M.L.; Eddy, D. E. and Serbold, J.: Free radical theory of aging: effect of dietary fat on central nervous system function. *J. Am. Geriatr. Soc.* 24 (7) 301-307 (1976).
32. Horn, T.; Junge, J. and Christoffersen, P.: Early alcoholic liver injury: change of the Disse space in acinar zone. *Liver.* 5:301-310 (1985).
33. Huang, C.J. and Fwu, M. L. Protein insufficiency aggravates the enhanced lipid peroxidation and reduced activities of antioxidative enzyme in rats fed diets high in polyunsaturated fat. *J. Nutr.*, 122: 1182-1189 (1992).
34. Kato, S.; Alderman, J. and Lieber, C. S.: In Vivo Role of the microsoma ethanol metabolism in deermice lacking alcohol deshydrogenase. *Bioch. Pharmacol.*, 37:2706-2708 (1988).
35. Kautiainen, A.; Torqvist, M.; Andestam, B. and Vaca, C. E.: In vivo hemoglobin dosimetry of malondialdehyde and ethene in mice after induction of lipid peroxidation. Effects of membrane lipid fatty acid composition. *Carcinogenesis*, 12:109-1102 (1991).
36. Kosower, N.S.: The glutathione status of cells. *Intern. Rev. Cytol. Academic. Press, inc.* 54:109-153 (1978).
37. Kuratko, C. and Pence, BC.: Rat colonic antioxidant status: interaction of dietary fats with 1,2 dimethylhydrazine challenge. *J. Nutr.* 122:278-282 (1992).
38. Lane, B. P. and Lieber, C. S.: Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am. J. Pathol.*, 49:593-603 (1966).
39. Lappenna, D.; Del Boccio, G.; Porreca, E.; Pennelli, A.; Mezzetti, A.; De Gioia, S.; Marzio, L.; Di Ilio, C. and Cuccurrullo, F.: Effects of high fat-, cholesterol-enriched diet on the antioxidant defence mechanism in the rabbit heart. *Free Radic. Res. Commun.* 17:87-96, (1992).

40. Lehninger, A. L.: Principles of Biochemistry. Worth Publishers Inc. New York, N. Y., 1982.
41. Lieber, C. S.: Alcohol, protein metabolism, and liver injury. *Gastroenterology*, 79:373-390 (1980).
42. Lieber, C. S.: Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update, *Alcohol., Clin. Exp. Res.*, 15:573-592 (1991).
43. Lieber, C. S.; Lasker, J. M.; DeCarli, L. M.: in induction of hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247:791-795 (1988).
44. Lin, R. C.; Smith, R. S. and; Saeli, J. and Wojtowicz, T.: Role of acetone, dietary fat and total energy intake Lumang, L.: Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically. *J. Clin. Invest.*, 81:615-619 (1988).
45. Lisansky, E. S. The psychological effects of alcohol en: Raymond G. McCathy Alcohol education for classroom and community. New York; Mc Graw Hill pp. 104-121, 1964.
46. Mac Sween R.N.M.: Alcoholic liver disease. In: MacSween, R.N.M. Anthony P. P., Scheuer P. J. eds. Pathology of the liver. Edinburgh Churchill Livingstone. pp. 193-212 (1979).
47. Matsuda, Y.; Takada, A.; Sato, H.; Yasuhara, M. and Takase, S.: Comparison between ballooned hepatocytes occurring in human alcoholic and nonalcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 9:366-370 (1985).
48. Mills, B.J.; Richie, J.P. and Lang, C.A.: Anal. Biochem., 184:263 (1990) en: Fluorometric determination of oxidized and reduced glutathione in cells and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride. *J. Chromatography*, 58:219-225 (1991).
49. Nakano, M.; Wornwr, T.M. and Lieber, C.S.: Perivenular fibrosis in alcoholic liver injury: Ultrastructure and histologic progression. *Gastroenterology*, 83:777-785 (1982).

50. Nakashima, K., Pontremoli, S. and Horecker, B. L.: Activation of rabbit liver fructose diphosphatase by Coenzyme A and acyl carrier protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 64:947-951 (1983).
51. Nanji, A. A. and French, S. W.: Effect of different dietary fats on ethanol metabolism implications for pathogenesis of experimental alcoholic liver disease. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 58:475-476 (1988).
52. Nomura, F. and Lieber, C. S.: Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes: enhancement after chronic alcohol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100:131-137 (1981).
53. Nutrient Requirements of Laboratory Animal. National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1986.
54. Orrenius, S.; Burkitt, M.J.; Kass, G.E.N.; Dypburld, J. M. and Nicotera, P.: Calcium loss and oxidative cell injury. *Ann. Neurol.* 32:S22-S42 (1992).
55. Pimstein, N. P. and French, S. W.: Alcoholic liver disease. *Med. Clin. North. Am.*, 68: 39 (1984).
56. Reinke, L. A.; Lai, E. K.; DuBose, C. M. an McCay, P. B.: Reactive Free Radical Generation in Vivo in Heart and Liver of Ethanol-Fed Rats: Correlation with Radical Formation in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (84): 9223-9227 (1987).
57. Reed, D.J. and Beatty, P. W.: Biosynthesis and regulation og glutathione: Toxicological implications. Hodgson, J.R. and R.M. in *Reviews in Biochemical Toxicology*, Vol 2:213-241 (1980).
58. Rodbell, M.: The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J. Biol. Chem.*, 241:3909-3917 (1966).
59. Rose, O. P.; Hatale, M. A.; Connolly, J. M.; Rayburn, J.: Effect of diet containing different levels of linoleic acid on human brest cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res.* 53:4686-4690, (1993).
60. Rubin, E. y Farber, J. L.: *Patología*. Editorial Médica Panamericana. 1990.

61. Rubin, E. and Lieber, C.S.: Alcohol-induced hepatic injury in nonalcoholic volunteers. *N. Engl. J. Med.*, 278:869-876 (1968).
62. Sambuichi, E. J. ; A.; Kido, Y.; Shizuka, F. and Kishi, K.: Protein deficiency and excess lipid synergistically augmented lipid peroxidation in growing rats. *Tokushima Exp. Med.*, 39:81-87 (1992).
63. Schimmel, R. J.; Elliott, M. E. and Dehmel, V.C.: Interactions between adenosin and alfa 1-adrenergic agonists of regulation of respiration in hamster brown adipocytes. *Mol. Pharmacol.*, 32:26-33 (1987).
64. Sies, H. and Graf, P: Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenyleprine and adrenaline. *Biochem. J.*, 226:545-549 (1985).
65. Snedecor, G.W. and Cochram, W.G.: *Statistical Methods*. Seventh Edition. Iowa State University, Ames, Iowa (1967).
66. Speisky, H.; MacDonald, A.; Giles, G.; Orrego, H., and Israel, Y.: Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies. *Biochem. J.*, 225:565-572 (1982).
67. Speisky, H.; Bunout, D.; Orrego, H.; Giles, H. G.; Gunasekara, A. and Israel, Y.: Lack of changes in diene conjugate levels following ethanol induced glutathione depletion on hepatic necrosis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 48:77-90 (1985).
68. Stevens, V.J.; Fantl, W.J.; Newman, C.B.; Sims, R.V.; Cerami, A. and Peterson, C. M.: Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J. Clin. Invest.*, 67:361-369 (1981).
69. Teschke, R.; Hasumura, Y.; Joly, J. G.; Ishil, H. and Lieber, S. W.: Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): Purification and properties of a rat liver system free of catalase and alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49: 1187-1193 (1972).
70. Tsai, A. C.: Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in the liver of cholesterol-fed rats. *J. Nutr.*, 105:946-951, (1975).

71. Uchida, T.; Kao, H.; Quispe-Sjogren and Peters, RL. Alcoholic foamy degeneration - a pattern of acute alcoholic injury of the liver. *Gastroenterology*, 84:683-692 (1983).
72. Videla, L. A.; Fernández, V.; Ugarte, G. and Valenzuela, A.: Effect of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. *FEBS LETTERS.*, 111:6-10 (1980).
73. Videla, L.A. and Valenzuela, A.: Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelation and pathological implications. *Life Sci.*, 31:2395-2407 (1982).
74. Weindruch, R.: Caloric restriction and aging. *Sci. Am.*, 274:46-52 (1996)
75. Yang, E.K.; Radominska, A. ; Winder, B.S. and Dannenberg, A.J.: Dietary lipids coinduce xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1168:52-58 (1993).
76. Zentella de Piña, M.; Rocha, H. A. E. and Díaz, B. A.: Blood glutathione status in alcoholic liver disease, *Biochem. of Disease*, Congress Center, Nagoya, Japan (1992).
77. Zentella de Piña, M.; Yolanda Saldaña-Balmori; Aida Hernández-Tobías, and Enrique Piña: Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17(6):1228-1232 (1993).
78. Zeruoga, M.; Beauge, F.; Niel, E.; Durand, G. and Bourre, J. M.: Interactive effects of Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and chronic ethanol intoxication on synaptic membrane lipid composition and fluidity in rats. *Biochimica et Biophysica Acta*.1086:292-304 (1991).
79. Ziegler, D. M.: Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 54:305-329 (1985).