



10
2e.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

Estudio de la toxicidad hepática de los compuestos 3,5-Dietoxicarbonil-4-[3,5-bis(1-piperidinilmetil)-4-hidroxifenil]-2,6-dimetil 1,4dihidropiridina. y del 4-[1-(4-Hidroxifenil)-1-metil]etil]-2,6-bis(1-piperidinilmetil)fenol.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ALEJANDRO CABRAL GALLARDO

ASESORES:

M. EN C. LUISA MARTINEZ AGUILAR
M. EN C. LILIANA FAVARI PEROZZI
M. EN C. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR U. N. A. M.
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Reglamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio de la toxicidad hepática de los compuestos 1,5-Dinitrocarbonil
-4-[5-bis(1-piperidinil)metil]etilhidroxifenil]-2,6-dimetil-1,4-dihidro-
piridina y del 4-[5-(4-hidroxifenil)etil]etil]-2,6-bis(1-piperidinil)metil-
fenil

que presenta al pasante: Cabral Gallardo Alejandro
con número de cuentas: 0156007-5 para obtener el TÍTULO de:
Diploma Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Enero de 1997

| | | |
|------------------|---|-------------------------|
| PRESIDENTE | <u>O.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez</u> | <u>Leticia Zúñiga R</u> |
| VOCAL | <u>M.en C. Luisa Martínez Aguilar</u> | <u>L. M. A.</u> |
| SECRETARIO | <u>O.F.R. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u> | <u>E. Posada</u> |
| PRIMER SUPLENTE | <u>O.F.R. Ma. Esther Revuelta Miranda</u> | <u>E. Miranda</u> |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>O.B.P. Ma. Elena Mondragón Esquivel</u> | <u>E. Mondragón</u> |

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres: SAMUEL CABRAL S. y YOLANADA GALLARDO C.
Por todo el apoyo, la confianza y la comprensión
que me brindaron durante todo este tiempo.

A la M. en C. Liliana Favari a Tere, Toño y al CINVESTAV.
Por el apoyo prestado y las facilidades
para la realización de este trabajo.

**A las profesoras: Luisa Martínez, Leticia Zuñiga, Ma. Eugenia R. Posada,
Ma. Esther Revueltas, y Ma. Elena Mondragon**
Por su ayuda y consejos los cuales fueron de gran utilidad
en la elaboración de este trabajo.

A todas las persona de la FES C. con las cuales convivi.
Por que de una u otra manera me ayudaron a superar
ya sea como estudiante o como ser humano

ÍNDICE GENERAL.

Resumen.

1.- Introducción.

2.- Objetivo.

3.- Antecedentes.

3.1.-Farmacología.

3.1.1.-Clasificación.

3.1.2.-Mecanismo de acción.

3.1.3.-Uso clínico.

3.2.-ANTI AVI y ANTI AVIII.

3.2.1.-Síntesis

3.2.2.-Estructura del ANTI AVI.

3.2.3.-Estructura del ANTI AVIII.

3.3.-Pruebas toxicológicas.

3.3.1.-Pruebas de toxicidad aguda.

3.3.2.-Pruebas de toxicidad subcrónica.

3.4.-Funcionamiento hepático.

3.4.1.-Susceptibilidad del hígado.

3.5.-Hepatopatías tóxicas.**3.5.1.-Fármacos con cuadro de hepatitis viral****3.5.2.-Hepatitis tóxica colestiatica.****3.5.3.-Tumores hepáticos.****3.6.-Marcadores de daño hepático.****3.6.1.-Fosfatasa alcalina (F.A.)****3.6.2.-Transaminasa glutámico pirúvica. (TGP)****3.6.3.-Gama-glutamil transpeptidasa.(G-GT)****3.6.4.-Proteínas.****3.6.5.-Lipoperoxidación.****3.6.6.-Bilirrubinas.****3.6.7.-Glucógeno.****3.6.8.-Colágena.****4.- Material y métodos.****4.1.-Material biológico****4.2.-Material y equipo.****4.3.-Soluciones y reactivos.**

4.4.-Metodología.**4.4.1.-Prueba de toxicidad aguda.****4.4.2.-Prueba de toxicidad subcronica.****4.5.-Determinaciones bioquímicas.****4.5.1.-Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina.****4.5.2.-Determinación de la actividad de la transaminasa glutámica pirúvica.****4.5.3.-Determinación de la actividad de la gama-glutamil transpeptidasa.****4.5.4.-Determinación de glucógeno.****4.5.5.-Método de lipoperoxidación colorimetrico.****4.5.6.-Determinación de proteínas.****4.5.7.-Determinación de colágena.****4.5.8.-Determinación de bilirrubinas.****5.- Resultados.****6.- Análisis de resultados.****7.- Conclusiones.****8.- Bibliografía.**

RESUMEN.

En este trabajo se estudió la toxicología de dos compuestos conocidos como ANTI AVI y ANTI AVIII, los cuales fueron sintetizados en la Sección de Química Orgánica en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Estos compuestos son derivados piperidinil fenólicos y en estudios anteriores se ha determinado que presentan una actividad antiarrítmica.

Como una parte de los estudios toxicológicos que se realizaron a estos compuestos fue la determinación la toxicidad hepática aguda a las 24hrs y en forma subcrónica a los 7 días y a los 60 días en rata macho cepa Wistar, ocupando machos de peso promedio de 250g. La toxicidad se determinó por medio de pruebas bioquímicas que sirven como marcadores de daño hepático siendo: fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico piruvica, gama-glutamil traspeptidasa, proteínas, lipoperoxidación, bilirrubina directa, bilirrubina total, glucógeno y colágena.

Los marcadores que se alteraron para el compuesto ANTI AVI fueron; la bilirrubina total y la bilirrubina directa para el tratamiento de 24hrs; la bilirrubina total para el tratamiento de 7 días y la alteración de proteínas, de la lipoperoxidación, de la bilirrubina total y de la colágena para el tratamiento de 60 días.

Para el compuesto ANTI AVIII se alteraron la bilirrubina total y la bilirrubina directa para el tratamiento de 24hrs., la bilirrubina directa para el tratamiento de 7 días y la bilirrubina total y el glucógeno para el tratamiento de 60 días.

De acuerdo a los resultados se concluye que el compuesto ANTI AVI es hepatotóxico, por haber alterado marcadores hepáticos como bilirrubina directa, bilirrubina total, proteínas, lipoperoxidación, y colágena; mientras que el compuesto ANTI AVIII sólo altera la bilirrubina directa, la bilirrubina total y el glucógeno.

1.-INTRODUCCIÓN

Reportes de la Organización Mundial de la Salud indican que una de las principales causas de muerte en la actualidad es atribuida a las enfermedades cardiovasculares, las cuales comprenden las perturbaciones del corazón como hipertensión arterial y arritmias cardíacas. Los desórdenes del ritmo cardíaco, generalmente son causados por diversas enfermedades y por el uso de ciertos fármacos. Las arritmias cardíacas son el resultado de la deformación del impulso eléctrico y perturbaciones en la conducción del impulso a través del miocardio o por una combinación de ambos. Los fármacos utilizados para restablecer o modificar el ritmo cardíaco anormal, son los agentes antiarrítmicos. La acción de estos es modificar directa o indirectamente el flujo transmembranal de iones^{1,2}.

Dentro de los estudios realizados en la sección de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, destaca la investigación de los compuestos 2,6-Bis(1-piperidilmetil)fenólicos. Algunos de estos compuestos han mostrado tener efecto antiarrítmico en el modelo de isquemia y reperfusión miocárdica en rata. En estos compuestos se observó que a dosis de 3.1mg/kg. protegen las diferentes arritmias cardíacas obtenidas por la reperfusión.

Se a decidido por ello estudiar a estos compuestos en relación a su toxicología. Por esto el objetivo de nuestro trabajo fue determinar la toxicidad hepática aguda y subcronica de los dos compuestos llamados 3,5-Dietoxicarbonil-4-{3,5bis(1piperidinilmetil)4hidroxifenil}2,6dimetil1,4dihidripiridina (ANTIAVI) y del 4-{{1--(4-hidroxifenil)-1-metil}etil}-2,6-bis(1-piperidinilmetil)fenol). (ANTIAVIII) utilizando los marcadores hepáticos como son fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico pirúvica, gamma-glutamil traspeptidasa, glucógeno, lipoperoxidación, proteínas, colágena, bilirrubina directa y bilirrubina total.

2.-OBJETIVO:

- Determinar la toxicidad hepática aguda y subcrónica de los compuestos llamados 3,5-Dietoxicarbonil-4-{3,5-bis(-piperidinilmetil)4hidroxifenil}2,6dimetil1,4dihidropiridina. (ANTI AV I) y del 4-{{1-(4-Hidroxifenil)1--metil}etil}-2,6 bis(1-piperidinilmetil)fenol. (ANTI AVIII) utilizando marcadores hepáticos como son: Fosfatas alcalina, transaminasa glutámico pirúvica, gamma-glutamil transpeptidasa, glucógeno, lipoperoxidación, proteínas, colágena, bilirrubina directa y bilirrubina total.

3.-ANTECEDENTES.

3.1.-FARMACOLOGÍA.

Los fármacos utilizados para restablecer o modificar el ritmo cardíaco anormal son los agentes antiarrítmicos. La acción de estos es la modificación directa o indirecta de las moléculas que controlan el flujo transmembranal de iones.²

Los principales fármacos antiarrítmicos de utilidad clínica establecida desde hace largo tiempo son: quinidina y procainamida, además de los glucósidos digitalicos. Son adiciones más recientes al grupo de antiarrítmicos lidocaína, fenitoína y propanolol. Algunos otros agentes se hallan en etapa de investigación.²¹

3.1.1.-CLASIFICACIÓN.

Los fármacos antiarrítmicos se clasifican en 4 clases:

Clase I.- Los bloqueadores de los canales de sodio el cual se divide en 3 subclases.

Ia.- Estos actúan con una marcada depresión de la fase 0, efecto moderado sobre la conducción y repolarización prolongada como ej. disopirimida (Norpase).

Ib.- Con una mínima depresión de fase 0, efecto insignificante sobre la conducción y repolarización acortada por ej. lidocaína (Xilocaina) y tocainida (Tonocard).

Ic.- Marcada depresión de la fase 0, marcado efecto sobre la conducción y efecto acortado sobre la repolarización ej. flecainida (Tambocor).

Clase II.- Bloqueadores B-adrenérgicos ej. acebutolol (Sectral), propanolol (Inderal)

Clase III.- Fármacos con repolarización prolongada y acortamiento del efecto sobre la conducción ej. bretilium (Bretiliol).

Clase IV.- Bloqueadores del canal de calcio ej. verapamil (Calan, Isoptil)¹³.

3.1.2.-MECANISMO DE ACCIÓN.

Consiste en la supresión selectiva del automatismo en sitios ectópicos al disminuir la rapidez de la despolarización de la fase 4, al aumentar el potencial umbral, o por combinación de ambas acciones dicho de otra manera bloquean la conducción de impulsos anormales por la deficiente conducción eléctrica en el músculo ventricular y el tejido conductor.^{21, 22, 23.}

3.1.3.-USO CLÍNICO:

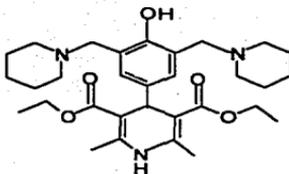
Son fármacos utilizados para restablecer o modificar el ritmo cardíaco anormal, siendo utilizados en la taquicardia supraventricular paroxística, el aleteo auricular, la fibrilación auricular, las respuestas ventriculares prematuras y anulación de la actividad de marcapaso ectópico.¹¹

3.2.-ANTI AVI y ANTI AVIII.

3.2.1.-SÍNTESIS.

Para los compuestos de los derivados piperidinil fenólicos se realizó de la manera siguiente: Para los compuestos monosustituídos, se mezclará una proporción molar 1:1:1 de piperidina, formaldeído y el correspondiente fenol. Para los disustituídos la relación molar será 2:2:1. La mezcla de reacción se disolverá en etanol y se someterá a reflujo. El avance de la reacción se evaluará por cromatografía de capa fina. Para la síntesis de 3,5-Dietoxicarbonil-4-[3,5-bis(1-piperidinilmetil)-4-hidroxifenil]-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina. Previamente se realizará la síntesis de 3,5-dietoxicarbonil-4-(4-hidroxifenil)-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina, la cual será utilizada como materia prima fenólica. Al término de la reacción, se procederá a purificar los productos de reacción mediante métodos de purificación comunes como cromatografía en columna, destilación simple, destilación fraccionada y recristalización. Los compuestos purificados se identificarán por métodos espectroscópicos como RMN-¹H, RMN-¹³C, espectrometría de masas, IR y en los casos necesarios por difracción de rayos. En la figura 1 se muestra las estructuras desarrolladas de los compuestos ANTI AVI y ANTI AVIII.

Estructura del ANTI AVI.



Estructura de ANTI AVIII.

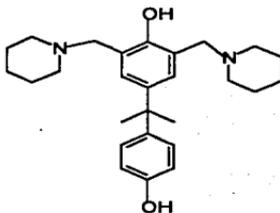


Fig. 1- Estructuras desarrolladas de los compuestos ANTI AVI y ANTI AVIII a los que se les determino la toxicología aguda y subcrónica.

3.3.-PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.

Ningún fármaco carece de efectos tóxicos. Algunos efectos perjudiciales de un fármaco durante el tratamiento a veces son triviales, pero pueden ser graves, incluso mortales. Algunos aparecen rápidamente y otros sólo después de larga administración o incluso los que ocurren sólo en algunos pacientes. Por lo tanto, la toxicidad medicamentosa es un aspecto crítico de la terapéutica moderna. Es necesario elaborar metodologías con animales de experimentación métodos que permitan predecir con precisión los efectos nocivos potenciales de los medicamentos en el ser humano.²¹

3.3.1.-PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA.

En investigaciones farmacobiológicas se presentan frecuentemente ensayos de tipo cuantál, es decir donde hay una respuesta del todo o nada ejemplo de esto es la determinación de la dosis letal media (DL 50) o pruebas de toxicidad aguda las cuales están caracterizadas por una única toma del medicamento o de dosis múltiples administradas en 24 horas. Esta prueba se realiza con lotes de animales que cumplan características similares de sexo, peso, raza, que no hayan sido sometidos a otro tipo de estudio o tratados anteriormente y que sean en número suficiente para un tratamiento estadístico.^{21,24}

La causa de la muerte involucra por lo general al sistema nervioso, cardiovascular, o respiratorio, la afección de órganos como el hígado o el riñón algunas veces son enmascarados y sólo se detectan con determinaciones de laboratorio (pruebas de funcionamiento hepático, renal, química clínica etc.)^{25, 26}

3.3.2.-PRUEBAS DE TOXICIDAD SUBCRONICA

Las pruebas de toxicidad subcrónica se basan en la administración repetida del compuesto dentro de un período relativamente corto comparado con lo que dura la vida del organismo receptor. Estos estudios se realizan para determinar efectos cuantitativos o cualitativos que pudieran pasar inadvertidos después de una prueba de toxicidad aguda; para dar pauta a los planes clínicos probables de dosis múltiples y para estimar la toxicidad de las primeras dosis del fármaco administrado al hombre.^{26, 27}

En este estudio se utilizan animales de experimentación de forma similar al estudio de toxicidad aguda; con animales del mismo peso, raza, sexo, edad, que no tengan algún tratamiento previo, que sean en número suficiente para un tratamiento estadístico y como regla general se debe incluir grupos controles en número suficiente, a los cuales se les administra sólo el vehículo de dosificación o tratamiento simulado. Una vez concluido el tiempo de administración subcrónica se realizan las pruebas necesarias para la evaluación toxicológica que convenga.²⁷

Aunque las pruebas de toxicidad aguda y subcrónica tienen un valor limitado para pronosticar efectos tóxicos crónicos, los resultados que se obtienen nos dan la pauta para investigar los efectos toxicológicos de algunos compuestos compuestos.²⁷

3.4.-FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO.

El hígado es el órgano donde se desarrollan más de 500 actividades metabólicas que incluyen categorías tan amplias como: metabolismo intermedio de carbohidratos, proteínas y lípidos; síntesis de proteínas del tipo de fibrinógeno, albúmina, protombina y muchas enzimas; conjugación de bilirrubina con glucurónico; desintoxicación y eliminación de materias extrañas, bacterias, fármacos y otras sustancias nocivas; almacenamiento de proteínas, glucógeno, vitaminas, y minerales. Por esto ciertas sustancias de origen mineral y vegetal son capaces de producir lesión hepática en el hombre y en el animal de experimentación¹⁰.

3.4.1.-SUSCEPTIBILIDAD DEL HÍGADO.

El hígado es uno de los órganos más frecuentemente lesionados de la economía, y es una verdadera fortuna que su reserva funcional sea enorme. Se ha comprobado en el animal de laboratorio que se necesita únicamente 10% del parénquima hepático para mantener la función normal del hígado⁹.

Ante estímulos que requieran una función más activa el hígado experimenta aumento en el número de sus células parenquimatosas (hiperplasia) o aumento en el volumen (hipertrofia). Al ser el hígado el órgano donde, preferentemente, se desarrollan las reacciones metabólicas, es lógico pensar que ante estímulos de los tóxicos responda con unas reacciones que, en ocasiones significa daño grave para el órgano. Por ello el hígado es el órgano que normalmente sirve de indicador de alteraciones metabólicas inducidas por tóxicos.⁸

3.5.-HEPATOPATIAS TÓXICAS.

Los efectos secundarios indeseables de los productos terapéuticos han pasado a ser un problema importante por lo tanto se han hecho esfuerzos por clasificar a las drogas de la siguiente manera: 1).- Las que provocan lesión en la mayor parte de los organismos (hepatotoxinas directas). 2).- Las que provocan lesión solo en individuos ocasionales (hepatotoxinas indirectas y 3).- Los que tienen poca toxicidad directa, pero pueden provocar lesión por hipersensibilidad o idiosincrasia (alergeno hepático). Al no actuar igual las drogas en todos los pacientes se dividen en grupos morfológicos como sigue:

- 1.- Las drogas que sólo provocan colestasis. Estas incluyen esteroides anabólicos, metiltestosterona, clorpromacina y algunos de los anticoncepcionales por vía oral.⁸
- 2.- Las que provocan colestasis y necrosis incluyen sulfamídicos, algunos antibióticos (tetraciclina), tiouracilo, cincófono, tolbutamida, mercaptopurina, y en ocasiones compuestos fenólicos como clorpromacina.⁸
- 3.- Las que provocan principalmente necrosis que puede ser focal o masiva. Se incluye halotano, isoniacida, ácido paraaminosalicílico, fenilbutazona, uretano y 6-mercaptopurina.⁸

3.5.1.-FÁRMACOS CON CUADRO DE HEPATITIS VIRAL.

La aparición de la hepatitis viral está en relación con fenómenos de hipersensibilidad. Aunque su incidencia es escasa cuenta con una mortandad de un 20%, las lesiones morfológicas son idénticas a las de una hepatitis vírica. Este tipo de lesión se relaciona con el uso de cincófono, cloroformo, inhibidores de la mono-amino-oxidasa (IMAO), iproniazida, feniprazida, e isocarboxácido, hidracidas del ácido isonicotínico (INH) y la rifampicina y en número muy reducido el halothane.⁸

3.5.2.-HEPATITIS TÓXICA COLESTIÁTICA.

Este tipo de ictericia se vincula con la ingestión de fenotiacinas, se relaciona también con fenómenos de hipersensibilidad individual. Se manifiesta clínicamente de la primera a la tercera semana de haber tomado el medicamento. La ictericia es discreta aunque algunas veces puede ser intensa y simular ictericia obstructiva extrahepática.⁸

Otros medicamentos que pueden ocasionar una colestasis son: promazina, procloperazina, pecazina, trifluperazina, PAS, etionamida, cicloserina, tolbutamida y el estolato de eritromicina.⁸

3.5.3.-TUMORES HEPÁTICOS.

Se han descrito tumores benignos y malignos, adenoma, hamartoma y carcinoma hepatocelular, relacionados con la administración prolongada de anovulatorios y de anabolizantes. Con frecuencia la manifestación clínica es un hemoperitoneo agudo espontáneo por rotura de tumor, en relación con la presencia de dilataciones vasculares en su interior (peliosis hepática).⁸

3.6.-MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO

Cuando un tóxico comienza a llegar en pequeñas dosis, el hígado va incrementando su capacidad metabolizante por respuesta del retículo endoplásmico liso (REL) y estimulación de los sistemas enzimáticos apropiados. Cuando la capacidad detoxicante del hígado es superada, comienza a fallar los sistemas enzimáticos y se producen francos cambios histopatológicos.³

En fases iniciales de enfermedades hepatobiliares, son las exploraciones clínico-químicas especialmente las determinaciones de enzimas las que suelen dar los primeros indicios. En un estudio humoral de una presunta afección hepática las determinaciones enzimáticas mínimas que se consideran útiles son: fosfatasa alcalina (FA), transaminasa glutámico pirúvica (TGP), gama-glutamil transpeptidasa (G-GT), bilirrubinas, proteínas, colinesterasa (CHE), y transaminasa glutámico oxalacética (TGO).³

3.6.1.-FOSFATASA ALCALINA (F.A.).

Es una glicoproteína intracelular de alto peso molecular, de acuerdo a la función que cataliza se considera dentro de las hidrolasas; se encuentra en hígado, osteoblastos, placenta, epitelio intestinal, y túbulo renal. Se encuentra elevada en niños, en la pubertad, en mujeres embarazadas y en lactantes siendo un proceso no patológico.

En hígado se encuentra aumentada en obstrucción biliar extrahepática, colestasis intrahepática, cirrosis biliar, metástasis hepática, cirrosis y hepatitis, por tanto es de mucho apoyo en cuadros de funcionamiento hepático.⁴

3.6.2.-TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRÚVICA (TGP).

Esta enzima la encontramos intracelularmente en el citoplasma del hepatocito, se localiza en el hígado, el corazón, el músculo, el riñón, el testículo y en intestino; por la reacción que cataliza se considera una transferasa dando una transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al alfa-cetoglutarato. En el hígado se eleva extremadamente en la hepatitis viral, la hepatitis farmacoinducida. Se eleva moderadamente en trastornos con necrosis extensa y moderadamente en mononucleosis infecciosa, hepatitis crónica, colesteasis intrahepática, colecistitis, hepatitis viral aguda en fase de recuperación, y congestión hepática grave por insuficiencia cardíaca.²

3.6.3.-GAMA-GLUTAMIL TRASPEPTIDASA (G-GT)

Es una enzima que se encuentra en la membrana celular. De acuerdo a la reacción que cataliza es una transferasa por la trasferencia del grupo gamma- glutámico del glutatión a un aminoácido o a un peptido receptor. Esta se encuentra en el hígado, el bazo, el páncreas, el riñón, y el intestino delgado. Se encuentra aumentada en la colestasis tóxica por alcohol o mecánica y en la obstrucción biliar benigna.⁴

3.6.4.-PROTEÍNAS.

Son compuestos de aminoácidos. Son sintetizadas dentro de las células hepáticas en el retículo endoplásmico, y cedidas al aparato de Golgi, que las secreta hacia el espacio de Disse, desde el cual llegarán a los sinusoides hepáticos.³

Se ha comprobado que las proteínas séricas y algunas inmunoglobulinas de origen hepático tienen un decremento de sus concentraciones cuando hay una reducción funcional hepática. La hipoalbuminemia se ha observado en procesos de daño hepático subagudo y crónico; estudios realizados en perros demuestran el incremento de globulina sérica en el daño hepático.²

3.6.5.-LIPOPEROXIDACIÓN.

Este proceso produce radicales libres a partir de dienos conjugados en lípidos insaturados y se lleva a cabo a nivel de membranas celulares; en condiciones normales los radicales libres producidos en el organismo se captan por sistemas antioxidantes. Una producción excesiva de estos actúan en los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular formando radicales lipídicos (ROO), que producen hidroperóxidos, (ROOH) y radicales lipídicos, propagando la cascada peroxidativa y consumiendo lípidos de membrana lo que origina cambios de permeabilidad de membrana, con la posterior muerte celular.¹⁶

Se ha detectado el aumento de la lipoperoxidación en las membranas microsomales de hígado de rata expuesta a tóxicos. También se postula la lipoperoxidación como mecanismo de daño hepatocelular causado por anfetaminas.⁶

3.6.6.-BILIRRUBINAS.

Son pigmentos biliares que se originan por la constante destrucción de eritrocitos en el organismo. La hemoglobina es destruida por el sistema reticulo endotelial y la bilirrubina restante se une a la albúmina y es transportada al hígado. Las células hepáticas conjugan la bilirrubina con el ácido glucurónico para formar diglucoronato de bilirrubina que es secretado por el hígado al duodeno. A la bilirrubina que se conjuga se le conoce como bilirrubina directa, conjugada, hidrosoluble ó hepática; a la que no se conjuga se conoce como bilirrubina indirecta, no conjugada, liposoluble ó poshepática.^{2*}

Se considera como una prueba excretora. Se encuentran aumentadas en etiologías hepáticas poshepáticas y prehepáticas, así como en hemolisis extravascular e intravascular, en obstrucción de conductos biliares, en edema y necrosis de células hepáticas y en diferentes ictericias.³

3.6.7.-GLUCÓGENO.

Es la forma de almacenamiento de la glucosa en el área II' o intermedia del lobulillo hepático. La glucosa se obtiene por medio de la glucogénesis del glucógeno cuando es necesaria, aprovechándose como fuente de energía para realizar procesos metabólicos.

Se asocia a problemas de necrosis celular hepática así como en cirrosis biliar secundaria.⁵

3.6.8.-COLÁGENA.

Es una glucoproteína la cual se encuentra en el parénquima hepático, la cápsula de Glisson, el tejido conjuntivo grueso, las fibras reticulares del hígado, el almacén conjuntivo del hígado, los conductos biliares y las placas de hepatocitos.

El daño hepático se acompaña de alteraciones de la enzima adenilciclasa e incrementos de AMP_c hepático disminuyendo el depósito de colágena debido a un aumento en la degradación intracélular de ésta. Se encuentra aumentada en cirrosis.²⁰

4.-MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.-MATERIAL BIOLÓGICO.

Para determinar la posible toxicidad de los compuestos ANTI AVI y del ANTI AVIII estos se administran en dosis única. La prueba se realizó en ratas, por la ventaja que éstas ofrecen para trabajar, entre ellas la manipulación, tamaño y mantenimiento, entre otras.

Se trabajó con ratas machos de la cepa Wistar, de un peso promedio de 250g. Los animales fueron proporcionados por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional. Se trabajó en condiciones adecuadas de limpieza, alimentación, y temperatura.

4.2.-MATERIAL Y EQUIPO

Balanza granataria con canastilla marca Ohaus.
Jeringa de 1 ml. con sonda para administración oral.
Jeringa de 10 ml para realizar las punciones cardiacas.
Cámara de anestesia
Equipo de disección
Centrifuga con refrigeración Beckman TJ-R.
Baño María.
Espectrofotómetro Spectronic 20.
Micropipetas de diferentes volúmenes.

4.3.-SOLUCIONES Y REACTIVOS.

Agua destilada (vehículo).

ANTI AVI.

ANTI AVIII.

4.4.-METODOLOGÍA.

4.4.1.-PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA.

Se formaron 4 lotes de 6 ratas cada lote los cuales fueron distribuidos al azar, se pesaron y marcaron los animales. El primer lote se le administrara el compuesto ANTI AVI a dosis terapéutica de 3.1mg/kg vía oral, este se sacrificó a las 24hrs despues de la administración junto con un lote control. Antes de ser sacrificado al animal se le tomaron muestras de sangre por punción cardiaca previamente anestesiado con éter etílico, y una vez sacrificado se extrae el hígado. Así se trabajo con el segundo compuesto ANTI AVIII.

4.4.2.-PRUEBA DE TOXICIDAD SUBCRONICA

Se utilizaron 8 lotes de animales, a dos lotes se les administró el compuesto ANTI AVI por vía oral cada 24hrs. a dosis terapéutica de 3.1mg/kg de peso, posteriormente se realiza la toma de muestra sanguínea el animal se sacrífico y se extrajo el hígado despues de siete días de tratamiento para el primer lote y despues de sesenta días para el segundo lote, se sacrífico su respectivo lote control. Los 4 lotes restantes se trabajan la misma manera para el compuesto ANTI AVIII.

Una vez realizado el sacrificio de los animales y obtenidas las muestras de sangre e hígado de los animales se procede a determinar la toxicidad hepática por medio de las siguientes técnicas de evaluación de daño hepático:

4.5.- DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

4.5.1.-CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA FOSFATASA ALCALINA:

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol el cual absorbe a 410nm.

CURVA STANDARD DE FOSFATASA ALCALINA

| Tubo | ml.de solución(2) | ml de sol.(3) | Mmol de sustrato hidrolizado |
|------|-------------------|---------------|------------------------------|
| 1 | 0.5 | 5.0 | 0.025 |
| 2 | 1.0 | 4.5 | 0.050 |
| 3 | 2.0 | 3.5 | 0.10 |
| 4 | 3.0 | 2.5 | 0.15 |
| 5 | 4.0 | 1.5 | 0.20 |
| 6 | 5.0 | 0.5 | 0.25 |

Los tubos se leen a 410nm.

SOLUCIONES.

1.- p-nitrofenol sol. standard de 10Mmoles/ml.

2.- 0.5 ml. de sol. (1) st. de p-nitrofenol llevado a 100ml. con NaOH 0.02N

3.- NaOH 0.02N.

El blanco se hace con 5.5ml de la solución 3 y leyendo a 410nm.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA.

Se numeran n tubos de ensayo por duplicado y se realiza la técnica como sigue.

- 1.- 0.25 ml. buffer de glicina 0.1M. MgCl₂ 1mM, PH 10.5
- 2.- 0.25 ml. de sustrato p-nitrofenilfosfato.
- 3.- Colocar en baño María a 37°C - 5 minutos.
- 4.- Añadir 50 microlitros de la muestra, mezclar suavemente.
- 5.- Incubar 30 minutos 37°C.
- 6.- Parar la reacción con 5ml de NaOH 0.02 N, agitando por inversión.
- 7.- Leer absorbancia a 410nm.

El blanco es idéntico pero colocando 50 microlitros de agua en lugar de muestra. Calibrar con agua y leer el blanco.¹⁶

Cálculos

$$(A - B) / m = R_1 \quad R_1 / 1.5 \times 1000 = \text{Mmol.L.mit.}$$

Donde

A = absorbancia

B = blanco

m = pendiente

4.5.2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA (TGP).

La actividad de la TGP se determino por el método de Reitman-Frankel, en el que se midió el complejo formado por el piruvato y la 2,4-dinitrofenilhidrazina, que se produce a partir de la alanina y el alfa-oxoglutarato, complejo colorido que absorbe a 515nm.

SOLUCIONES:

Buffer de fosfatos 0.1M. PH 7.4. Mezclar 840 ml. de solución 0.1M de fosfato disodico con 160ml. de solución 0.1M de fosfato monopotásico.

Solución de sustrato. Disolver 1.78g de D/L alanina y 30mg. de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer; añadir 0.5ml. de NaOH 1N y completar hasta 100ml. con solución buffer. Conservar a 4°C.

Reactivo cromógeno. Disolver 200mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1N caliente y completar hasta un litro con HCl 1N.

Solución estándar de piruvato. (1Mmol/ml) Disolver 11mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer.

| Tubo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--------------------------------|-----|-------|------|-------|-----|-------|-------|
| Solución | 250 | 225 | 200 | 175 | 150 | 125 | 100 |
| Sustrato (Ml) | | | | | | | |
| Sol. estándar de piruvato (Ml) | --- | 25 | 50 | 75 | 100 | 125 | 150 |
| Buffer de fosfatos (Ml) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Reactivo cromógeno (Ml) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| NaOH 0.4N | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Mmoles de piruvato | --- | 0.025 | 0.05 | 0.075 | 0.1 | 0.125 | 0.150 |

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA.

Se rotulan los tubos blanco y problema para cada muestra

| | blanco(ml) | problema(ml) |
|---|------------|--------------|
| 1.- Solución sustrato | 0.25 | 0.25 |
| 2.- Suero problema | --- | 0.25 |
| 3.- Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37°C durante 60 minutos. | | |
| 4.- Reactivo cromógeno | 0.25 | 0.25 |
| 5.- Suero problema | 0.050 | --- |
| 6.- Incubar a 37°C durante 15 minutos. | | |
| 7.- NaOH 0.4N. | 2.5 | 2.5 |

Leer los tubos a 515nm y ajustar con agua.¹⁷

CÁLCULOS:

$$(P-B)/m = R_1$$

$$R_1/3 = \text{Mmol.L.mit.}$$

DONDE

P = Problema

B = Blanco

m = Pendiente

3 = Factor

4.5.3.-CURVA DE CALIBRACIÓN DE GAMMA-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA.

En este método se uso como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la enzima g-glutamil traspeptidasa y de un receptor del grupo g-l-glutamil (glicil-glicina), produce g-l-glutamilglicil glicina y p-nitroanilida que se cuantifica.

CURVA ESTÁNDAR DE P-NITROANILINA.

Solución I. Pesar 13.81mg de p-nitroanilina y llevarlos a 250ml. con ácido acético 1.5M.

| Tubo | Ml. de sol.I | Ml de agua | nmol/ml |
|------|--------------|------------|---------|
| 1 | 50 | 1950 | 10 |
| 2 | 100 | 1900 | 20 |
| 3 | 150 | 1850 | 30 |
| 4 | 250 | 1750 | 50 |
| 5 | 375 | 1625 | 75 |
| 6 | 500 | 1500 | 100 |
| 7 | 750 | 1250 | 150 |
| 8 | 1000 | 1000 | 200 |

Leer a 410 no requiere blanco.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GAMMA-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA.

En cada tubo poner:

400 microlitros de Tris-HCl 200mM, PH 8.2

100 microlitros de MgCl₂ 200mM.

100 microlitros de Glicil-glicina 40mM, PH 8.2

200 microlitros de Gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10mM.

Previa incubación por 10 minutos a 37°C, se inicia la reacción con 200 microlitros de suero.

Se incuba a 37°C por 30 minutos y se detiene la reacción con 2ml de ácido acético 1.5M. Se lee a 410nm se cuantifica la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.

La reacción es lineal en el tiempo hasta la utilización de aproximadamente el 10% del sustrato (producción de aproximadamente 200nmoles de p-nitroanilina en la mezcla de reacción).

Calibrar con agua y hacer un blanco sustituyendo los 200 microlitros de suero por agua.^{1*}

CÁLCULOS.

$$(A - B) / m = R_1$$

$$R_1 \times 3 = R_2$$

$$R_2 / 6 = \text{Mmol.L.mít.}$$

Donde:

A = absorbancia

B = blanco.

m = pendiente

4.5.4.-DETERMINACIÓN DE GLUCÓGENO.

Este procedimiento se basa en la digestión caliente de una muestra de hígado que contiene glucógeno, el cual es hidrolizado con KOH 30% dando como resultado glucosa, que se cuantifica con colorimétricamente con antrona.

- 1.- Pesar 0.5g. de hígado en tubos de ensayo grandes, adicionarles 1.5ml. de KOH 30%, taponarlos con canicas, hervir en baño de agua durante 30 minutos.
- 2.- Después de enfriar pasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25ml. aforar con agua agitando muy bien.
- 3.- Del matraz anterior tomar de 1 a 4 ml con pipeta volumétrica y volver a diluir a 25ml con agua.
- 4.- De esta dilución poner 1ml en tubos grandes, preparar además un tubo blanco que contenga 1ml de agua y otros 2 con 20 microlitros de una solución de glucosa estándar (20 microgramos/ml) y completar a 1ml con agua.
- 5.- Preparar solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado añadir 2ml a cada tubo agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y enfriando en hielo.
- 6.- Tapar los tubos con canicas y ponerlos en baño de agua hirviendo por 15 minutos.
- 7.- Enfriar de inmediato sobre agua con hielo. Leer a 620nm.

CÁLCULOS.

$$\frac{20 \times A_m}{1.11 \times A_s} = \text{microgramos de glucógeno en la alícuota}$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la muestra

A_s = Absorbancia del estándar.

Expresar los resultados como g. de glucógeno por 100g de hígado⁴⁴.

4.5.5.-MÉTODO DE LIPOPEROXIDACION COLORIMETRICO.

Se fundamenta en la reacción que efectúan 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) con una molécula de malondialdehído (MDA) formando un pigmento rojo, el cual tiene un máximo de absorción en solución ácida a 532nm. El coeficiente de extinción molar del complejo colorido es de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Reactivos:

- Tris Hcl 150 mM PH = 7.4
- Ácido tricloroacético (TCA) al 15%.
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15%

Procedimiento:

- Pesar 0.5g. de hígado.
- Homogenizar en 5ml de agua.
- Tomar 300 microlitros del homogenado al 10% y agregar 700 microlitros Tris-HCl 150mM para completar 1ml.
- Incubar a 37°C por 30 minutos.
- Agregar 2ml de TBA al 0.375% en TCA al 15%.
- Calentar a ebullición por 30 minutos.
- Centrifugar a 300 r.p.m. por 10 minutos y leer el sobrenadante a 532 nm.

Cálculos:

$$C = \frac{A}{E \cdot l}$$

A= Absorbancia de la muestra.

l = longitud de la celda

E = Coeficiente de extinción del malondialdehído (MDA)

$$A - B \times 25.6410 = R_1$$

$$R_1/\text{proteínas} = \text{nmol de MDA/mg de proteínas.}$$

Donde

A = absorbancia B = blanco.

Hacer una dilución 1:10 del homogenado y tomar 20 microlitros para determinar proteínas. Expresar como nmoles de MDA/mg proteína¹⁹.

4.5.7.-DETERMINACIÓN DE HIDROXIPROLINA (COLÁGENA).

Este método se basa en la determinación de hidroxiprolina considerando que la molécula de colágena está constituida por 3 cadenas alfa, cuyo peso individual es de 96000 D, y que a su vez cada cadena contiene 100 residuos de hidroxiprolina.

- 1.- Pesar 0.1g. de hígado de rata previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
- 2.- Se agrega 2ml de HCl 6N y se sellan con el mechero ó soplete, para posteriormente colocarlas a 100°C en el horno durante 24hrs.
- 3.- Una vez hidrolizada la muestra, se rompe la ampolleta y se coloca nuevamente al horno a temperatura de 60 - 80 °C aproximadamente 24hrs. o hasta que seque.
- 4.- La muestra ya seca se resuspende con 2ml de solución amortiguadora; se agita vigorosamente en el voltrex y se vacía en un tubo de ensayo, lavar la ampolleta con la adición de 1ml de la misma solución. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 minutos.
- 5.- En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto, centrifugar a 3000 r.p.m. por 15 minutos, si se observa que el sobrenadante no queda claro repetir este paso.
- 6.- Se toma 1ml de este sobrenadante mas 1ml de agua mas 1ml de cloramina T. Se deja reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Transcurridos los 20 minutos, adicionar 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2M, 1ml de NaOH 1N y aproximadamente 2g. de NaCl. Agitar inmediatamente para detener la reacción.
- 8.- Agregar 6ml de tolueno y agitar 1 minuto. La fase acuosa es utilizable para la determinación de hidroxiprolina.

HIDROXIPROLINA:

9.- Se extrae la capa de tolueno y se desecha. La porción acuosa se cubre y se coloca a un baño hirviendo durante 20 minutos.

10.- Los tubos se enfrían 15 minutos preferentemente en refrigerador. Ya fríos se les adicionan 6ml de tolueno y se agitan durante un minuto.

11.- De la fase de tolueno se toman alíquotas por duplicado de 1ml y se les agrega 4ml del reactivo de Ehrlich.

12.- Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, leer a 560nm.

CÁLCULOS.

$$A - B = R_1$$

$$R_1/m \times 3 \times 10 \times 131.1 / 1 \times 10^9 \times 1000 \times 7.32 = \text{mg de colágena / g. de hígado.}$$

Donde:

A = absorbancia

B = blanco

m = pendiente

Se multiplica por 3 por que se toma una alíquota de 1ml de la muestra disuelta en 3 ml de buffer de citrato de sodio.

Se multiplica por 10 ya que la muestra inicial es de un 0.1g.

El 131.13 y 1×10^9 son por el cálculo de nmoles en la muestra, respecto a los nmoles en un mol de HP

El 1000 es el cálculo de mg de hidroxiprolina por gramo de hígado

7.32 es el porcentaje para pasar de mg de HP a mg colágena.²⁰

4.5.8.- DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINAS:

Las bilirrubinas forman con el ácido sulfanílico diazotado un colorante azoico, que en solución neutra es rojo y en solución alcalina es azul. El glucorónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona directamente, mientras que la bilirrubina indirecta libre reacciona solo en presencia de un acelerador. Pipetiar en tubos de ensayo.

| | Bilirrubina total | Bilirrubina directa | Blanco |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Ácido sulfanílico | 0.2ml. | 0.2 ml. | 0.2ml |
| Nitrito de sodio | 1 gota. | 1 gota. | ---- |
| Acelerador | 1ml. | ----- | 1ml (BT) |
| Solución Salina Fisiológica | ----- | 0.2ml | 2ml (BD) |
| Suero | 0.2ml. | 0.2ml. | 0.2 ml. |

Bilirrubina total:

Mezclar y dejar reposar de 10 a 60 minutos, ha temperatura entre 15°C y 25°C.

Solución II de Flehling 1ml.

Mezclar y leer a 578nm

Bilirrubina directa:

Mezclar y dejar reposar a temperatura entre 15°C y 25°C . A los 5 minutos exactos tras la adición del suero leer a 546nm.

Si es necesario preparar un solo blanco para cada bilirrubina y leer contra el blanco.

Cálculos:

Bilirrubina total (Absorbancia - 0.015) x 180. = Mmol/L.

Bilirrubina directa (Absorbancia - 0.015) x 240. = Mmol/L^{41,42}.

5.-RESULTADOS.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HEPATOTOXICIDAD AGUDA Y SUBCRONICA.

A continuación se muestran gráficamente los resultados obtenidos de los marcadores hepáticos realizados por medio de pruebas bioquímicas, las cuales nos determinan si existe o no daño hepático así como el grado de este.

Las gráficas que a continuación se muestran contienen la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos para el tratamiento de 24hrs (barra 1), el de 7 días (barra 2) y el de 60 días (barra 3) así como el control (barra 0) para que pueda compararse con los otros 3 resultados.

Los resultados se trataron por medio de análisis estadístico, realizándose análisis de varianza seguida por la prueba de las comparaciones múltiples de Tuckey

La gráfica -1 muestra los resultados de la determinación de fosfatasa alcalina en el suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24 hrs., 7 días y 60 días; los resultados indican que no existe diferencia significativa, ya que la fosfatasa alcalina en los grupos tratados es similar al grupo control.

La gráfica -2 contiene los resultados de la determinación de fosfatasa alcalina en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; los resultados muestran que no existe diferencia significativa ya que la fosfatasa alcalina en los grupos tratados es similar al grupo control.

La gráfica -3 indica los resultados de la determinación de transaminasa glutámico pirúvica en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; los resultados nos dicen que no existe diferencia significativa ya que la transaminasa glutámico pirúvica en los grupos tratados es similar al grupo control.

En la gráfica -4 se observan los resultados de la determinación de la transaminasa glutámico pirúvica en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; mostrando que no existe diferencia significativa ya que la transaminasa glutámico pirúvica en los grupos tratados es similar al grupo control.

En la gráfica -5 se obtienen los resultados de la determinación de la gama-glutamil transpeptidasa en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; indicando que no existe diferencia significativa ya que la gama-glutamil transpeptidasa en los grupos tratados es similar al grupo control.

En la gráfica -6 se aprecian los resultados de la determinación de la gama-glutamil transpeptidasa en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; los resultados llevan a decir que no existe diferencia significativa ya que la gama-glutamil transpeptidasa en los grupos tratados es similar al grupo control.

La gráfica -7 muestra los resultados de la determinación de proteínas en homogenado de hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; en este gráfico observamos que no existe diferencia significativa en los tiempos de 24hrs, 7 días y 60 días.

La gráfica -8 nos lleva a los resultados de la determinación de proteínas en homogenado de hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; los resultados son indicativos de que no existe diferencia significativa ya que las proteínas en los grupos tratados son similares al grupo control.

En esta gráfica ·9 se muestran los resultados de la determinación de lipoperoxidación en de hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; llevando a que no existe diferencia significativa para los tiempos de 24hrs. y 7 días sin embargo a los 60 días muestra diferencia significativa con respecto al control ya que los valores de lipoperoxidación se encuentran incrementados.

La gráfica ·10 corresponde a los resultados de la determinación de lipoperoxidación en hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; por tanto es indicativa de que no existe diferencia significativa ya que los valores de lipoperoxidación en los grupos tratados son similares al grupo control.

En la gráfica ·11 podemos apreciar los resultados de la determinación de bilirrubina directa en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; en este grupo existe diferencia significativa con respecto al grupo control, para el grupo con tiempo de administración de 24hrs. ya que la bilirrubina directa se encontro aumenta; sin embargo en los grupos tratados a 7 días y a 60 días son similares los valores obtenidos con los del grupo control.

En la gráfica ·12 se tienen los resultados de la determinación de bilirrubina directa en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; para este grupo existe diferencia significativa con respecto al control en los tiempos de administración de 24hrs. y 60 días ya que la bilirrubina directa se encontro alterada; en el grupo tratado a 7 días no hay diferencia significativa.

En la gráfica ·13 se ofrecen los resultados de la determinación de bilirrubina total en suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; observando que existe diferencia significativa, debido a que los valores de bilirrubina total en los grupos tratados se encuentran aumentados con respecto al grupo control.

En la gráfica ·14 se tienen los resultados de la determinación de bilirrubina total suero de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; se obtuvo que existe diferencia significativa con respecto al control para los grupos con tiempo de administración de 24hrs. y 60 días ya que la bilirrubina total se encontró aumentada; en el grupo tratado ha 7 días no se obtuvo diferencia significativa.

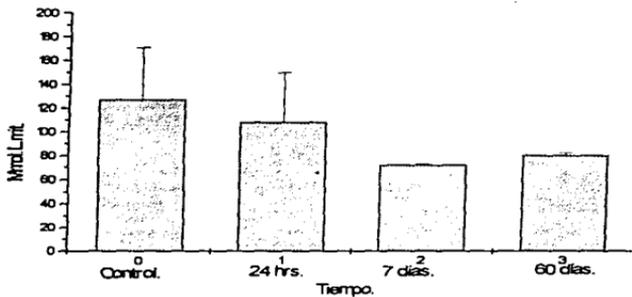
La gráfica ·15 contiene los resultados de la determinación de glucógeno en hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; en los resultados apreciamos que no existe diferencia significativa ya que los valores de glucógeno en los grupos tratados son similares a los del grupo control.

La gráfica ·16 corresponde a los resultados de la determinación de glucógeno en hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; en este gráfico no existe diferencia significativa para los grupos con tiempo de administración de 24hrs. y de 7 días ya que los valores de glucógeno son similares al grupo control; sin embargo en el grupo con tratamiento de 60 días hay diferencia significativa con respecto al control ya que su valor se encuentra disminuido.

La gráfica ·17 indica los resultados de la determinación de colágena en hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; este gráfico indica que no existe diferencia significativa para el tratamiento de 24hrs. y 7 días ya que la colágena es similar al grupo control; sin embargo en el grupo con tratamiento de 60 días hay diferencia significativa ya que la colágena se encuentra aumentada.

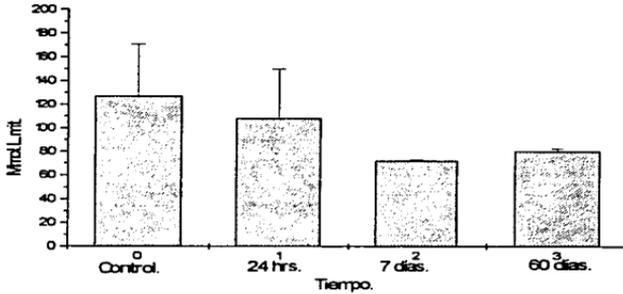
En la gráfica ·18 podemos observar los resultados de la determinación de colágena en hígado de rata; comparando el grupo control con los grupos tratados con el compuesto ANTI AVIII en tiempos de 24hrs., 7 días y 60 días; los resultados indican de que existe diferencia significativa para el grupo con tiempo de administración de 24hrs. y que los valores de colágena en los grupos con tratamiento de 7 días y 60 días son similares al grupo control.

Gráfica -1.- Determinación de Fosfatasa alcalina en suero de ratas tratadas con ANTI AVI a diferentes tiempos.



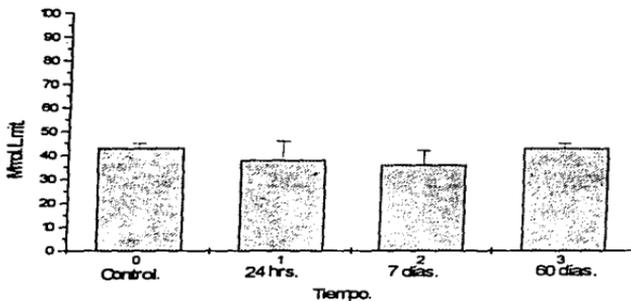
Se obtuvieron valores constantes de la enzima en el grupo control y en los grupos tratados, no se observó diferencia significativa.

Gráfica 2.- Determinación de Fosfatasa alcalina en suero de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



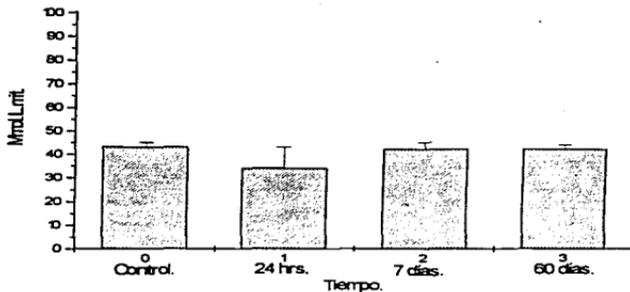
Se obtuvieron valores constantes de la enzima en el grupo control como en los grupos tratados, no se observó diferencia significativa.

Gráfica -3.- Determinación de Transaminasa glutámico pirúvica en suero de rata tratada con ANTI AVI a diferentes tiempos.



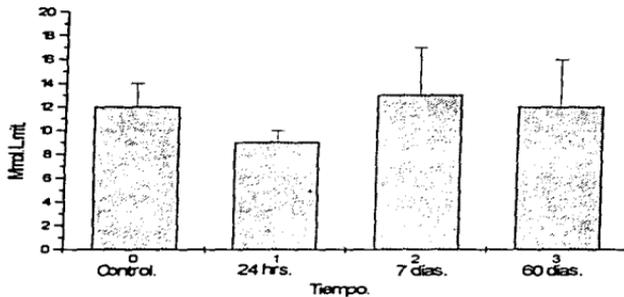
Se obtuvieron valores constantes de la enzima en el grupo control y en los grupos tratados, no se observó diferencia significativa.

Gráfica 4.-Gráfica de Transaminasa glutámico pirúvica en suero de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



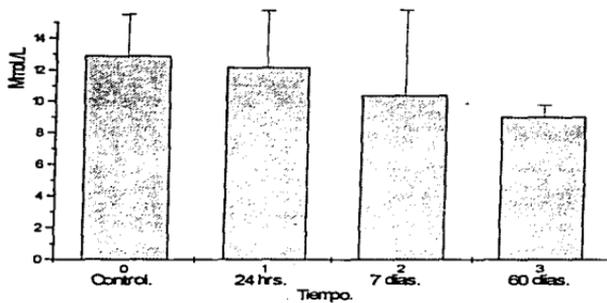
Se obtuvieron valores constantes de la enzima en el grupo control como en los grupos tratados, no se observó diferencia significativa

Gráfica -5.- Determinación de Gama-glutamil transpeptidasa en suero de rata tratada con ANTI AVI a diferentes tiempos.



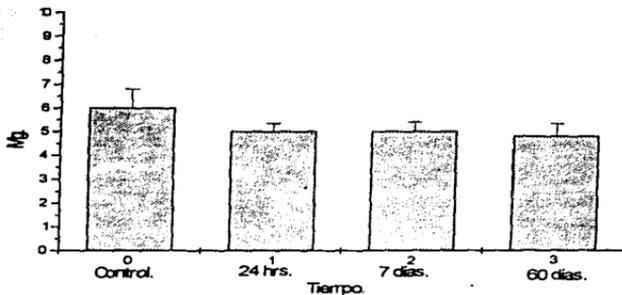
Se obtuvieron valores constantes de la enzima en el grupo control como en los grupos tratados, no se observó diferencia significativa.

Gráfica 6.- Determinación de Gama-glutamil transpeptidasa en suero de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



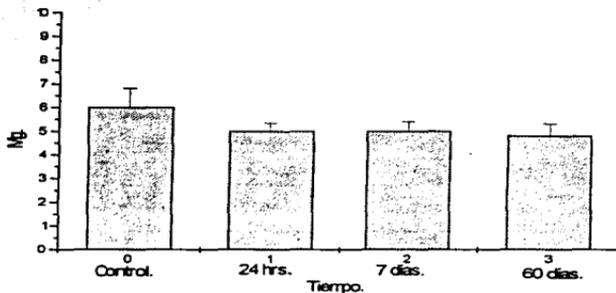
Se obtuvieron valores constantes de la enzima en el grupo control como en los grupos tratados, no se observó diferencia significativa.

Gráfica -7.-Determinación de Proteínas en homogenado de hígado de ratas tratadas con ANTI AVI a diferentes tiempos.



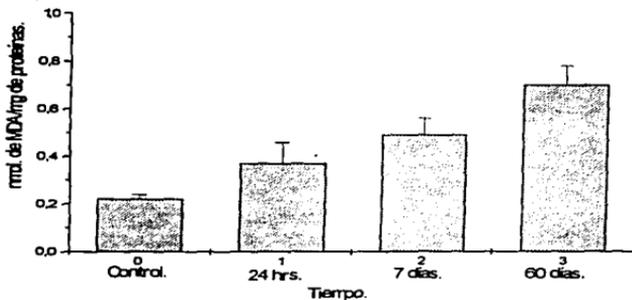
Se obtuvieron valores constantes de proteínas en el grupo con tratamiento de 24 hrs. y en el de 7 días, así como en el grupo de 60 días con respecto al grupo control.

Gráfica 8.- Determinación de Proteínas en homogenado de hígado de ratas tratadas con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



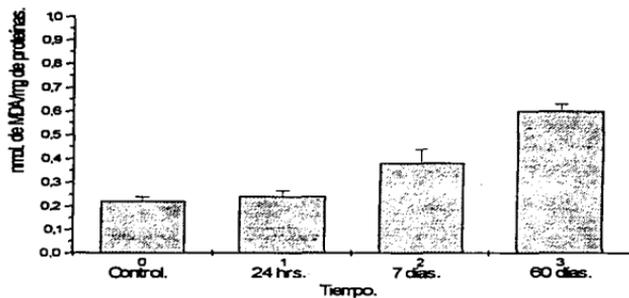
Se obtuvieron valores constantes de proteínas para el grupo control como para los grupos tratados, no se observó diferencia significativa.

Gráfica -9.- Determinación de Lipoperoxidación en hígado de rata tratada con ANTI AVI a diferentes tiempos.



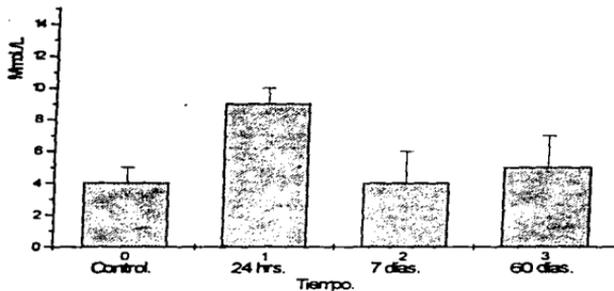
Se observo valores constantes de lipoperoxidación en el grupo control así como en los grupos con tratamiento de 24hrs y 7 días, se observó diferencia significativa en el grupo con tratamiento de 60 días.

Gráfica -10.-Determinación de Lipoperoxidación en hígado de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



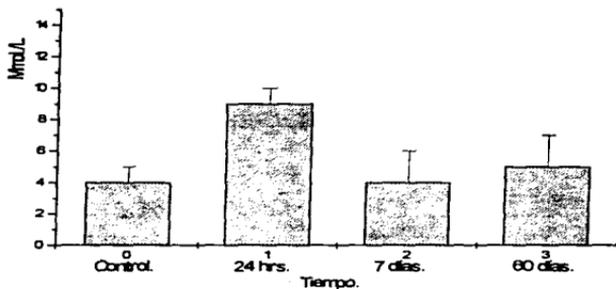
Se observo valores constantes de lipoperoxidación para el grupo control como para los grupos tratados, no se observó diferencia significativa

Gráfica 11.-Determinación de Bilirrubina directa en suero de rata tratada con ANTI AVI a diferentes tiempos.



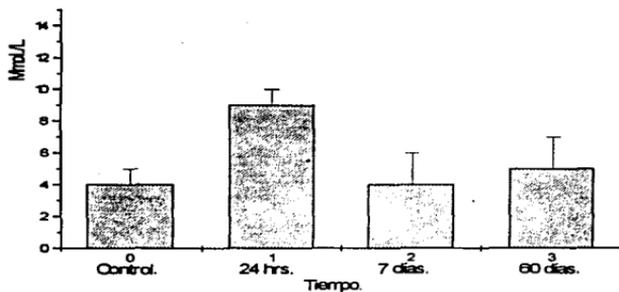
Se observó valores constantes de bilirrubina directa para el grupo control así como para los grupos con tratamiento de 7 días y 60 días, se observó diferencia significativa para el grupo con tratamiento de 24 hrs.

Gráfica -12.- Determinación de Bilirrubina directa en suero de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



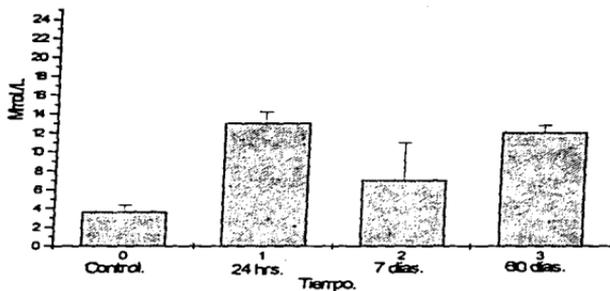
Se observo valores constantes de bilirrubina directa para el grupo control y para el grupo con tratamiento de 7 días, se observó diferencia significativa para los grupos con tratamientos de 24hrs. y 60 días respectivamente.

Gráfica-13 Determinación de Bilirrubina total en suero de rata tratada con ANTI AVI a diferentes tiempos.



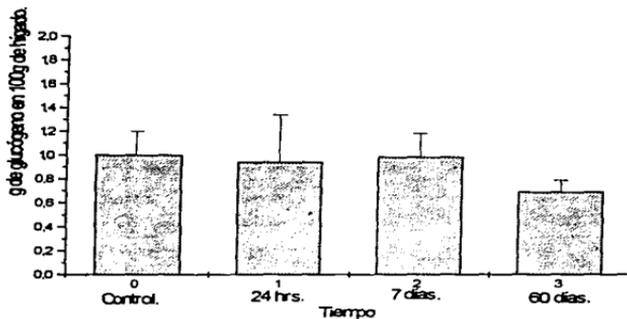
Se observó diferencia significativa de bilirrubina total con respecto al control, en los grupos con tratamiento de 24hrs., 7 días y 60 días respectivamente.

Gráfica 14.- Determinación de Bilirrubina total en suero de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



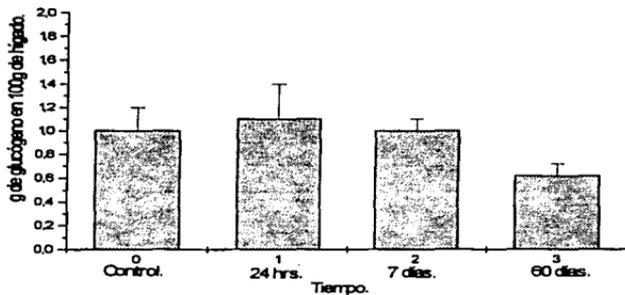
Se observo valores constantes de bilirrubina total para el grupo control y el grupo con tratamiento de 7 días, se observó diferencia significativa para los grupos con tratamiento de 24hrs. y 60 días respectivamente.

Gráfica -15.- Determinación de Glucógeno en hígado de rata tratada con ANTI AVI a diferentes tiempos.



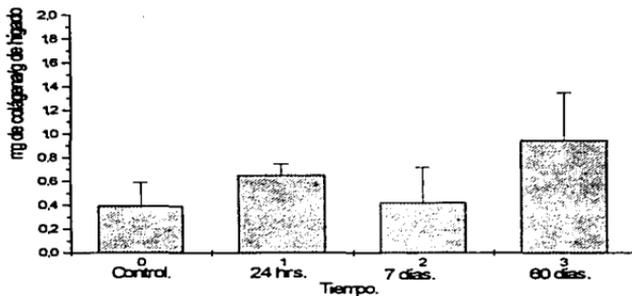
Se observo valores de glucógeno constantes para el grupo control asi como para los grupos tratados, no se observó diferencia significativa.

Gráfica -16.- Determinación de Glucógeno en hígado de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



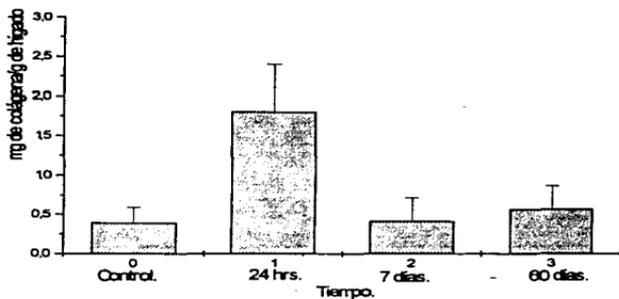
Se observo valores de glucógeno constantes para el grupo control como para los grupos con tratamiento de 24hrs. y 7 días, se observó diferencia significativa para el grupo con tratamiento de 60 días.

Gráfica -17.- Determinación de Colágena en hígado de rata tratada con ANTI AVI a diferentes tiempos.



Se observo valores de colágena constantes para el grupo control y para los grupos con tratamientos de 24hrs. y 7 días, se observó diferencia significativa para el grupo con tratamiento de 60 días.

Gráfica -18.- Determinación de Colágena en hígado de rata tratada con ANTI AVIII a diferentes tiempos.



Se observo valores constantes de colágena para el grupo control como para los grupos con tratamiento de 7 días y de 60 días, se observó diferencia significativa para el grupo de 24 hrs.

6.-ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El daño hepático inducido por tóxicos es reconocido desde hace más 100 años. La lesión observada no solo depende del agente químico que la involucra, si no del período de exposición. Después de una exposición aguda es usual la acumulación de lípidos en los hepatocitos, la necrosis celular o la disfunción hepatobiliar; los cambios neoplásicos y cirróticos son considerados como resultado de exposiciones crónicas.¹²

En los frecuentes casos con escasas manifestaciones clínicas, especialmente en fases iniciales de las enfermedades hepatobiliares son las exploraciones clínico-químicas especialmente las determinaciones de enzimas las que suelen darnos los primeros indicios.¹³

Por ello se ha dedicado el presente trabajo a la investigación toxicológica de los compuestos ANTI AVI y ANTI AVIII usando marcadores de daño hepático, los cuales se fundamentan en determinaciones clínico-químicas.

Con respecto a los resultados obtenidos en los gráficos de F.A., podemos discernir que aun que no existe una diferencia significativa del grupo control con respecto a los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI y el ANTI AVIII, existe un decremento de la enzima en ambos compuestos y este es más marcado en el gráfico del compuesto ANTI AVIII. Esto se fundamenta en lo siguiente:

-La fosfatasa alcalina es una enzima de amplia distribución en los tejidos.²⁹ Se localiza importantemente en intestino delgado, en riñón y en el hígado.³⁰ En el hígado la F.A. se localiza en el borde ciliar del canículo biliar y en la superficie sinusoidal de los hepatocitos.³¹

El aumento de los niveles de la actividad basal de la F.A. puede ser explicado por el daño a la membrana por ejemplo el daño lipoperoxidativo que produce el agente hepatotóxico afectando importantemente la estabilidad de las membranas celulares, pudiéndose facilitar la liberación al torrente sanguíneo de las enzimas de la membrana celular.³²

Cualquier tipo de daño o destrucción hepática que permita que la bilis entre a circulación causará una levación de la actividad de la F.A., durante el daño tisular se da la disminución de F.A., e incrementa durante el período de regeneración.³

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

49

Como podemos observar en nuestros gráficos, se obtuvieron valores constantes de TGP, G-GT y de proteínas en los grupos tratados con el compuesto ANTI AVI así como con el compuesto ANTI AVIII, comparandolos con sus respectivos grupos control. Lo que indica que no hay un daño hepático severo por no haber diferencia significativa de TGP; por otro lado los valores normales de G-GT descartan una posible colestasis hepática así como una obstrucción de conducto biliar

Corroborando lo anteriormente dicho tenemos los valores de proteínas sin diferencia significativa con respecto al control, lo que indica que no existe daño a nivel de retículo endoplásmico liso, por lo tanto, no existe daño intracelular. A estas aseveraciones se llegan con base en que:

-La TGP es una enzima localizada en el citoplasma de los hepatocitos. Debido a esto, la actividad de esta enzima se considera un marcador específico de daño hepático tipo necrótico, ya que sólo en estas condiciones esta enzima es liberada por los hepatocitos a circulación. Así la TGP nos informa de la existencia de daño hepático severo.³³

-La G-GT es una enzima localizada en la región canicular de la membrana del hepatocito. Es producida a lo largo del tracto biliar íntegro, desde el canaliculo biliar hasta el conducto biliar común. La actividad incrementada de la G-GT es indicativo de colestasis hepática, y tiende a ser marcadamente elevada cuando existe obstrucción del conducto biliar, colestasis intrahepática y en desórdenes infiltrativos del hígado.³⁵

-Cuando un agente tóxico daña a la célula hepática como consecuencia se incrementa la demanda de aminoácidos y por consiguiente la síntesis de proteínas.³⁶

También se encontró el aumento de proteínas microsomales en la administración costante de agentes hepatotóxicos, acompañado de la disminución de enzimas microsomales atribuyéndose a el daño que se presenta en el retículo endoplásmico liso, lugar de síntesis de proteínas.³⁷

-El daño membranar va a ser extensivo a los organelos, por lo tanto, esto va a conducir a la pérdida de la homeostasis celular y por consiguiente a la muerte celular.³⁴

Realizando un análisis de los resultados obtenidos podemos observar que para el compuesto ANTI AVI hay valores constantes de lipoperoxidación en el grupo control así como en los grupos con tratamiento de 24hrs y de 7 días, sin embargo en el grupo con tratamiento de 60 días se observa una diferencia significativa lo que indica daño a las membranas de los hepatocitos, debido a que se ha establecido que las alteraciones estructurales y funcionales en las membranas de los hepatocitos se dan a través de procesos de lipoperoxidación. Por lo tanto, es evidente que el grado de lipoperoxidación se encuentra elevado en los animales administrados con un agente tóxico.

La lipoperoxidación es un evento primario de una acción tóxica; la descomposición lipoperoxidativa de la membrana microsomal es uno de los enlaces entre los eventos iniciales y el desarrollo subsecuente de los fenómenos patológicos causados por agentes tóxicos.³⁸

Por otro lado en el gráfico de el grupo tratado con el compuesto ANTI AVIII no se observo diferencia significativa.

Los resultados de la determinación de bilirrubina directa muestran que al administrar el compuesto ANTI AVI se tiene diferencia significativa solo para el grupo con administración de 24 hrs. lo que nos lleva a un posible daño de tipo hepático, por otro lado, en la determinación de la bilirrubina total para este mismo compuesto tenemos diferencia significativa de los grupos con tratamiento de 24 hrs., 7 días y 60 días, lo que indica un posible daño a la función excretora del hepatocito.

La determinación de bilirrubina directa para el compuesto ANTI AVIII muestra diferencia significativa para el grupo con tratamiento de 24 hrs así como para el grupo de 60 días. Para la determinación de bilirrubina total se observa diferencia significativa para los grupos con tratamiento de 7 días y 60 días lo que lleva a iguales causas sin dejar de considerar lo siguiente:

Los niveles de bilirrubinas en especial de la bilirrubina total se encuentran elevados cuando el daño se debe a una función excretora del hepatocito lo cual manifiesta la presencia de colesteasis avanzada.

Un gran número de agentes conducen a una colesteasis hepática por interferir con el flujo de la bilis en uno o más componentes de la función excretora del hepatocito.³⁹

En el gráfico de glucógeno para el compuesto ANTI AVI no se observó diferencia significativa; sin embargo en el gráfico de glucógeno para el compuesto ANTI AVIII se observa diferencia significativa solo para el grupo con tratamiento de 60 días. No obstante ambos gráficos tienden a un decremento siendo evidente que al haber daño se utilizan las fuentes disponibles para llevar al hepatocito a su homeostasis intracelular; ocasionando con esto que los niveles de glucógeno se mantengan bajos.

La disminución de glucógeno hepático por algún agente tóxico se asocia a cambios recíprocos en la actividad de enzimas tanto para su síntesis como para su degradación, y a las bajas concentraciones de UDP-glucosa. Se sabe que en las células dañadas por agentes químicos existe una pérdida de sus actividades energéticas.⁴⁰

Con respecto a el gráfico de colágena para el compuesto ANTI AVI se observa diferencia significativa para el grupo con tratamiento de 60 días mientras que para el gráfico de colágena para el compuesto ANTI AVIII se tiene diferencia significativa para el grupo con tratamiento de 24 hrs. lo cual se debe a lo siguiente:

-La colágena se encuentra aumentada cuando hay una disminución en los depósitos de colágena debido a un aumento en la degradación intracelular de ésta. Se asocia su aumento a problemas cirróticos y a degradación celular.²⁰

7.-CONCLUSIONES.

De acuerdo al análisis de resultados podemos concluir que el compuesto ANTI AVI muestra alteraciones de marcadores de daño hepático, al administrarse en forma aguda a 24hrs. por tener diferencia significativa con respecto al control en los valores de bilirrubina directa y bilirrubina total y que este daño aumenta en periodos de administración subcrónica a 7 días por tener diferencia significativa de bilirrubina total; y a 60 días por tener diferencia significativa de lipoperoxidación, bilirrubina total y colagena.

Por otro lado el compuesto ANTI AVIII muestra alteraciones de los marcadores de daño hepático, en la administración aguda a 24hrs. se observa diferencia significativa con respecto al control, de bilirrubina directa, de bilirrubina total y de colágena. Para una administración subcrónica a 7 días se observa una diferencia significativa de bilirrubina directa y para una administración subcrónica a 60 días se observa diferencia significativa de bilirrubina total y glucógeno teniendo igual ventaja con respecto al compuesto ANTI AVI.

Aun con los resultados obtenidos no debe descartarse la posibilidad de estudios crónicos para reafirmar los estudios realizados así como los estudios en otros órganos y sistemas, además del estudio correspondiente en hembras.

Por lo tanto podemos concluir que el compuesto ANTI AVI así como el ANTI AVIII tienen la misma oportunidad para ser introducido ha un estudio más completo para desarrollarse como un nuevo fármaco, siendo otra opción de tratamiento para las arritmias cardiacas.

8.-BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Glöwman, M. L. , Dargie, R. L. Codding P.W. J. Med Chem. (1991) 34, 2678-2684.
- 2.-Korolkovas, A. "Esentials of Medicinal Chemistry" 2a de. A. Wiley Intercience Publication Sao Paulo, (1988), 458 - 496.
- 3.-Shanklin, J.R. Johnson, C,P; Proakins, A.G. Barret, R.J.J. Med. Chem. (1991), 34, 011-3022..
- 4.-L. Jendrassik. Biochem. Z. (1983), 297, 81.
- 5.-G. Schellong y U Wender. Arch. Kinderheilk (1960) 162:126.
- 6.-L. Berger. Alkaline phosphatase. standars Method of Clinical Chemistry. 5, Meites New York (1963).
- 7.-Reitman S, Acolorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 1957, 28, 56-63.
- 8.-M. Glosmann Gamma-glutamyl trasferase in kindney brush border menbranes. 19(4), 340-344 (1972).
- 9.-Buege J.A. Methods in Enzimology (30), LII, 302, (1978).
- 10.-Rojkin M. y Gonzalez. An improved method for determining special radioactivities of proline and hidroxyproline. Analitical Biochemistry 57, 1 -7, 1974.
- 11.-Jeffrey A. Brent, M.D. "Role of free radicals in toxic hepatic injury. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury?" Clinical Toxicology, 31(1), 173-196 (1993).
- 12.-Gabriel L. Plaa. "Detection and evaluation of chemically induced liver injury." Principles and Methods of toxicology, edited by A. Wallence Hayes New York 1982.
- 13.-Friedrich W. Schmidt. "Diagnóstico diferencial del síndrome de colesteasis" Acte Bioquimica Clinica Latinoamericana. Vol. XII, No 4, 369-388, 1979.
- 14.-K. Chida. "Changes in alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase during the process of rat hepatocyte proliferation." Acta Histochem. Cytochem. Vol. 22, 5, 1989.

- 15.-Francisco J. Romero. "Careful consideration of the effects induced by glutathione depletion in rat liver and heart. The involment of cytosolic and mitochondrial glutathione pools." *Chem. Biol. Interactions*, 70 (1989) 29-37.
- 16.-Albert W. Girotti. "Mechanisms of lipid Peroxidation" *Jounar of Radicals in Biology & Medicine*. Vol. 1 pp 87-95. 1985.
- 17.-H.W. Gardner. *J. Agric. Food Chem.* 23, 129 (1975).
- 18.-M. Repetto. "Toxicología Fundamental" Ed. Cientifico Medica España 1981.
- 19.-C. Rozman. "Medicina Interna. Ed. Marin 9ed. Barcelona.
- 20.-Stanley L. Robins. "Patología Estructural y Funcional" Ed. Interamericana. México 1975.
- 21.-Louis S. Goodman "Bases Farmacológicas de la Terapéutica" Ed. Interamericana 5ª ed. México D.F. 1978. p 32-33, 35, 576.
- 22.-Williams, E.M.V.J. *Clin. Pharmacol* (1984), 24, 129-147.
- 23.-Colapret, J.A.; Diamantidis, G.; Spencer, H. K.; Spaulding, T. C.; Rudo, F. G. J. *Med. Chem.*(1989), 32, 968-974.
- 24.-Craig Charles, R Stitzel, Robert E. *Farmacologia médica*. Ed. Interamericana. México 1985. p 89-96, 297-300.
- 25.-Meyer D. S. *Modern drug research Vol. 12*. Marcel Dekker, inc. New York USA, 1989. p 355-399.
- 26.- Hayes A. Wallece Ph. *Principles and methods of Toxicology*. Second Edition. Raven Press. USA, 1989. p 170-179.
- 27.-Nociones basicas de toxicologia. *Lecturas complementarias*. OMS, 1985 p.98-119, 145-218.
- 28.-Gallan J. L. *Pathobiology of bilirubin and jaundice*. *Semin Liver Dis*. 1988. 8:105.
- 29.- McComb R.B. and Posen S. *Alkaline phosphatase*, Plenum Press, Neww York, 1979.
- 30.- Smuckler E.A. *Structural and functional changes in acute liver injury*. *Envir. H. Per.* 5:13, 1976.

- 31.- Brow S.S., Mitchell F. and Young D.S., Chemical diagnosis of diseases. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York, 1980.
- 32.- Tsuboi, K.K., et al. Enzyme alterations associated with mouse liver degeneration and regeneration after siggle carbon tetrachloride feedign. *Cancer Res.* 11:221 (1951).
- 33.- Mourelle, M.M. y Villalon, H.C.M. Tesis de maestria, Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN, 1985.
- 34.- Paters R. A. The biochemical lesion and lethal syntesis, MacMillan Co., New York, 1964.
- 35.- Hayes A. W. Principles and methods of toxicology, Raven Press, New York 1982.
- 36.- Hanes, C.S., Hird, F.I. and Isherwood F.B. Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutatione. *Nature* 166, 288-292, (1950).
- 37.- Reemer, H. and Merker, H. Drug inducet changes in the liver endoplasmic reticulum: Assosation with drug metabolizing enzymes. *Science* 142: 1654-1658 (1965).
- 38.- Recknalgel R.O. and Glende E., Lipid peroxidation: a specific form of cellular injury In: Hanbook of Physiology, sec.9 Reactions to environmental agents. Williams & Wilkins, Baltimore, 1977.
- 39.- Mehendale H.M., Modification of hepatobiliary fuct on by toxic chemicals., *Proc.* Vol. 38 8:2240, 1979.
- 40.- Farber E. and Ficher M.M. Toxic injury of the liver, vol.1 Marcel Dekker, inc., p 194, New York, 1980.
- 41.- L.Jendrassik y P. Grof. *Biochem. Z.* (1938) 297:81.
- 42.- G. Schellong y U. Wende. *Arch. Kinderheilk.* (1960) 162: 126.
- 43.-Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing trhe principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72:248-254.
- 44.- Hassid W. Z. and Abraham S. Chemical Procedures for Analysis of Polysaccharides. *Biochem.* 1937.