

86



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE UNA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE  
LOS NIVELES DE GLUTATIÓN Y LA ACTIVIDAD DE  
LA GLUTATIÓN REDUCTASA EN DIFERENTES  
TEJIDOS DE RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**CAROL PERELMAN KHODARI**

64/282



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Victor Manuel Ugalde Saldivar  
Vocal: Francisco Javier López Gómez  
Secretario: Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte  
1er. Suplente: Liz Jannet Medina Reyes  
2o. Suplente: Ma. Manuela Nájera Martínez

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Asesor: Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte



Sustentante: Carol Perelman Khodari



Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT IN 207196 y por CONACYT 25377-M.

## **Agradecimientos.**

A mis padres: por haberme creado y formado con tanto amor y dedicación. Les debo todo. A mi papá, por haberme heredado el amor a la ciencia y al conocimiento... gracias por creer siempre en mí. A mi mamá, por todas las revisadas de exámenes; gracias por darme ese apoyo incondicional cada día de mi vida. Son mi ejemplo a seguir.

A mis hermanas, mis mejores amigas. Las adoro. A Debbie, te admiro mucho, gracias por tu confianza incondicional. A Ariela, diario aprendo algo nuevo de tí, me encanta.

A mi Jeff, eres la persona más importante en mi vida. Gracias por adorarme tanto, darme siempre tu mano y por hacerme feliz y plena cada día. Te admiro y me siento bendecida a tu lado. I moosh you.

A mis abuelos: Buillo, Papagallo, Abue y Teta; gracias por adorarme tanto y por todo lo que me han enseñado, siempre me hacen sonreír. Papi; te extraño y quiero mucho.

A mi nueva familia: Stephie, Marcos, Adolfo, Sharon, Leslie, Marc, Michaelle, Sharon, Samuel y Daniel; gracias por su amor...no hay más bello que sentirse parte de una familia tan completa.

A la Dra. Patricia Ostrosky: Patty, el primer día que me llevaste a tu laboratorio me guiaste por el camino correcto, me abriste un horizonte inimaginable. Gracias por tu apoyo y cariño, te admiro mucho.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt: Maricha, por todas las horas de paciencia y discusión en el fluorómetro, aprendí mucho. Gracias por tu confianza y amistad estos 5 años juntas.

A Victor Manuel Ugalde y Francisco Javier López, por su apoyo, dedicación y aportaciones durante la revisión de esta tesis. Victor no se me olvidará la Ley de L. Beer.

A mis compañeros y amigos: con los cuales compartí cada momento en clase, cada laboratorio, cada examen...Cristian, Lulu , Gaby, Bego, Fer, Alex y especialmente a Sandra e Iván, sin ustedes la carrera no hubiera sido igual.

A mis maestros de las Olimpiadas de Química: gracias por enseñarme a triunfar ante grandes retos. Argentina fue una experiencia inolvidable.

## Resumen.

La elevada prevalencia de desnutrición en algunas poblaciones se acompaña de una mayor incidencia de enfermedades infecciosas, las cuales aunadas a la situación nutricional disminuyen la calidad de vida de estos individuos. El desarrollo normal de un organismo requiere de una dieta balanceada en carbohidratos, proteínas, lípidos y vitaminas. Por lo que resulta importante conocer los cambios metabólicos que se puedan originar por cualquier modificación de la dieta; tal como el decremento en la ingesta de proteínas.

El glutatión (GSH), el tripéptido ( $\gamma$ -glutamil cisteinil glicina), es una de las moléculas orgánicas pequeñas más abundantes en la naturaleza. La mayor parte de sus funciones biológicas dependen del grupo tiol del residuo de cisteinil. Casi todos los tejidos contienen GSH debido a que está involucrado en reacciones metabólicas de detoxificación. Su importancia radica en que no sólo reacciona con electrófilos provenientes de xenobióticos (como productos de la Fase I del metabolismo) sino que también con electrófilos endógenos producidos principalmente por el daño de radicales libres, en presencia de oxígeno, a lípidos, proteínas y ADN celular. La reacción de reducción que lleva a cabo es:  $2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{e}^-$ ; por lo que la razón GSH/GSSG (glutatión reducido / glutatión oxidado) es un indicador del estrés oxidativo celular. Por otro lado, la célula contiene una enzima, la glutatión reductasa (GR) que cataliza la reacción inversa para regenerar la poza celular de GSH.

En este trabajo se administró una dieta hipoproteica (6% de proteína) isocalórica a un lote de ratas machos recién destetadas (día 0). El día 45 fueron sacrificadas por dislocación cervical y se les extrajo el hígado y riñones para realizar las determinaciones de GSH, GSSG y GR. Como control se tuvo un grupo de ratas con dieta normal (24% de proteína). Parte del lote experimental se dejó en recuperación a partir del día 45, bajo dieta normal, y a los 15 días (día 60) se sacrificaron siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado.

Se llevó un control de la variación de peso respecto a la dieta durante el tiempo del experimento. Se determinaron los niveles de GSH y GSSG mediante fluorimetría en homogenados de hígado, riñón y pulmón. En los mismo tejidos se midió la actividad de la glutatión reductasa a través de la oxidación de NADPH por espectrofotometría a 340 nm. Los resultados se reportan por miligramos de proteína.

Se encontró que las ratas con dieta hipoproteica presentaban menor estrés oxidativo, es decir, mayor relación GSH/GSSG y menor actividad de la glutatión reductasa que los controles.

# Índice

## Página

Capítulo 1. Justificación	8
Capítulo 2. Objetivo	9
Capítulo 3. Hipótesis	10
Capítulo 4. Antecedentes	11
4.1 Metabolismo de xenobióticos	11
4.2 El glutatión	
4.2.1 Descubrimiento del glutatión	20
4.2.2 Propiedades químicas y características del glutatión	22
4.2.3 Principales funciones del GSH	22
4.2.4 Distribución del GSH y GSSG	23
4.2.5 Metabolismo del glutatión	23
4.2.6 Enzimas relacionadas con el glutatión	25
4.2.7 Transporte del glutatión	29
4.2.8 Modulación del metabolismo del glutatión	30
4.3 Requerimientos nutricionales del hombre	36
4.3.1 Deficiencias nutricionales	44
4.4 Análisis de los niveles de nutrición en México	49
Capítulo 5. Materiales y métodos	59
Capítulo 6. Resultados experimentales	67
Capítulo 7. Discusión	75
Capítulo 8. Conclusión	81
Capítulo 9. Referencias	82
Capítulo 10. Anexos	85



# Capítulo 1.

## Justificación

El ambiente en que vivimos contiene una gran cantidad de agentes reactivos: electrófilos y radicales libres, los cuales al entrar en contacto con los tejidos y células de seres vivos interaccionan con macromoléculas, pudiendo modificar su actividad normal. Por lo cual, para cualquier organismo es de fundamental importancia contar con mecanismos antioxidantes como el glutatión.

Debido a los factores socioeconómicos, una gran proporción de la población en México cuenta con una dieta baja en proteínas; hecho que puede tener innumerables efectos en la salud física de las personas.

Creo que es de gran importancia utilizar un modelo biológico para evaluar los efectos que una dieta baja en proteínas (hipoproteica) puede tener en el grado de estrés oxidativo y en los niveles de glutatión tisular.

Carol Perelman Khodari

## **Capítulo 2.**

### **Objetivo**

Evaluar los efectos que una dieta hipoproteica tiene en el ambiente oxidativo tisular (hígado y riñón) tomando como parámetros los niveles de glutatión reducido, glutatión oxidado, y la actividad de la glutatión reductasa.

## **Capítulo 3.**

### **Hipótesis**

Durante la ingesta y digestión de proteínas se producen algunas sustancias químicas reactivas que pudieran elevar el estrés oxidativo y por lo tanto la conversión de glutatión reducido a glutatión oxidado, aumentando como consecuencia la actividad de la glutatión reductasa. Debido a que las ratas con dieta hipoprotéica no tendrán un consumo alto de proteínas, presentarán, siguiendo esta misma lógica, un menor nivel de glutatión oxidado; es decir una menor utilización del glutatión reducido y por lo tanto de la glutatión reductasa.

## Capítulo 4.

### Antecedentes.

En la vida diaria, todos los seres vivos; seres humanos, animales y vegetales, estamos expuestos a una variedad, cada vez mayor, de agentes químicos, que van desde sustancias inorgánicas, hasta moléculas orgánicas complejas del medio ambiente.

Estas sustancias al entrar en contacto con las células del organismo modifican su estado de equilibrio. El físico y químico suizo Teofrasto Bombasto, con pseudónimo Paracelso (1493-1541), dijo que “dependiendo de la dosis, cualquier sustancia puede ser veneno o agente terapéutico” (1). Con esta premisa entendemos que los agentes químicos con los cuales estamos en contacto tienen efectos bioquímicos y fisiológicos; algunas veces, también patológicos.

### 4.1 Metabolismo de xenobióticos.

Es importante clasificar las distintas sustancias con las cuales interacciona constantemente los organismos, por lo cual es conveniente establecer las siguientes definiciones:

- **Xenobiótico.** Toda sustancia extraña al ser viviente. Incluye sustancias benignas o dañinas; excluye vitaminas y hormonas. Sinónimo de sustancia exógena.
- **Sustancias endógenas.** Aquellas que no son extrañas al organismo y a determinadas concentraciones son necesarias para el buen funcionamiento del mismo (2).

Para que un xenobiótico manifieste su acción biológica es necesario que pase por las siguientes tres etapas (3):

1. **Etapa de exposición.** En esta etapa el xenobiótico queda disponible para ingresar al organismo. Los factores que modulan esta disponibilidad son la ruta y sitio de exposición así como la duración y frecuencia de ésta.
2. **Etapa toxicinética.** Involucra la absorción, distribución, metabolismo y excreción del xenobiótico dejándolo disponible para ejercer su acción. Las propiedades químicas y físicas específicas del xenobiótico afectarán cada uno de estos pasos.
3. **Etapa toxodinámica.** Se refiere a la interacción del xenobiótico con el organismo, ocasionando una ampliación en la respuesta biológica y consecuentemente los efectos tóxicos acompañados de sus correspondientes signos clínicos.

Las características lipofílicas de ciertos xenobióticos facilitan su absorción, paso a través de las membranas biológicas y acceso a su sitio de acción; obstaculizando así su eliminación del organismo.

Cuando las sustancias entran en contacto con las células del organismo modifican su estado de equilibrio. Con el fin de mantener la homeostasis, las células llevan a cabo distintas reacciones para eliminar o hacer menos tóxica a la sustancia exógena. El conjunto de estas reacciones componen el metabolismo de xenobióticos o biotransformación.

Las reacciones de biotransformación son esenciales para generar metabolitos más hidrofílicos que pierdan su actividad biológica inicial y sean más fáciles de excretar. Sin embargo, en algunos casos se producen metabolitos con potente actividad biológica o con propiedades tóxicas.

Estas reacciones en el organismo se clasifican en dos fases. En la primera, Fase I, se realiza una funcionalización (se introduce o expone un grupo funcional del xenobiótico original); en la segunda, Fase II, hay una reacción de biosíntesis (culmina con la

formación de un enlace covalente entre un grupo funcional del compuesto original con conjugados polares que suelen ser inactivos) (4).

Por lo común, la conversión metabólica de los xenobióticos es tarea de enzimas; generalmente hepáticas. Otros órganos con actividad metabólica son los riñones, vías gastrointestinales, piel y pulmones. Los sistemas enzimáticos que intervienen en las reacciones de Fase I están situados en el retículo endoplásmico (enzimas microsomales), en tanto que los de enzimas que intervienen en Fase II son citosólicas. A menudo, las sustancias biotransformadas por reacción de Fase I en el retículo endoplásmico, se conjugan en la fracción citosólica de la misma célula.

#### ➤ Fase I.

La importancia de esta fase radica en lograr la biotransformación de los grupos funcionales que presentan los xenobióticos susceptibles a sufrir reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis para transformarlos en moléculas de mayor polaridad. Las transformaciones efectuadas incrementan la hidrofiliía de los diversos compuestos y en consecuencia facilitan su excreción corporal. Esto es fundamental debido a que las características lipofílicas de las sustancias facilitan su paso a través de las membranas biológicas incrementando su depósito y obstaculizando su excreción.

1. Reacciones de oxidación. La oxidación es probablemente la reacción más común en el metabolismo de xenobióticos. Muchos compuestos son oxidados por un grupo no específico de enzimas denominado sistema mono-oxigenasas de función mixta, el cual se encuentra principalmente en los microsomas hepáticos, una fracción derivada del retículo endoplásmico liso (2).

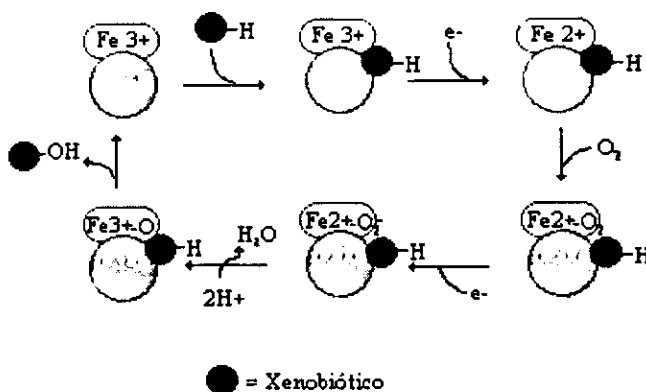
El sistema mono-oxigenasas de función mixta también es conocido como: enzimas microsomales, oxidasas de función mixta y citocromo P-450.

Desde su origen, hace más de 3,500 millones de años, la familia del gen del citocromo P-450 se ha diversificado para encargarse del metabolismo de un número creciente de sustancias ambientales, toxinas en alimentos y fármacos. La superfamilia de enzimas así obtenida cataliza muy diversas reacciones de oxidación y reducción en un grupo químicamente muy heterogéneo de sustratos.

Las enzimas del citocromo P-450 son proteínas de membrana con grupo hemo (4) que para catalizar la reacción requieren a la reductasa NADPH-citocromo P-450, NADPH + H<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) de cofactor y oxígeno molecular.

La reacción de oxidación multifásica consiste en que el sustrato xenobiótico reacciona con la forma oxidada del citocromo P-450 (Fe<sup>3+</sup>), para formar un complejo de enzima sustrato. La reductasa del citocromo P-450 acepta un electrón de NADPH + H<sup>+</sup>, que a su vez reduce el complejo oxidado de citocromo P-450 - xenobiótico. El complejo citocromo P-450 - sustrato reducido (Fe<sup>2+</sup>) reacciona con oxígeno molecular y un segundo electrón de NADPH + H<sup>+</sup> donado a través de la misma reductasa de flavoproteína, para formar una especie de oxígeno activado. En las fases finales se libera un átomo de oxígeno en forma de agua, y otro se transfiere al sustrato. Una vez liberado el sustrato sometido a oxidación, la enzima oxidada (citocromo P-450) se regenera (4) (figura 1).

Figura 1. Mecanismo de activación de oxígeno y oxidación de xenobiótico por acción del citocromo P-450 (el Fe indica el átomo de hierro del grupo hemo)



Las biotransformaciones oxidativas catalizadas por las mono-oxigenasas de citocromo P-450 incluyen hidroxilación aromática y de cadena lateral, desalquilación de N, O y S, oxidación de N, sulfoxidación, hidroxilación de N, desaminación, deshalogenación y desulfuración (N=nitrógeno; O=oxígeno; S=azufre). También se advierte catálisis de reacciones reductivas, por acción de enzimas de citocromo P-450 y por lo común en un medio con baja presión de oxígeno. La única característica estructural común al grupo heterogéneo de xenobióticos oxidados por enzimas de citocromo P-450 es su gran liposolubilidad.

Otras enzimas que también pueden oxidar xenobióticos son la prostaglandin H sintetasa, la alcohol deshidrogenasa, la aldehído deshidrogenasa, la xantina oxidasa, la monoamina oxidasa y las aromatasas (2). Sin embargo, la principal es la citocromo P-450.

2. Reacciones de reducción. Los grupos carbonilos, azo y nitro son objeto de reducción, resultando en la formación de grupos hidroxilos y aminos (cuadro 1). Hay varias reductasas en el hígado, las cuales dependen de la presencia de NADH + H<sup>+</sup> ó NADPH + H<sup>+</sup>.

Reacción	Sustrato	Producto	Enzimas
Reducción del grupo azo	-N=N-	-NH <sub>2</sub> + -NH <sub>2</sub>	Azoreductasa
Reducción del grupo nitro	R-NO <sub>2</sub>	R-NH <sub>2</sub>	Nitroreductasa
Reducción de aldehidos	R-CHO	R-CH <sub>2</sub> OH	Aldehído reductasa

Cuadro 1. Tipos de reacciones de reducción.

Compuestos azo, tales como el prontosil y la sulfalazina, son convertidos a aminas aromáticas por la azoreductasa, una enzima NADPH + H<sup>+</sup> dependiente presente en los microsomas. Hay evidencias de la participación del citocromo P-450 en la reducción de algunos compuestos.



Los compuestos nitrados, por ejemplo el cloranfenicol y el nitrobenzeno, son reducidos a aminas aromáticas primarias por una nitroreductasa.

3. Reacciones de hidrólisis. Las hidrolasas constituyen un grupo de enzimas generalmente de baja especificidad capaces de hidrolizar ésteres, amidas, lactonas, ésteres de fosfatos y sulfatos, disacáridos, glicósidos, péptidos: el grupo éster es el más susceptible a sufrir esta reacción.

Las consecuencias del metabolismo de Fase I en los xenobióticos pueden ser diversas. Desde una desactivación total o parcial, una co-activación (metabolito y xenobiótico presentan misma actividad biológica), una activación o un incremento de toxicidad. Estas últimas tres consecuencias no son favorables al organismo.

#### ➤ Fase II.

Las enzimas que participan en la Fase II del metabolismo generalmente catalizan la adición de pequeñas moléculas polares a los metabolitos o fármacos para hacerlos más polares y de rápida excreción por heces y orina. A estas enzimas se les denomina transferasas, ya que adicionan una sustancia endógena a un xenobiótico o un metabolito del mismo. Las reacciones más comunes son:

- a) Glucoronidación
- b) Sulfatación
- c) Conjugación con glutatión
- d) Metilación
- e) Acetilación
- f) Conjugación con aminoácidos

En general los compuestos químicos son convertidos por enzimas de Fase I en una variedad de metabolitos nucleofílicos ó electrofílicos. La interacción de los electrófilos

más reactivos con macromoléculas celulares de importancia biológica juega uno de los papeles más importantes en los aspectos de la toxicidad de xenobióticos. Adicionalmente, en algunas ocasiones, los metabolitos nucleofílicos más estables y abundantes, pueden ser convertidos a intermediarios reactivos, de naturaleza electrofílica.

Los metabolitos nucleofílicos participan en las reacciones de glucoronidación y sulfatación, dando complejos excretables (4). Estos complejos pueden transformarse en compuestos electrofílicos.

Los metabolitos electrofílicos son conjugados con glutatión para dar moléculas inocuas y más fáciles de excretar. Si esta reacción no se lleva a cabo, las sustancias electrófilas pueden fácilmente atacar moléculas endógenas nucleofílicas como el ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico) y proteínas, ocasionando daños severos.

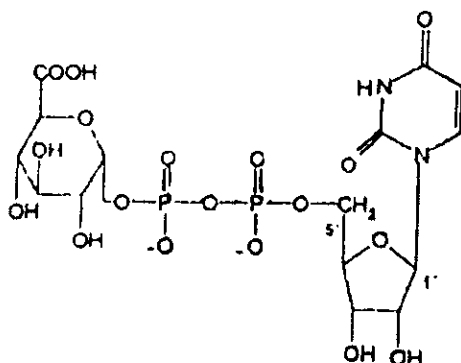
Muchos organismos pueden realizar reacciones de conjugación en determinados órganos y células. En las ratas y seres humanos, la mayoría de las reacciones de Fase II ocurren en el hígado, aunque todos los órganos, incluyendo la piel, tienen cierta capacidad para metabolizar (cuadro 2). En la célula, los sistemas de conjugación están concentrados en las membranas, el citosol, las mitocondrias, los lisosomas y el retículo endoplásmico (5).

Tejido	Acetilación	Amino-ácidos	Glucoro-nidación	Glutatión	Metilación	Sulfatación
<i>Adrenal</i>			+		+	
<i>Vejiga</i>			+			
<i>Células sangre</i>					+	
<i>Cerebro</i>			+		+	
<i>Intestino</i>	+		+	+		+
<i>Riñón</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Hígado</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pulmón</i>	+		+	+	+	
<i>Placenta</i>			+			
<i>Piel</i>			+		+	
<i>Bazo</i>	+		+		+	
<i>Timo</i>			+			

Cuadro 2. Distribución de reacciones de Fase II en el ser humano.

La reacción de glucuronidación es la más abundante e importante, involucra la transferencia de un grupo glucuronilo activado del ácido uridin-5'-difosfo- $\alpha$ -D-glucurónico (UDP-GA) (figura 2) hacia un grupo funcional en el xenobiótico para formar O-, S-, N- ó C- glucuronidación. La enzima que lleva a cabo esta reacción se le denomina uridin difosfato glucuronosiltransferasa. Esta enzima tiene como sustratos todos aquellos xenobióticos nucleofílicos con oxígeno, azufre, nitrógeno o carbono como los alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, tioles, hidroxilaminas y aminas aromáticas; así como compuestos endógenos tales como la bilirrubina y los esteroides.

Figura 2. Ácido uridin-5'-difosfo- $\alpha$ -D-glucurónico (UDP-GA)



Es importante subrayar que la importancia de la glucuronidación radica en la gran variedad de sustancias nucleofílicas a las que se enfrenta el organismo así como de la distribución tan amplia de esta reacción en los distintos tejidos.

Sin embargo, la conjugación con glutatión (figura 3) juega un papel crucial en el metabolismo de xenobióticos debido a las consecuencias ya mencionadas que especies electrofílicas reactivas pueden tener en las células de no ser conjugadas con el glutatión.

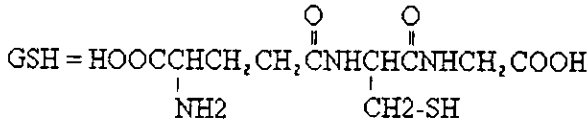


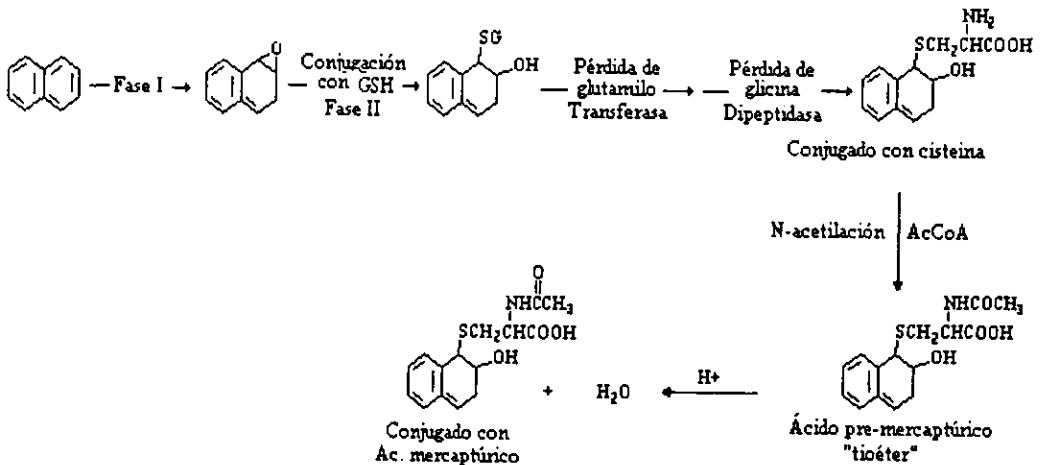
Figura 3. Estructura del glutatión (GSH)  
(L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina)

En la conjugación de xenobióticos (figura 4), especialmente de carácter electrofílico con glutatión, es importante tomar en cuenta la ubicación de las diferentes etapas del proceso:

- Los procesos enzimáticos (al menos siete isoenzimas de la glutatión-S-transferasa) y no enzimáticos para que ocurra la conjugación se llevan a cabo en el citosol.
- La remoción del grupo glutamilo del conjugado por la γ-glutamyltransferasa, la hidrólisis para remover la glicina por medio de dipeptidasas y la N-acetilación del conjugado con cisteína por la acetil coenzima A, para producir el tioéter, son procesos que se llevan a cabo por enzimas unidas a membranas (6).

Los tipos de metabolitos que se pueden conjugar con el glutatión incluyen N-hidroxi-compuestos, uretanos, sulfonamidas, aminas aromáticas, tiofenos, tiazinas, éteres difenilos, halogenados, nitro-compuestos, compuestos con dobles enlaces y sulfatos.

Figura 4. Ejemplo: Metabolismo del naftaleno, conjugación con glutatión (GSH)



Los productos de conjugación se excretan, según su peso molecular por diferentes partes del organismo (cuadro 3).

Metabolito	Excreción
Glucurónido	<250 Da (riñón). >250 Da (hígado)
Conjugados con ácido mercaptúrico	Orina
Conjugados con glutatión	Bilis
Sulfatos	Orina
Conjugados acetilados	Bilis
Conjugados con aminoácidos	Orina

Cuadro 3. Excreción de metabolitos según tipo de reacción de Fase II (6)

## 4.2 El glutatión.

### 4.2.1 Descubrimiento del glutatión.

De Rey-Pailhade, mostró que cuando células de levadura son sembradas en azufre elemental producen ácido sulfhídrico (7). En 1888, de Rey-Pailhade obtuvo evidencia de que las células contienen una sustancia responsable de esta reacción. Se demostró que esta misma sustancia está presente en músculo e hígado de res, cerebro e intestino delgado de borrego, músculo de pescado, clara de huevo y en la punta de espárragos. Él mismo notó que la sustancia era más estable durante el invierno que en el verano, que despintaba algunos colorantes y que la reacción era inhibida en presencia de cloro, yodo y bromo (8).

De Rey-Pailhade sugirió que esta sustancia, a la cual llamó *philothion* (del Griego amor al azufre), tenía un papel biológico importante debido a la aparente ubicuidad en células vivas. De Rey-Pailhade sugirió que *philothion* contenía un hidrógeno lábil y cisteína (9,10). Esta conclusión fue basada en el hecho de que Heffter demostró que muchos extractos de tejido daban positiva la reacción de nitroprusiato, indicando la presencia del sulfhidrilo. Se sugería que el resultado positivo se debía a la presencia de cisteína (11).

Heffter supuso que los compuestos que contienen grupos tioles eran responsables de las propiedades de reducción y oxidación de las células.

Hopkins descubrió que el compuesto responsable de la reacción positiva con nitroprusiato en músculo, hígado y levaduras podía extraerse con agua. Inicialmente pensó que era un dipéptido conteniendo glutamato y cisteína. Hopkins modificó el nombre de *philothion* a *glutathione*. Mientras que *philothion* de de Rey-Pailhade reflejaba la habilidad de reaccionar con azufre, Hopkins demostró la presencia de azufre en el compuesto aislado. Hopkins, y después Kendall, de manera independiente encontraron que el péptido contenía glicina (cuadro 4). La estructura final del glutatión fue deducida con estudios químicos y confirmada después de su síntesis como L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina (12, 13) (figura 3).

<b>Historia de la elucidación de la estructura del GSH (1890-1936)</b>	
1. Philothion = RH <sub>2</sub>	de Rey-Pailhade, 1890
2. R contiene cisteína	Heffter, 1907
3. Dipéptido ( Glu + Cys )	Hopkins, 1921
4. $\gamma$ -Glu-Cys	Quastel <i>et al</i> , 1923
5. $\gamma$ -Glu-Cys (síntesis)	Stewart y Tunnicliffe, 1925
6. Tripéptido ( Glu + Cys + ?Ser )	Hunter y Eagles, 1927
7. Tripéptido ( Glu + Cys + Gly )	Hopkins, 1929; Kendall <i>et al</i> , 1929
8. $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (titulación)	Pirie y Pinhey, 1929
9. $\gamma$ -Glu-Cys-Gly	Kendall, Mason y McKenzie, 1930
10. $\gamma$ -Glu-Cys-Gly y $\gamma$ -Glu-Cys (síntesis)	Harrington y Mead, 1935
11. $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (síntesis)	duVigneaud y Miller, 1936

Cuadro 4. Historia del Glutatión (14)

Desde el descubrimiento del tripéptido, las investigaciones relacionadas con el glutatión han sido muy populares debido a su aparente ubicuidad en todas las células vivas. Meister y su grupo de colaboradores han contribuido con mucho de lo que hoy sabemos

acerca de la bioquímica del glutatión, en especial del concepto del ciclo del  $\gamma$ -glutamil (14).

#### **4.2.2 Propiedades químicas y características del glutatión.**

El glutatión (GSH) es un tripéptido lineal en que la entidad glutamyl está enlazada al grupo  $\gamma$ -carboxilo (figura 3). Este enlace  $\gamma$ -glutamyl hace que la molécula sea resistente a la acción normal de las peptidasas. La entidad tiol del residuo cisteinil está involucrada en las funciones del GSH como reductor y nucleófilo intracelular; es capaz de realizar reacciones de un sólo electrón, incluyendo reacciones de radicales libres con GSH para formar  $GS^\cdot$  (radical libre) el cual se dimeriza para formar GSSG. Los radicales libres surgen de la interacción del oxígeno con ciertos intermediarios, a través de la biotransformación de fármacos y de la radiación ionizante.

El GSH es el péptido tiol más importante en las células y funge como un amortiguador redox esencial. Es capaz de reaccionar de manera reversible con los grupos tioles de las proteínas, péptidos y moléculas de cisteína formando enlaces disulfuros, afectando así los estados de oxidación de compuestos importantes (15). Gracias a que los puentes disulfuro son estructuras fundamentales en la conformación de una proteína, estos mecanismos son capaces de regular la actividad de varias enzimas. Es por esto que el GSSG era llamado tercer mensajero (15).

El GSH es una coenzima para gran número de enzimas como la glioxalasa, formaldehído deshidrogenasa, entre otras (16).

#### **4.2.3 Principales funciones del GSH.**

El GSH tiene muchas funciones celulares. Entre ellas se encuentra el mantener la homeostasis intracelular redox (como fuente de fuerza reductora), la destoxificación de

xenobióticos por conjugación directa utilizando a la glutatión transferasa, la ayuda en la síntesis de varias moléculas (DNA, RNA y ciertos eicosanoides), la destrucción de peróxidos en presencia de la glutatión peroxidasa y la facilitación del transporte de aminoácido. (17, 18).

Todas estas funciones dependen de sus características químicas, en especial de su residuo de cisteína, el cual contiene un grupo sulfhidrido capaz de oxidarse. Esta característica junto con el enlace del  $\gamma$ -glutamil que las peptidasas no pueden cortar, hacen del glutatión una molécula esencial para la célula.

#### 4.2.4 Distribución de GSH y GSSG.

En el hígado, la mayor parte del GSH (99%) se encuentra en forma reducida. Bajo condiciones fisiológicas la relación GSH/GSSG es muy alta debido a la presencia de la enzima glutatión reductasa (GR) que utiliza  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  como cofactor. Además, una mezcla de disulfuros de GSH con tioles de proteínas contribuyen en 0.5% a la cantidad celular total de GSH (19) (cuadro 5).

	<b>GSH</b>	<b>GSSG</b>	<b>GSH/GSSG</b>
Plasma	17.6 ± 1.8	1.0 ± 0.1	17.6
Hígado	7.4 ± 0.4	0.33 ± 0.03	22.4
Riñón	5.0 ± 0.4	0.38 ± 0.03	13.2
Pulmón	2.2 ± 0.2	0.33 ± 0.02	6.7
Corazón	2.3 ± 0.2	0.30 ± 0.02	7.7
Cerebro	2.0 ± 0.2	0.25 ± 0.02	8.0
Músculo esquelético	1.2 ± 0.1	0.17 ± 0.01	7.1

Cuadro 5. Niveles de GSH y GSSG en  $\mu\text{mol/g}$  de peso ó  $\mu\text{mol/l}$  y relación GSH/GSSG en distintos tejidos y órganos. Ratas macho Uje:Wist (n=10) (15).

#### 4.2.4 Metabolismo del Glutatión.

El metabolismo del glutatión es complejo e integra varios compuestos y enzimas (figura 5).





B) Enzimática. A través de la glutatión tiol transferasa (10) o bien, por la reacción con la glutatión peroxidasa (9).

La enzima glutatión disulfuro reductasa (12) convierte el GSSG en GSH utilizando una molécula de NADPH + H<sup>+</sup> y dando sustratos para las demás enzimas como la glutatión S-transferasa (7) que une compuestos de origen endógeno y exógeno al azufre del aminoácido cisteína formando complejos, los cuales pueden ser eliminados por la acción de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (3) después de cortar el dipéptido con la dipeptidasa (4) y de convertir al compuesto en un mercapturo por acetilación de la N-acetiltransferasa (8).

La síntesis y degradación del GSH siguen la ruta general de reacciones involucrando a las enzimas de la (1) a la (6) del ciclo del  $\gamma$ -glutamilo. En este el GSH es sintetizado intracelularmente por las reacciones consecutivas de  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa (1) y glutatión sintetasa (2). Este proceso es inhibido por retroalimentación del producto, es decir, la síntesis esta regulada por la presencia de GSH. La degradación del GSH (y sus complejos) se lleva a cabo por la enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (3), la cual es una enzima de membrana. De esta reacción se forman  $\gamma$ -glutamil aminoácidos.

La formación de  $\gamma$ -glutamil aminoácidos por transpeptidasas y el transporte de ellos hacia el interior de las células ha sido demostrado. Los  $\gamma$ -glutamil aminoácidos transportados son convertidos, con ayuda de la enzima  $\gamma$ -glutamil ciclotransferasa (5) al aminoácido libre correspondiente, liberando 5-oxoprolina que se convierte a glutamato por la 5-oxoprolinasa (6) en presencia de ATP.

El aminoácido receptor más activo como sustrato para la transpeptidasa es la cisteína, sin embargo, otros aminoácidos neutros como la metionina y glutamina son también significativamente activos (14).

#### **4.2.6 Enzimas relacionadas con el glutatión**

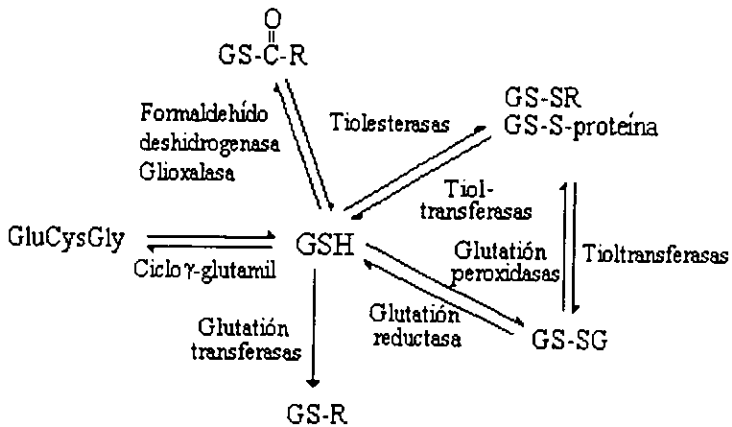


Figura 6. Reacciones enzimáticas ligadas al papel del GSH como un agente intracelular de protección contra productos del metabolismo oxidativo (20)

Como consecuencia del importante papel que juega el glutatión en los organismos vivos, las enzimas que se relacionan con él son varias (figura 6).

La glutación peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos orgánicos formando disulfuro de glutatión (GSSG). La tio-transferasa cataliza la reducción de grupos tioles oxidados en proteínas así como en compuestos de bajo peso molecular. La formaldehído deshidrogenasa y la glioxalasa I catalizan la inactivación de compuestos carbonilos reactivos como el formaldehído y los 2-oxoaldehídos, respectivamente. La glutación transferasa cataliza la conjugación e inactivación de una gran gama de compuestos electrofílicos transfiriendo al glutatión. Finalmente, la glutación reductasa cataliza la regeneración de la forma reducida de GSH a partir del GSSG formado durante las reacciones en las que GSH funge como reductor.

### 1. Glutación reductasa:

La actividad catalítica de la glutatión reductasa (GR) tiene un papel central en la bioquímica del GSH. Su función principal es regenerar el GSH a su forma reducida a partir del GSSG (figura 7).

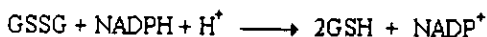


Figura 7. Reacción catalizada por la Glutatión reductasa (GR)

El proceso catalítico normal puede dividirse en dos reacciones parciales: reducción de la enzima por  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  y reoxidación de la enzima reducida por GSSG. Los electrones de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  son dirigidos a la enzima a través del anillo de isoaloxazina de FAD y subsecuentemente a través del enlace disulfuro redox-activo proteico hasta el sustrato aceptor GSSG (21). El enlace disulfuro redox-activo de la enzima está formado por dos residuos de cisteína (en la enzima humana: Cys 58 y Cys 63) localizados en la porción N-terminal de una  $\alpha$ -hélice (22).

## 2. Tioltransferasa:

Los grupos tiol tanto de compuestos de bajo peso molecular como de proteínas, en presencia de oxígeno, pueden oxidarse. Generalmente, los grupos tiol intracelulares deben mantenerse en su forma reducida. La cisteína en su forma reducida es requerida para la síntesis de proteínas y para varios procesos enzimáticos. La reducción de disulfuros (RSSR) a tioles (RSH) sucede con la participación del GSH reducido en dos reacciones consecutivas catalizadas por las tioltransferasas (23) (figura 8).



Figura 8. Reacción catalizada por la Tioltransferasa

Además de reducir disulfuros y derivados S-sulfo, la tioltransferasa tiene la capacidad de mantener los grupos sulfhidrilos de las proteínas en su estado reducido. Se sabe que varias enzimas y proteínas, en presencia de aire sufren modificaciones oxidativas en sus

grupos sulfhidrilos. Se ha demostrado que la inactivación oxidativa de estas enzimas puede prevenirse con GSH en presencia de tioltransferasa.

### **3. Formaldehído deshidrogenasa y Glioxalasa I:**

La formaldehído deshidrogenasa y la glioxalasa I tienen muchas propiedades en común. Ambas catalizan la inactivación de aldehídos reactivos, en cada caso después de la formación no enzimática del tiohemiacetales entre el aldehído y el grupo tiol del GSH. Este compuesto tiohemiacetal es convertido a su tiolester correspondiente por la reacción enzimática. Esta conversión es equivalente a la oxidación del grupo aldehído para dar un ácido carboxílico. Los correspondientes ácidos carboxílicos son liberados luego de la hidrólisis de los tiolesteres de glutatión por las tiolesterasas, regenerando así el GSH.

### **4. Glutatión transferasas:**

Las glutatión transferasas (GT) son una familia de enzimas que catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre del glutatión al centro electrófilo de una variedad de compuestos endógenos y exógenos (reacciones de Fase II del metabolismo de xenobióticos.)

El sitio activo de las glutatión transferasas se compone por dos subsitios, uno para la unión del glutatión (G-sitio) y el otro, parcialmente hidrofóbico, para la unión del segundo sustrato electrofílico (H-sitio) (24). Algunas líneas de evidencia sugieren que la unión del GSH se acompaña con un cambio conformacional de la enzima. Por lo que se ha planteado que la especificidad observada del glutatión como sustrato tiol se debe, en parte, a la estructura de transición que genera la unión del tripéptido, en vez de la unión del tiol. Esta unión hace que la enzima sea competente para catalizar el ataque nucleofílico del grupo tiol al centro electrofílico del segundo sustrato (25).

En relación al papel propuesto para el glutatión, de que protege contra productos del metabolismo del oxígeno, es claro que la glutatión transferasa cataliza la inactivación de

## 4.2.8 Modulación del Metabolismo de Glutación.

El desarrollo de inhibidores enzimáticos selectivos con actividad *in vivo* ha sido de gran importancia para la elucidación de la bioquímica del GSH y para la comprensión de la relación entre esta bioquímica y las diversas funciones del GSH. Estudios en errores innatos del metabolismo del GSH también han sido de gran ayuda para este proceso (14).

Ciertas modulaciones del metabolismo del GSH son de interés potencialmente terapéutico (30, 31). El descenso en la capacidad celular de sintetizar GSH y la baja en los niveles de GSH sensibiliza ciertas células tumorales y parásitos a los efectos de agentes quimioterapéuticos y a la radiación. La resistencia de algunos tumores a distintos fármacos y a la radiación está asociada con la capacidad incrementada de síntesis de GSH.

Se han buscado métodos para incrementar los niveles celulares de GSH (30). La capacidad incrementada de síntesis de GSH protege a la célula contra compuestos tóxicos, daño oxidativo y radiación.

### a) Inhibición de la síntesis del GSH.

Los niveles celulares de GSH pueden disminuirse de distintas maneras (14). La forma más útil es por la inhibición de la  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa. Un inhibidor irreversible de esta enzima es la butionina sulfoximina (BSO) (32) (figura 9), por lo que se ha utilizado en diversos estudios bioquímicos del metabolismo del GSH. BSO es un homólogo superior de la metionina sulfoxamina (MSO) (figura 9), que es un agente convulsionante e inhibidor de la glutamina sintetasa y de la  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa (33).

La administración de MSO lleva a la inhibición de la síntesis de glutatión, pero el uso de este compuesto en el trabajo experimental y en terapias es muy limitado debido a los efectos convulsionantes y letales de la L-metionina-S-sulfoxamina, que resulta de la inactivación de la síntesis de glutamina en el cerebro.

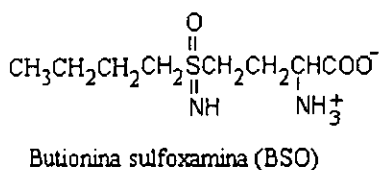
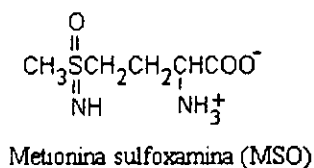


Figura 9. Estructuras de MSO y BSO

Sin embargo, BSO disminuye la síntesis de GSH sin inactivar significativamente la síntesis de glutamina debido a que existe un impedimento estérico.

Estudios subsecuentes han encontrado otros compuestos capaces de inhibir la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa sin afectar la síntesis de glutamina.

#### **b) Otros inhibidores específicos del metabolismo del GSH.**

La conversión de 5-oxoprolina a glutamato por la 5-oxoprolinasa, y la reacción catalizada por  $\gamma$ -glutamilciclotransferasa pueden ser inhibidas de manera selectiva. La  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa puede ser inhibida por inhibidores competitivos y por inactivadores que se unen de manera irreversible a la enzima. Esta inhibición e inactivación de las enzimas *in vivo* ha dado modelos animales para enfermedades humanas. Se han descrito deficiencias del nacimiento en humanos de la  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa, glutatión sintetasa,  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, 5-oxoprolinasa, glutatión disulfuro reductasa, y glutatión peroxidasa.

**c) Efectos de la inhibición de la síntesis de GSH. Sensibilización de tumores al tratamiento por radiación y agentes químicos.**

La administración de BSO a ratones lleva a una deficiencia importante de niveles de GSH en hígado, riñón y otros tejidos debido a que la síntesis de GSH es inhibida casi por completo.

Estudios han demostrado que existen dos depósitos intracelulares importantes de GSH: mitocondria y citoplasma. Los niveles en estos dos reservorios son independientes, por lo que algunos autores pensaban que la membrana mitocondrial es impermeable al GSH, y el GSH en este organelo surgía de una síntesis intermitocondrial. Sin embargo, se descubrió que la mitocondria no tiene las enzimas necesarias para realizar la síntesis completa de GSH (34).

La disminución de los niveles de GSH en músculo lleva al daño mitocondrial cuando éste llega a niveles del 3% respecto a los controles (35). Las mitocondrias del músculo cardíaco aparecen normales después de una disminución de hasta 8% de los niveles normales de GSH. Estos descubrimientos son consistentes con la creencia de que los tejidos normales contienen un gran exceso de GSH.

Por otro lado, la disminución de GSH en células linfoides humanas a través de la adición de BSO en el medio provoca un aumento en la sensibilidad a radiación cuando la concentración intracelular de GSH está al 3% de los valores controles (36).

Es actualmente aceptado que la deficiencia de GSH celular provoca que la célula sea más sensible a la radiación, al estrés oxidativo, y a ciertos fármacos. La pérdida de GSH también lleva a la disminución en la síntesis de leucotrienos y prostanglandinas, inhibición de la termotolerancia, baja en la respuesta linfocitaria a mitógenos, y un aumento en la respuesta a teratógenos (14).



Esta oxotiazolidina no es tóxica es transportada dentro de las células donde es efectivamente dividida por la enzima 5-oxoprolinasa a L-cisteína y bióxido de carbono.

## 2. Administrar mono(glicil) ésteres de glutatión.

El descubrimiento de que el GSH no es transportado hacia las células dio pie a que se estudiaran distintos derivados de GSH con la finalidad de encontrar aquellos que son capaces de ser transportados al interior de la célula y convertidos a GSH intracelularmente. Este esfuerzo condujo a la observación de que los monoésteres de GSH, por ejemplo  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicietil éster (figura 11), era transportado al interior de muchas células y luego convertido a GSH (35).

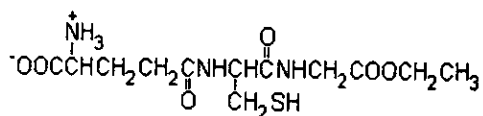


Figura 11.  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicietil éster

Los monoésteres de glutatión administrados son transportados a varios órganos, incluyendo hígado, riñón, páncreas, bazo, pulmones, corazón y músculo esquelético. Ratonos tratados con BSO y después con monoésteres de glutatión muestran un incremento importante en los niveles de GSH en hígado y riñón comparados con los controles (a los cuales se les administró GSH).

Los monoésteres de glutatión protegen a ratones contra los efectos letales del cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) (40). Los monoésteres de glutatión protegen los linfocitos humanos contra los efectos de la radiación (14). Estudios recientes han mostrado que la administración de BSO lleva a la formación de cataratas en ratas recién nacidas; estos descubrimientos han sido confirmados en ratas y ratones, encontrando que una administración simultánea del monoéster de glutatión previene el desarrollo de cataratas (41).

## 4.3 Requerimientos nutricionales del hombre

Los humanos, como muchos animales, deben obtener sus elementos nutritivos consumiendo otros organismos. El alimento que los humanos consumen está compuesto de varios tipos de moléculas orgánicas necesarias para mantener la salud: carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales.

**Carbohidratos.** Son moléculas orgánicas, también llamados hidratos de carbono debido a que generalmente tienen la siguiente fórmula condensada:  $C_x(H_2O)_y$ . También son conocidos como sacáridos (del latín *saccharum*, azúcar) teniendo siempre como sufijo *-osa*. De esta manera se tienen a la sacarosa, para el azúcar de mesa; glucosa, para el principal azúcar de la sangre; y maltosa, para el azúcar de malta (44).

Los carbohidratos más simples, que no pueden ser hidrolizados para dar carbohidratos más pequeños, son llamados *monosacáridos*. Un carbohidrato que al ser hidrolizado da dos equivalentes de monosacáridos es llamado *disacárido*. Aquellos que generan de 2 a 10 moléculas de monosacáridos son conocidos como *oligosacáridos*, mientras que los que generan más de 10 se llaman *polisacáridos*. La maltosa y sacarosa son ejemplos de disacáridos; formados por 2 glucosas y una glucosa con una fructosa, respectivamente. La celulosa y almidón son ejemplos de polisacáridos formados por polímeros de glucosa (figura 12).

Dependiendo del número de carbonos que cada monosacárido tiene se le puede clasificar como: triosa, 3; tetrosa, 4; pentosa, 5; hexosa, 6; etc. Por otro lado, pueden encontrarse con un grupo aldehído (aldosas) o grupo cetona (cetosas). De esta forma la glucosa es una aldohexosa (tiene grupo aldehído y cuenta con 6 átomos de carbono en su esqueleto).

Los carbohidratos tienen varios centros quirales. Dependiendo de hacia donde desvían la luz polarizada pueden clasificarse como D (dextrógiros) o L (levógiros) (figura 12). Los carbohidratos que metaboliza el ser humano son D debido a que los sitios activos de nuestras enzimas no reconocen los L.

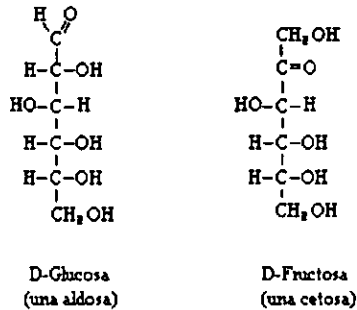


Figura 12. D-Glucosa (aldosa) y D-Fructosa (cetosa); ambas hexosas.

**Lípidos.** Son un grupo de moléculas orgánicas que incluyen grasas y aceites, los cuales se disuelven en disolventes no polares. La palabra lípido proviene del griego *lipos*, que significa grasa. No tienen una estructura base definida, como los carbohidratos y proteínas, por lo que los lípidos se clasifican por la operación física utilizada para aislarlos.

Los lípidos tienen varias funciones principales, entre ellas están la de proveer con energía a la célula, formar parte de las membranas celulares y constituir algunas hormonas (45).

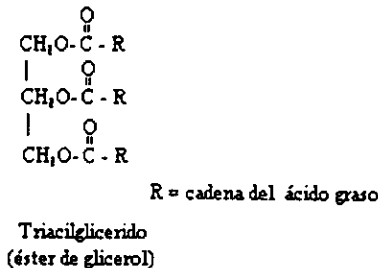


Figura 13. Fórmula base del triacilglicerido

Los triacilglicéridos son lípidos formados por ésteres de glicerol con ácidos grasos (cadenas hidrocarbonadas con grupo carboxilo) y comprenden a los aceites, así llamados cuando a temperatura ambiente son líquidos (como el aceite de girasol o maíz) y a las grasas, llamadas así cuando son sólidos (como la mantequilla). Los triacilglicéridos (figura 13) pueden ser simples, cuando los tres ácidos carboxílicos son idénticos; o bien mixtos, cuando los grupos acilos son diferentes entre sí (44) (figura 13).

Los triacilglicéridos en los animales tienen como función principal ser una reserva de energía. Cuando los triacilglicéridos son convertidos a dióxido de carbono y agua por las reacciones bioquímicas del metabolismo generan más del doble de calorías por gramo que los carbohidratos o proteínas. Esto es por que los carbonos en los lípidos se encuentran en un estado más reducido que los de un carbohidrato por lo que al oxidarlos hay una mayor ganancia de electrones y energía.

En los animales, células especializadas llamadas adipocitos sintetizan y almacenan a los triglicéridos. El tejido formado por estas células, se localiza generalmente en la capa subcutánea de la cavidad abdominal. El hombre tiene un contenido de grasa aproximado de como 21% de su peso corporal, mientras que las mujeres 26%. Este contenido de grasa es suficiente para mantener hambrunas de hasta 2 a 3 meses. En contraste, nuestras reservas de carbohidratos (en forma de glucógeno) son suficientes sólo para un día (46).

Las membranas biológicas están constituidas de fosfolípidos, que son moléculas formadas por una molécula de glicerol, dos de ácido graso y una de fosfato. Los fosfolípidos alineados en bicapa permiten que la célula exista como entidad; siendo una barrera semipermeable.

Otro grupo de lípidos son los terpenos y terpenoides, encontrados en los aceites esenciales de las plantas. Tienen esqueletos de 10, 15, 20 o 30 átomos de carbono formados por unidades de isopreno (con 5 átomos de carbono) (figura 14).

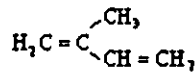


Figura 14. Isopreno

Los esteroides son reguladores biológicos importantes; entre ellos se encuentran las hormonas sexuales femeninas y masculinas, las hormonas adrenocorticales, la vitamina D, los ácidos biliares, el colesterol, entre otros. Los esteroides son derivados de la estructura base del anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno (44) (figura 15).

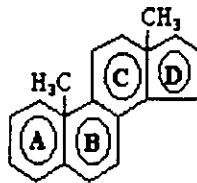


Figura 15. Anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno

**Proteínas.** Son moléculas complejas compuestas de subunidades repetidas de aminoácidos. Las proteínas tienen diversas funciones en el cuerpo. Son una fuente importante de aminoácidos para formar nuevas proteínas; constituyen diversos tejidos como los músculos, así como al pelo y uñas; funcionan como catalizadores llamados enzimas y pueden metabolizarse para generar energía (45).

Existen 20 aminoácidos diferentes requeridos por el cuerpo para su buen funcionamiento. El organismo puede sintetizar 12 de ellos, a partir de otros compuestos como carbohidratos. Sin embargo, las células humanas carecen de la capacidad de sintetizar los otros 8 por lo que se conocen como aminoácidos indispensables (isoleucina, leucina,

lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina). Estos deben ser proveídos por los alimentos.

La estructura básica de un aminoácido (figura 16) consta de un grupo amino, un carboxilo y un radical, el cual confiere las características específicas a cada aminoácido. Si el radical es un hidrógeno, tendremos al aminoácido más sencillo, la glicina. Sin embargo, este radical puede contener un grupo hidroxilo, dando un carácter más polar al aminoácido; un grupo amino, que le da características básicas; un grupo carboxilo, que le da características ácidas; grupos fenilos, dándole características "no polares"; o hasta un grupo sulfhidrilo, dándole la capacidad de formar enlaces disulfuro con otras moléculas (44).

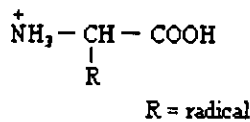
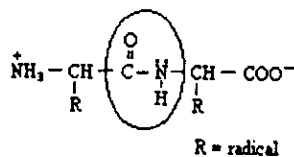


Figura 16. Estructura base de un aminoácido

Los aminoácidos pueden desviar la luz polarizada por lo que son D (dextrógiros) o L (levógiros). Aquellos que consume el organismo son aminoácidos L.

El grupo amino de un aminoácido puede reaccionar con el grupo carboxilo de otro para formar un enlace peptídico o peptídico (figura 17). La formación de este enlace libera una molécula de agua. La secuencia de varios aminoácidos formando enlaces peptídicos forma un polipéptido.

Figura 17. El enlace dipéptidico entre dos aminoácidos forma un dipéptido



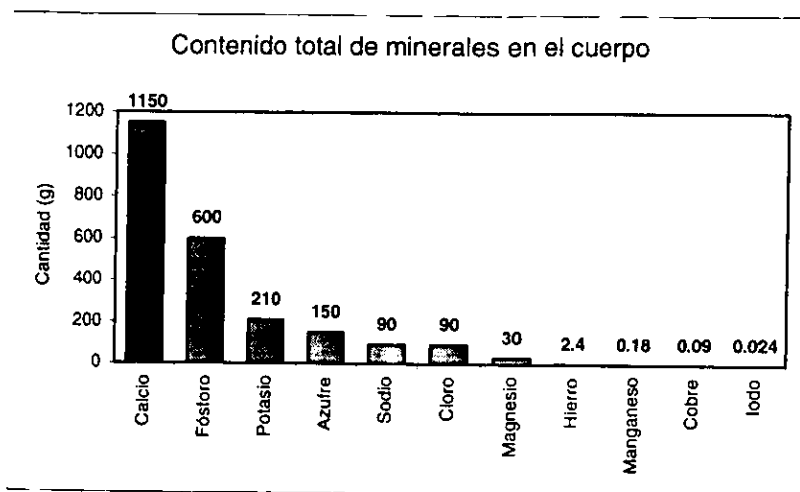
La secuencia exacta de los diferentes aminoácidos a lo largo de una proteína se conoce como la estructura primaria. Es de fundamental importancia que la estructura primaria, secundaria y terciaria sea conservada en una proteína para que pueda llevar a cabo su función.

Debido a que cada aminoácido tiene propiedades químicas determinadas, dadas por el grupo R, los aminoácidos de la estructura primaria pueden acomodarse para adquirir una estructura más compleja de menor energía potencial. A esta estructura se le conoce como estructura secundaria. El conjunto de estructuras secundarias dentro de una proteína llevan a la conformación espacial llamada estructura terciaria. Ya que la proteína tiene su estructura terciaria de baja energía es capaz de llevar a cabo sus funciones específicas. Algunas proteínas requieren de una estructura cuaternaria, la cual consiste en agrupar distintas subunidades proteicas con estructura terciaria (45).

Además de los carbohidratos, lípidos y proteínas, los humanos requerimos de minerales, vitaminas y agua en nuestra dieta.

**Minerales.** Son elementos inorgánicos esenciales para distintas funciones del cuerpo. Los minerales son ingeridos en forma de sales disueltas en alimentos y agua o bien, acompañados de compuestos orgánicos. Forman el 4% del peso corporal total y se concentran en mayor proporción en el sistema óseo. Se sabe que, al menos 18 de ellos, son esenciales para realizar diversas funciones elementales para la vida. Los minerales están clasificados en dos grupos: mayores y menores. Diariamente, nuestro cuerpo requiere más de 100 miligramos de los minerales mayores y menos de 100 miligramos de los menores. Los minerales mayores son: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio y azufre. Los menores, o minerales traza, son: boro, cromo, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, silicio, vanadio y zinc (47) (cuadro 6).

Cuadro 6. Contenido total de minerales en el cuerpo (g) (50)



**Vitaminas.** Son moléculas orgánicas complejas que se requieren en muy pequeñas cantidades en el cuerpo humano. Estas sustancias fueron descubiertas hasta el siglo XX. Sin embargo, en 1880 Nikolai Lunin realizó un experimento en que alimentó a ratones con concentrados alimenticios puros que contenían todos los principios nutritivos conocidos hasta entonces; los ratones murieron enfermos a las pocas semanas. Por otro lado dio leche a otro grupo de ratones observando que se mantenían sanos. Con este experimento concluyó que la leche contiene alguna sustancia fundamental para la adecuada alimentación no descubierta hasta entonces. Hoy en día se conocen 13 vitaminas clasificadas en dos grupos: las liposolubles (A, D, E y K) y las hidrosolubles (C y los ocho miembros del complejo B). Todas desempeñan un papel fundamental en la química del cuerpo, y la falta de cualquiera de ellas puede provocar alguna enfermedad. A diferencia de los carbohidratos, proteínas y lípidos; las vitaminas no proporcionan energía o sirven como materiales estructurales. La función principal de las vitaminas es regular los procesos fisiológicos. Algunas de las vitaminas funcionan como coenzimas. Mientras que las plantas sintetizan la mayoría de las vitaminas, los animales debemos adquirirlas de la dieta (46, 47) (cuadro 7).



VITAMINA	DESCUBRIDOR	AÑO	DOSIS RECOMENDADA DIARIA	ENFERMEDAD POR DEFICIENCIA
A, retinol	McCollum/Davis	1913	5,000 I.U.	Ceguera nocturna, desarrollo lento de huesos
D, calciferol	McCollum	1922	100-400 I.U.	Raquitismo, Osteomalacia.
E, tocoferol	Evans/Bishop	1923	100-800 I.U.	Anemia hemolítica, distrofia muscular
C, ac. ascórbico	Szent-G./King	1932	100-1,000 mg	Escorbuto, anemia
B2, riboflavina	Gyorgy/Kuhn	1933	10-50 mg	Cataratas, úlcera córnea, dermatitis
K, fitonadiona	Dam	1935	60-300 µg	Hemorragias
B1, tiamina	Williams	1936	10-100 mg	Beriberi, Polineuritis
B6, piridoxina	Birch/Gyorgy	1936	25-100 mg	Dermatitis de ojos, nariz y boca
B3, Niacina	Elvehjem	1937	10-100 mg	Pelagra
Ac. Pantoténico	Williams	1938	25-100 mg	Espasmos musculares, baja producción hormonal
Biotina	Gyorgy	1940	100-300 µg	Depresión mental, dolor muscular
Ac. Fólico	Mitchell/Snell	1944	400 µg	Anemia macrocítica
B12, cianocobalamina	Shorb/Rickes	1948	400 µg	Anemia perniciosa, ataxia, alteración en actividad de osteoclastos

Unidades: I.U. unidades internacionales; mg miligramos; µg microgramos

**Cuadro 7. Cuadro de Vitaminas (Descubridor, Año de descubrimiento, Dosis Recomendada Diaria y Enfermedades Asociadas con su Deficiencia) (46, 47, 48, 49, 50)**

### 4.3.1 Deficiencias nutricionales

En 1966 aproximadamente 840 millones de personas no tenían acceso a una buena alimentación necesaria para llevar a cabo sus actividades diarias. Para 1995, las regiones en el mundo con la mayor inseguridad alimenticia fueron el Sur de Asia, con un estimado de 270 millones de personas y Africa del Sur (países al sur del Desierto del Sahara) con un estimado de 175 millones (51).

El adulto humano debe consumir un promedio de 2600 kilocalorías diarias (los hombres 3000 y las mujeres 2200). Si una persona consume menos de estos requerimientos a lo largo de un periodo extendido de tiempo su estado de salud y ánimo declinan, hasta llegar a la muerte. Las personas que reciben menos calorías de las requeridas se dice que están **desnutridas**. Aproximadamente 185 millones de niños menores de 6 años están seriamente por debajo del peso requerido para su edad en el mundo (49).

El número de calorías ingeridas no es la única medida de una buena nutrición. Una persona puede recibir suficientes calorías en sus dietas pero estar **malnutrida** porque no está recibiendo suficientes calorías de ciertos alimentos requeridos; como proteínas o vitaminas. Por ejemplo, una persona que basa su alimentación en el consumo de arroz puede obtener suficientes calorías, sin embargo su dieta tendrá grandes carencias de proteínas, vitaminas, lípidos y minerales para mantener el buen funcionamiento de su organismo. Los adultos que sufren de malnutrición son más susceptibles a las enfermedades y tienen menos fuerza para trabajar productivamente que aquellos con alimentación completa. Los niños malnutridos no crecen y se desarrollan como los bien nutridos; la malnutrición afecta el desarrollo cognoscitivo por lo que estos niños pueden tener problemas de aprendizaje. En algunos casos la malnutrición puede llegar no sólo a que enfermedades oportunistas invadan el organismo por la debilidad del sistema inmune del niño, sino que en casos extremos, puede llevar a coma y finalmente a la muerte (49, 51).

En países subdesarrollados, la malnutrición se asocia con la deficiencia de ciertos nutrientes o contenido calórico. La malnutrición también ocurre en países desarrollados, sin embargo en estas naciones la malnutrición es generalmente en forma de **sobre-nutrición**, la cual conduce a la obesidad, asociada con severos problemas de salud. Una enfermedad que surge directamente por la falta de algún nutriente como carbohidratos, proteínas, lípidos, minerales o vitaminas se conoce como **deficiencia nutricional**. La principal causa de estas enfermedades es la pobreza extrema en que viven ciertas comunidades obligándolas a tener dietas no balanceadas (49).

Existen tres tipos de enfermedades por deficiencias nutricionales:

- a) Malnutrición proteica y energética (PEM)
- b) Enfermedades por deficiencia de minerales
- c) Enfermedades por deficiencia de vitaminas

Por la temática de esta tesis se expondrá solamente la primera deficiencia; es decir PEM.

Etapa de la Vida	Enfermedad Nutricional más Común	Consecuencias Principales
Embrión/Feto	RCIU, deficiencia de folato y/o yodo	Bajo peso al nacer, daño cerebral, defecto del tubo neural, mortinato
Neonato	Bajo peso al nacer, deficiencia de yodo	Retardo en crecimiento y desarrollo, anemia temprana, daño cerebral
Infante/Niño	PEM, DVA, ADH, deficiencia de yodo	Retardo en desarrollo, alto riesgo de infecciones, anemia, ceguera, muerte
Adolescente	PEM, ADH, deficiencia de folato, yodo y/o calcio	Retardo en desarrollo físico e intelectual, baja estatura, alto riesgo de infecciones, anemia, ceguera, bocio, mineralización inadecuada de huesos,
Madres en lactancia o embarazadas	PEM, ADH, DVA, deficiencia de folato, yodo y/o calcio	RCIU-insuficiente aumento de peso, anemia materna, mortalidad materna, ceguera, alto riesgo de infecciones
Adultos	PEM, ADH, obesidad, cáncer	Letargia, obesidad, diabetes, enfermedades coronarias, anemia, hipertensión, ataque
Tercera edad	PEM, ADH, obesidad, cáncer, osteoporosis	Obesidad, fracturas de cadera, diabetes, enfermedades coronarias

RCIU=(IUGR) Retardo en crecimiento intrauterino; PEM=Malnutrición proteica y energética; ADH=(IDA) Anemia por deficiencia de hierro; DVA= (VAD)Deficiencia de vitamina A

Cuadro 8. Relación de la Enfermedad Nutricional más Común (y sus principales consecuencias), con la Etapa de la Vida. (51, 52)

La malnutrición puede afectar al ser humano en cualquier etapa de su vida. Desde el momento de su concepción hasta su muerte cada elemento nutritivo tiene distintos efectos en la composición, funcionamiento y desarrollo de su organismo (cuadro 8).

#### a) **Malnutrición proteica y energética (PEM)**

Lograr los requerimientos energéticos es fundamental para sobrevivir; la forma en que este requerimiento se logra, a base de energías proteicas o no-proteicas, determina el tipo de malnutrición proteica y energética (PEM) producido. El síntoma más común de la PEM es el crecimiento retardado del cuerpo, conduciendo a la pérdida de peso y altura. El índice de mortalidad varía entre 15 y 40%.

En los países en desarrollo del mundo, durante 1995, hubieron aproximadamente 10.4 millones de muertes de niños menores de 5 años, de estas, 5.1 millones se debieron a PEM (el 49%). Actualmente, un estimado de 167.9 millones de niños menores de 5 años, es decir, el 27.4% de la población de niños de esa edad, están desnutridos (en términos de peso para la edad). Sin embargo, esta cifra muestra un progreso cuando se compara con los 198.6 millones de niños en estas condiciones en 1975 (el 36.4% de la población menor de 5 años) (52).

Asia, especialmente el sur, cuenta con el 78% de los niños desnutridos en el mundo; el 21% se encuentra en Africa y sólo el 3% en America Latina.

Las enfermedades más comunes a las que conduce el PEM son:

- 1) Kwashiorkor
- 2) Marasmo

Una dieta con calorías no-proteicas excesivas provenientes de carbohidratos, pero deficiente de proteínas totales y aminoácidos esenciales resulta en el **kwashiorkor**. El consumo inadecuado de energía y nutrimentos provoca inanición, que en los infantes se

conoce como **marasmo**. Las formas intermedias son llamadas **kwashiorkor-marásmico** (49).

El **kwashiorkor**, que significa "niño rechazado" en el idioma nativo de Ghana, es una malnutrición proveniente de una deficiencia en proteínas de la dieta. Puede suceder a pesar de que el niño, generalmente entre 1 y 5 años de edad, consume cantidades adecuadas de carbohidratos.

El kwashiorkor es común en niños de las zonas rurales de Africa, del Caribe e Islas del Pacífico: donde los alimentos como el camote y el plátano verde son pobres en proteínas y ricos en almidón. La enfermedad comienza cuando la madre deja de amamantar al bebé con leche materna y sustituye su alimentación con carbohidratos. El exceso de carbohidratos son almacenados en forma de grasa y debido a la falta de aminoácidos no hay síntesis proteica; este desbalance bioquímico provoca la mayoría de signos y síntomas.

Los síntomas principales incluyen edema general (por retención de fluidos), cabello seco, quebradizo y rojizo, apatía, irritabilidad, crecimiento retardado, pérdida de peso, hepatomegalia (por la acumulación de grasa en el hígado), anemia y algunas veces retraso mental. Los signos característicos del kwashiorkor son la inflamación pronunciada del abdomen que resulta de la retención de agua por el desbalance de fluidos y la pigmentación de la piel, la cual además se llena de escamas. Si se hace una química sanguínea, es evidente que la hipoalbuminemia es pronunciada.

El kwashiorkor puede ser tratado con una dieta rica en proteínas; ya sean de origen animal como la carne o el pescado, o bien, de origen vegetal como el trigo, cacahuete y otros granos. Sin embargo el crecimiento ideal nunca va a ser alcanzado. Un kwashiorkor severo dejará secuelas físicas y mentales irreversibles en el niño.

El **marasmo**, del griego *marasmos*, que significa consumirse, es una demacración progresiva ocasionada por una dieta baja tanto en calorías totales como en proteínas

ocasionando que el niño se autoconsuma. El marasmo es frecuente en niños menores de un año (infantes) que dejan de ser amamantados con leche materna de forma abrupta y proveídos de comida menos nutritiva deficiente de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Generalmente estos niños son alimentados con leche de vaca diluida, la cual no es apropiada para permitir el desarrollo y crecimiento normal del niño. Esta enfermedad es frecuente particularmente en familias de bajos recursos en países en desarrollo. Los niños que sufren de marasmo presentan pérdida rápida de peso, hambre excesiva, un lento desarrollo y crecimiento, digestión intestinal dañada y atrofia extrema de músculos. Los signos más frecuentes son pliegues de piel que no alcanzan a los huesos y la prominencia de las costillas. Es posible revertir los efectos del marasmo con una dieta adecuada.

La pérdida de cosechas, provocada por sequías, guerras, inundaciones u otros eventos catastróficos pueden conducir a una severa escasez de alimentos, o hambruna. A través de la historia, han habido grandes hambrunas en ciertas regiones de la Tierra. Los países en desarrollo de África, Asia y América Latina son los de mayor riesgo (49). La peor hambruna en la historia sucedió de 1983 a 1985 en Africa, causada principalmente por una sequía severa. Etiopía y Sudán fueron los países más afectados, 1.5 millones de personas murieron de hambre. Más recientemente, en Somalia, debido a la sequía e inestabilidad civil, hubo una sequía que afectó 2 millones de personas.

A pesar de que las hambrunas adquieren gran atención del mundo, hay más gente que muere de malnutrición y sub-nutrición que de hambre asociada a hambrunas.

Consumir más comida que la requerida se conoce como **sobre-nutrición**. Generalmente, una persona que sufre de sobre-nutrición tiene una dieta alta en grasas saturadas de origen animal, azúcar y sal. La sobre-nutrición ocasiona obesidad, alta presión sanguínea, y propensión a enfermedades como diabetes y enfermedades coronarias. En experimentos de nutrición, la sobre-nutrición de roedores resultó con una mayor incidencia de cáncer que en los controles, sin embargo, la evidencia de esta relación en humanos es aún débil. Muchos estudios en humanos muestran una correlación entre dietas con alto contenido de

grasas animales (carne roja) y algunos tipos de cánceres (colon y próstata). La sobrenutrición es más común en países desarrollados, sin embargo está comenzando a emerger en zonas urbanas de países subdesarrollados.

Evidencia reciente ha demostrado que de los aproximadamente 10 millones de casos de cáncer ocurridos en 1996, el 30-40% de ellos (3-4 millones cada año) pueden ser prevenidos con dietas apropiadas, actividad física y control de peso corporal.

#### **4.4 Análisis de los Niveles de Nutrición en México.**

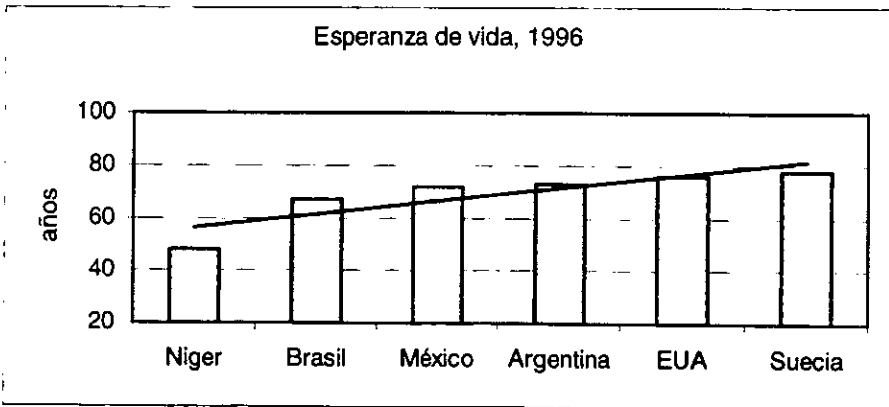
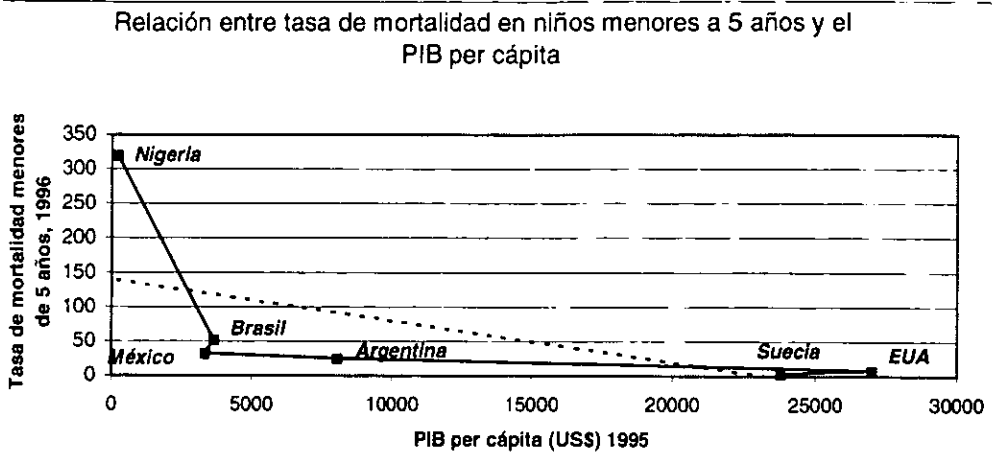
Por muchos años se consideró que la desnutrición era un problema únicamente biológico, en virtud de que cuando se manifiesta debe ser atendida a través de los servicios médicos. Sin embargo, desde 1943, en diversos foros nacionales e internacionales se llamó la atención sobre la asociación con la pobreza, malas condiciones socio-económicas, la falta de conocimientos y estilos de vida inadecuados (53).

En México, a partir de 1970 se observó que los problemas relacionados con el estado nutricional de la población se estaban polarizando, en un extremo se encontraba la población de mujeres embarazadas y en periodo de lactancia y los niños menores de cinco años en riesgo de presentar desnutrición por deficiente ingesta de alimentos; mientras que en el otro extremo, se encontraba la población adulta con mayor riesgo de padecer mala nutrición por exceso de ingesta. Este fenómeno de polarización se hizo evidente en la mortalidad, en donde, de las diez principales causas de muerte, ocho estuvieron directamente relacionadas de una u otra forma con el estado nutricional de la población. A éste fenómeno, no exclusivo de nuestro país, se le denomina transición epidemiológica (54).

Según el Reporte "The State of the World's Children 1998" (52), publicado anualmente por UNICEF, México ocupó, en 1996, el lugar 102 en la lista de países con mayor tasa de mortalidad de niños menores de 5 años (TMM5). México contó con una TMM5 de 32 para 1996, mientras que en el mismo año Niger tuvo TMM5 de 320, Brasil de 52,

Argentina de 25, Estados Unidos de América (EUA) de 8 y Suecia de 4. Comparando algunos indicadores básicos como el producto interno bruto per cápita (PIB per cápita) y la esperanza de vida en estos países obtenemos tendencias interesantes con la TMM5 (cuadros 9 y 10).

Cuadro 9. Relación entre la TMM5 (1996) y el Producto Interno Bruto per cápita (1995) (US\$)



Cuadro 10. Esperanza de vida (años) para 1996 en los países comparados (52)



Las tendencias generales nos permiten concluir que los niveles económicos de un país repercuten, directamente, en los aspectos sociales (de salud y nutrición) de la población en general.

## Situación de México.

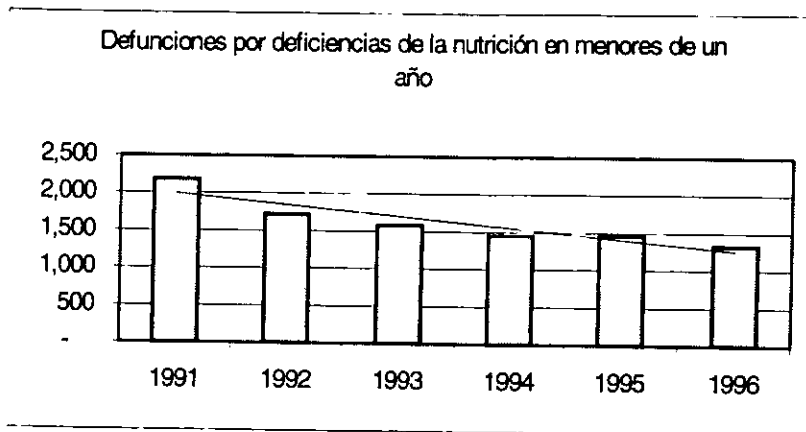
En los pasados párrafos ubicamos a México en el entorno mundial. Pero es conveniente observar con mayor detalle la situación específica de nuestro país.

Según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), las deficiencias de la nutrición ocupan la quinta causa de defunciones en niños menores de un año (cuadro 11).

Causas	1991	1992	1993	1994	1995	1996
1 Afecciones originadas en periodo perinatal	22,356	21,759	20,954	20,584	20,503	19,703
2 Anomalías congénitas	6,887	6,963	6,783	7,274	7,383	7,147
3 Neumonía e influenza	7,359	6,980	6,108	6,615	5,975	5,770
4 Enfermedades infecciosas intestinales	7,678	5,153	4,726	3,925	3,500	2,915
<b>5 Deficiencias de la nutrición</b>	<b>2,187</b>	<b>1,715</b>	<b>1,582</b>	<b>1,454</b>	<b>1,463</b>	<b>1,326</b>
6 Accidentes	1,224	1,239	1,111	1,184	1,265	1,228
7 Infecciones respiratorias agudas	1,235	1,147	888	1,074	980	877
8 Septicemia	645	567	641	752	710	712
9 Bronquitis crónica, enfisema, asma	737	737	720	662	603	586
10 Enfermedades de corazón	319	343	358	382	361	339
11 Meningitis	338	287	302	268	270	269
12 Nefritis, síndrome nefrítico, neurosis	213	266	284	245	248	260
13 Anemias	271	177	213	207	217	192
14 Obstrucción intestinal (sin hernia)	151	117	118	115	111	85
15 Homicidios y lesiones por otra persona	143	122	112	115	140	129
Otras	5,348	4,930	4,731	4,449	4,294	4,169
<b>TOTAL</b>	<b>57,091</b>	<b>52,502</b>	<b>49,631</b>	<b>49,305</b>	<b>48,023</b>	<b>45,707</b>

Cuadro 11. Principales causas de defunción en niños menores de un año en México (55)

A pesar de que las defunciones por deficiencias en nutrición han disminuido, esta situación sigue siendo de fundamental importancia en México (cuadro 12).



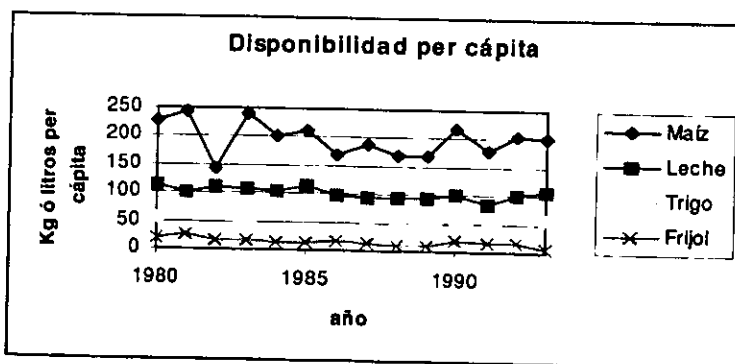
Cuadro 12. Evolución de las defunciones por deficiencias nutricionales en niños menores de un año.(55)

Las características de alimentación de la población, están determinadas por la disponibilidad de los alimentos, el poder adquisitivo de los diversos grupos, y por el consumo de alimentos (hábitos alimenticios y variedad en la alimentación)(56, 57).

### 1. Disponibilidad.

La disponibilidad per cápita de alimentos se define como:

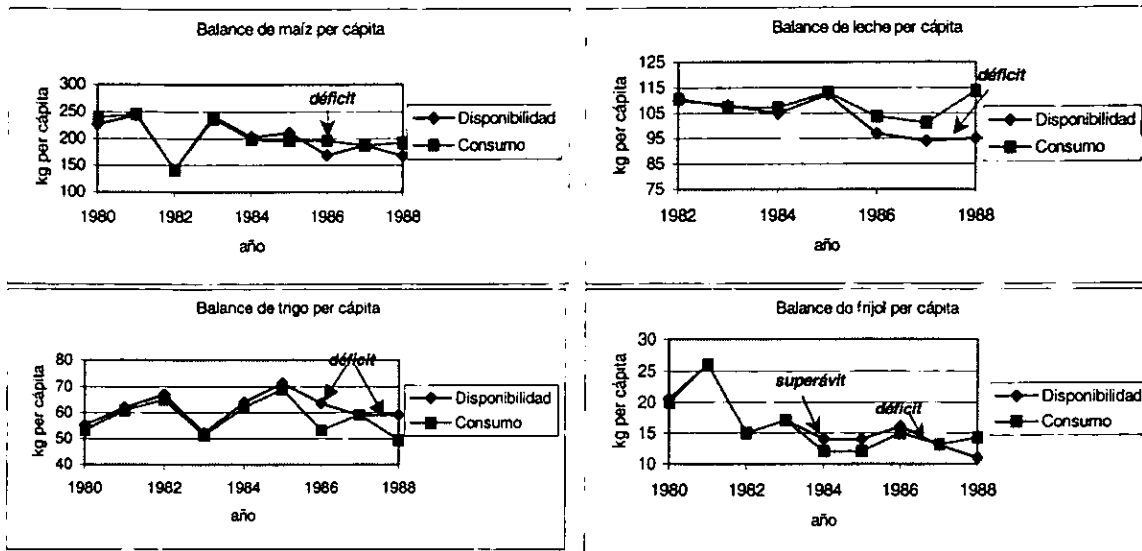
$$\frac{\text{Producción} + \text{Importaciones} - \text{Exportaciones}}{\text{Población total}}$$



Cuadro 13. Disponibilidad en Kg per cápita (1980-1993) de maíz, frijol, trigo y leche.(55)

Acerca de las características de la estructura de disponibilidad per cápita de alimentos (cuadro 13) básicos el mercado ha presentado algunas alzas así como contracciones. Es importante correlacionar esta disponibilidad con el consumo debido a que en algunos periodos hubieron déficit mientras que en otros superávit (cuadros 14 A, B, C, D).

Cuadros 14 A, B, C y D. Balance de maíz, leche, trigo y frijol / Kg per cápita, 1980-1988 (55, 57)



La disponibilidad es un indicador de la situación alimentaria. Sin embargo, es un estimador poco preciso de las características reales de alimentación y nutrición de los grupos poblacionales debido a la variabilidad interindividual y regional. Es decir, no basta con una disponibilidad suficiente para que la población tenga una alimentación adecuada. Según el *Informe del Banco Mundial Sobre la Pobreza y el Hambre 1988*, "el mundo tiene alimentos en abundancia; la tasa de incremento de la producción mundial de alimentos ha sobrepasado el crecimiento sin precedente de la población durante los últimos 40 años. Sin embargo, muchos países y cientos de millones de personas pobres no participan de esta abundancia; sufren de inseguridad alimentaria causada, principalmente, por la falta de poder adquisitivo..."

## 2. Poder adquisitivo.

La pobreza es la ausencia de capacidades básicas como salud, alimentación, vivienda y educación, que permiten a cualquier individuo insertarse en la sociedad a través del ejercicio de su voluntad. Los niveles de pobreza y de extrema pobreza se han calculado definiendo líneas de pobreza ya sea en función de los ingresos o del consumo, tomando como parámetro de referencia una canasta mínima de alimentos o de bienes y servicios.

Mientras más bajo sea el nivel de ingresos mayor es la proporción destinada a la alimentación, es así que, en 1989 la población urbana más pobre destinaba entre el 54 y 60% de su ingreso monetario total a la alimentación. Por su parte, la población más rica de la Ciudad de México (el 10% de la población), sólo destinó el 26% (61, 62).

El costo de la canasta básica se calcula como la suma de a) el costo de una canasta nutricional compuesta por 34 alimentos que proveen un mínimo de 2,082 kilocalorías y 35.1 g de proteína por día por adulto, b) el costo de otros alimentos consumidos por las familias que se ubican en el séptimo decil de la distribución y c) el costo de los servicios básicos en salud, educación, cultura y esparcimiento, transporte y comunicaciones, vestido y enseres personales necesarios para una familia (60).

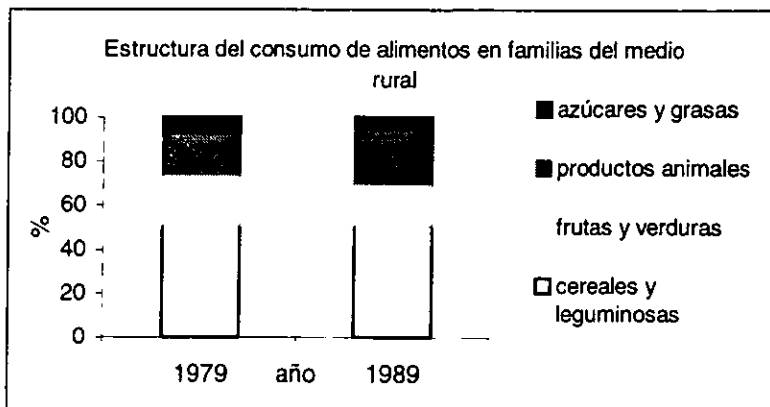
### **3. Consumo de alimentos.**

En general, el consumo de alimentos de la población se ha estudiado a través de encuestas de carácter cuantitativo y cualitativo. Los estudios se realizan en grupos poblacionales determinados (población urbana, población rural, indígenas, etc.), razón por la cual no se pueden hacer inferencias hacia toda la población mexicana.

#### **A) Consumo de alimentos en el medio rural.**

Al comparar las Encuestas Nacionales de Alimentación en el Medio Rural (ENAL), (58) y (59), realizadas por el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" en 1979 y 1989, no se observan cambios significativos en la estructura del consumo familiar de

alimentos. Las variaciones más importantes se dieron en el consumo de frutas y verduras, con una disminución del 4%. El otro cambio importante se dio en el grupo de alimentos de origen animal, en donde se aprecia un aumento del 6%, mientras que el de leche y queso cayó en esa misma proporción (cuadro 15).



Cuadro 15. Estructura del consumo de alimentos en familias del medio rural (1979 y 1989) (58, 59)

En el consumo per cápita de alimentos a nivel familiar, entre 1979 y 1989, se presentaron disminuciones importantes en el consumo de cereales (-36%), frutas y verduras (-48%) y azúcar, grasa y refrescos (-45%). Esta disminución es importante debido a que entre estos se encuentran los alimentos que conforman la dieta tradicional de la población rural, es decir, maíz, azúcar, pan y pastas.

Es fundamental mencionar que hubo un incremento ligero en el consumo de alimentos de origen animal (8%), en especial de carne (32%). El huevo, por su parte, sólo aumentó un 10% y el frijol, que es otro alimento con alto contenido de proteína (aunque de menor valor nutritivo, pero muy importante en la dieta rural) tuvo un incremento de 74% (cuadro 16).

El porcentaje de adecuación promedio de todas las zonas nutricionales mejoró. Así, en el caso de las calorías, el aumento fue de 82.9 a 90.1% y en el de las proteínas de 73.2 a 94.2%.

Alimento	1979	1989
Maíz	302	227
Pan y galletas	84	54
Pastas	13	9
Arroz	14	12
Frijol	35	61
Raíces feculentas	28	23
Verduras	79	92
Frutas	129	43
Leche y queso	115	110
Carne	62	82
Huevo	31	34
Azúcares	42	26
Grasas	32	18
Refrescos	95	73

% adecuación calorías	82.9	90.1
% adecuación proteínas	73.2	94.2

Cuadro 16. Consumo diario promedio per cápita de alimentos en gramos de peso bruto (58, 59)

#### B) Consumo de alimentos en el medio urbano.

La población urbana mal alimentada tiene las ventajas que le brinda la disponibilidad de una dieta más diversificada que la de su similar rural, sin embargo, en ocasiones no dispone de la capacidad adquisitiva suficiente para disfrutar de una dieta adecuada. Por otra parte, sin llegar a sustituir en forma adecuada la dieta rural, esa población urbana mal alimentada es más vulnerable a la publicidad y a la difusión de "productos chatarra", alejándose cada vez más de lo que sería una dieta urbana ideal, en cuanto a las cualidades que tendría con respecto a la dieta rural (63).

Según las encuestas realizadas a obreros de la zona metropolitana de la Ciudad de México (ZMCD), en 1979 y 1989 se observan algunos cambios en el consumo familiar real de alimentos. Se dio una disminución, principalmente en el consumo de alimentos

básicos como tortilla, arroz, pastas y leguminosas. En relación con los productos de origen animal, la carne presenta un ligero descenso (-7%), mientras que el huevo y el queso aumentaron (13% y 80%, respectivamente). La leche no muestra ningún cambio, manteniéndose en 275 ml. Por su parte, el pan y las galletas así como los alimentos industrializados tuvieron un aumento considerable (14% y 48%, respectivamente). Las grasas y la fibra mostraron cambios poco significativos (62).

La encuesta realizada por el Instituto Nacional del Consumidor (INCO), para el periodo 1985-1988, (61) toma los datos de la ingesta; no del consumo (compra de alimentos) como lo hace la encuesta analizada anteriormente. La población en estudio se clasificó en base a la inserción laboral del jefe de familia en el sector informal o en el formal y, a su vez, ambos sectores se estratificaron de acuerdo a cinco categorías de ingresos. En el caso de la población perteneciente al sector informal se construyeron dos categorías: a) bajo, de 0.8 a 1.5 veces el salario mínimo, y b) medio, más de 1.5 y hasta 3.5; mientras que en el sector formal los estratos fueron: a) bajo, de 0.8 a 1.5; b) medio bajo, más de 1.5 y hasta 2.5 y, c) medio, más de 2.5 y hasta 3.5 salarios mínimos.

Los resultados obtenidos muestran que el sector más afectado fue el formal de ingresos medios, ya que perdió el 25% de su poder adquisitivo; mientras que los grupos de menor ingreso de ambos sectores tuvieron un ligero incremento. Este fenómeno se explica con el incremento de la autoexplotación de la fuerza de trabajo familiar.

La compra diaria per cápita de proteínas disminuyó en casi todos los estratos, excepto en el informal medio, en donde no hubo variación. El promedio más bajo de compra fue el del estrato informal bajo, con 54.25 g. El porcentaje más alto de pérdida lo presentó el estrato formal bajo (-5.2%).

En relación con la compra de calorías, la población de más bajos ingresos, tanto en la categoría formal como en la informal, fue la que se vio mayormente afectada. La primera redujo en 5.9% (116 Kcal) su consumo, en tanto que la segunda lo hizo en 6.8% (113 Kcal). El estrato informal medio aumentó ligeramente (2.3%, es decir, 41 Kcal).

La cantidad diaria per cápita de alimentos adquiridos también presenta una reducción importante, sobre todo en el caso de productos de origen animal, que por otra parte, también son los más caros. La excepción es la leche, alimento que en forma constante ha sido objeto de subsidios por parte del estado, lo que favorece su adquisición por amplias capas sociales.

En el caso de los alimentos de origen vegetal, es posible apreciar cierto aumento en todos los estratos, excepto en el informal bajo, en donde la fruta de temporada y el frijol disminuyeron ligeramente. El consumo de azúcar se redujo en todas las categorías.

Toda esta información nos da una idea del nivel de socioeconómico de nuestro país, estudiado por los distintos sectores de la población a través de los últimos años para comprender el estado nutricional en México.



## Capítulo 5.

### Materiales y Métodos.

#### a) Equipo y Material

Balanza analítica  
Baño de agua  
Centrífuga  
Espectrofotómetro  
Fluorómetro  
Homogenizador  
Material de vidrio de uso rutinario en laboratorio de análisis  
Micropipetas  
Potenciómetro  
Revco  
Tanque de Nitrógeno líquido  
Termómetro

#### b) Material Biológico

Ratas Wistar machos. Destetados a los 21 días y muesquedados en las orejas. Con peso promedio inicial de 49.7 gramos. Se colocaron 5 ratas por caja. Ciclos de 12 x 12 luz/oscuridad, 3 veces por semana se cambiaban las cajas, 3 veces por semana se pesaron las ratas.

Agua: Esterilizada.

Alimentos: Hipoproteico 6% proteínas (semipurificado)

Normal 24% proteínas (semipurificado)

Harland 24% proteínas

(El alimento se dio *ad libitum*)

(Ver Anexo 1)

#### c) Reactivos.

Ácido etilendiaminatetraacético (EDTA)

Ácido fosfórico 85%

Ácido tricloroacético 10% (TCA)

Agua desionizada

Albúmina sérica bovina (BSA)

Azul brillante de Coomassie G-250

Cloruro de sodio, 0.15 M

Etanol 95%

Fosfato monobásico de sodio

Fosfato dibásico de sodio

Glutatión oxidado (GSSG)

Glutación reducido (GSH)  
 Glutación reductasa (GR)  
 Hidróxido de sodio, 0.01 M  
 Metanol  
 N-etilmaleimida (NEM)  
 Nicotinamida adenina dinucleótido de fosfato (NADPH)  
 o-Ftalaldehído (OPT)

#### d) Soluciones.

Amortiguador de fosfatos-EDTA (0.1 M-EDTA 0.005 M), pH 8.0, (PBS)  
 Amortiguador de fosfatos-EDTA (0.2 M-EDTA 0.003 M), pH 7.0  
 Albúmina sérica bovina 5g en 10 mL de agua desionizada en  $A_{280\text{ nm}}=0.33$ , ajustar  
 Glutación oxidado 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en NaOH y 0.44 mmol/L en PBS  
 Glutación reducido 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en PBS  
 N-etilmaleimida 0.04 M  
 Nicotinamida adenina dinucleótido de fosfato 3.6 mmol/L en PBS  
 o-Ftalaldehído 0.1% (w/v) en metanol grado analítico  
 Solución Azul brillante de Coomassie, 100g en 50mL de etanol 95%, adicionar 100 mL de ácido fosfórico, aforar a 1L con agua. Filtrar.  
 Solución de NADPH+H<sup>+</sup>, 3.6 mmol/L en amortiguador de fosfatos pH 7.0 con EDTA 0.003 M

#### e) Métodos.

##### 1. Tratamiento de las ratas:

Se dividieron las ratas destetadas de 21 días en tres poblaciones (día cero):

-La DHP constaba de 20 ratas que se alimentaron por 45 días con dieta 6% hipoprotéica isocalórica *ad libitum*.

-La DNP constaba de 9 ratas que se alimentaron por 45 días con dieta 24% normal isocalórica *ad libitum*.

-La Har constaba de 6 ratas que se alimentaron por 45 días con dieta Harland *ad libitum*.

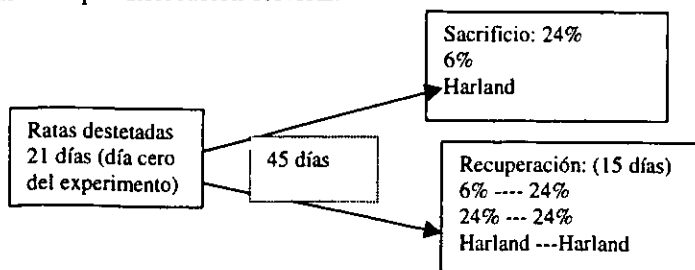
El día 45 del experimento fueron sacrificadas 12 ratas DHP, 5 ratas DNP y 3 ratas Har, por dislocación cervical. El resto se ocuparon para el estudio de recuperación bajo el siguiente esquema:

-Las DHP Rec recibieron dieta 24% normal isocalórica *ad libitum*,

-Las DNP Rec continuaron con la dieta 24% normal isocalórica *ad libitum*,

-Las Har Rec continuaron con la dieta Harland *ad libitum*.

El día 15 del estudio de recuperación (día 60 del estudio inicial) fueron sacrificadas todas las ratas por dislocación cervical.



## 2. Extracción de muestras de órganos.

Después del sacrificio por dislocación cervical se les extrajeron el hígado y riñones. Se tomó una pequeña porción de cada órgano y se colocaron en tubos para microfuga conteniendo 100µL de PBS para almacenar en nitrógeno líquido a -171 °C.

(El mismo procedimiento se realizó tanto para las ratas de 45 días como para las recuperadas de 60 días)

## 3. Tratamiento de muestras.

Las muestras fueron homogenizadas añadiendo a cada una de ellas 500 µL de PBS.

El homogenado fue dividido en tres alícuotas:

- De 350 µL en caso de hígado y riñón para la determinación de GSH y GSSG.
- De 50 µL para la determinación de proteínas por el método de Bradford.
- El resto (aprox. 200 µL) para la determinación de GR.

Se almacenaron los homogenizados en tubos para microfuga a -70 °C.

## 4. Determinación de proteínas por el método de Bradford.

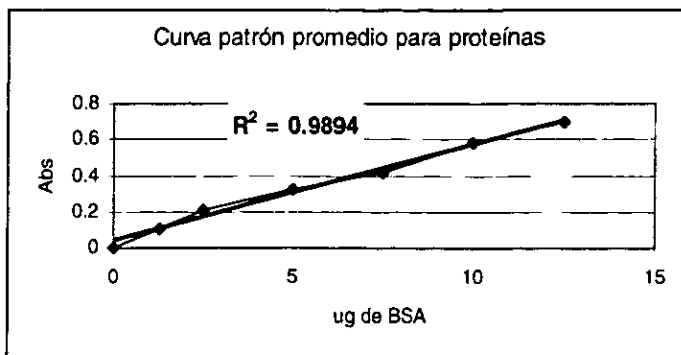
### Fundamento.

El método de Determinación de proteínas de Bio-Rad se basa en el procedimiento descrito por Bradford (Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976)). Es un método colorimétrico para determinar la concentración de proteínas totales en una muestra. Se puede usar desde intervalos de 200 µg/mL y 1,400 µg/mL hasta 25 µg/mL de proteína total. El ensayo se basa en el cambio de color del colorante G-250 azul brillante de Coomassie como respuesta a distintas concentraciones de proteína, tiene un cambio de 465 a 595 nm. El colorante se une principalmente a aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. El método es útil para medir proteínas y polipéptidos con pesos molares mayores a 3,000 o 5,000 Da. Muchos detergentes y amortiguadores de proteínas básicas pueden interferir con el ensayo. (El nombre Coomassie es una marca registrada de ICI).

### Procedimiento.

1. Se estandariza la BSA 0.5 mg/mL a  $A_{280nm}=0.33$
2. Se hace la curva de calibración con 5,10, 15, 20 y 25 µL de BSA preparado y se lleva a cada tubo a 100µL con la solución de cloruro de sodio (0.15 M). Blanco=NaCl. Se añade a cada tubo 1 mL de azul brillante de Coomassie ya preparado, se agita e incuba 2 minutos a temperatura ambiente.
3. La determinación de absorbancia se hace a 595 nm en el espectrofotómetro.
4. Para las muestras se toman 10 µL de la alícuota del homogenado que contiene 50 µL. Se sigue el mismo procedimiento que para la curva.
5. Calcular los mg de proteína/mL de homogenado.

La determinación de proteínas por el método de Bradford fue realizada utilizando la siguiente curva patrón, y ajustando correctamente la concentración estándar de BSA:



Gráfica 1. Curva patrón promedio utilizada para el cálculo de la concentración de proteínas en tejido hepático y renal. En el Anexo 2 se encuentran todos los valores utilizados para generar esta gráfica, así como otros valores relacionados con las determinaciones realizadas.

## 5. Determinación de Glutación (GSH y GSSG).

### 5.1 Preparación de las muestras

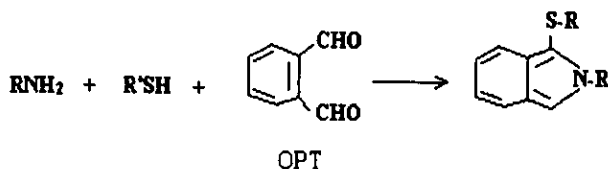
Para las determinaciones de GSH y GSSG se tratan las alícuotas del homogenado (alícuota de 350  $\mu$ l y alícuota que contiene el resto del homogenado) de la misma manera:

1. A las muestras de hígado y riñón de 350  $\mu$ L añadir 700  $\mu$ L de TCA 10%.
2. Centrifugar el precipitado a 3,000 g por 30 minutos a 4 °C.
3. Mantener las muestras en hielo en todo momento. (Sólo preparar aquellas muestras que vayan a utilizarse el mismo día.)

### 5.2 Determinación de glutatión reducido (GSH)

#### Fundamento.

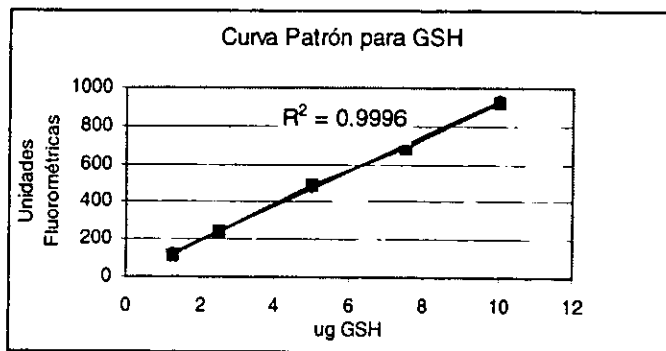
Es un método no enzimático descrito por Cohn y Lyle (Cohn, Lyle, Anal. Biochem., 14, 434, (1966)), en que se utiliza el o-ftalaldehído (o-ftalaldehído), OPT, el cual se ha reportado específico para determinar glutatión. El uso del OPT incrementa la sensibilidad de la determinación debido a que forma productos fluorescentes. El ensayo se basa en la reacción del OPT con aminas primarias en presencia de un tiol para dar el producto fluorescente (Roth, M., Anal. Chem., 43, 880-882, (1971)):



### Procedimiento.

1. Se toman 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra ya centrifugada y se añade 1.8 mL de PBS (pH= 8.0) y 100  $\mu\text{L}$  de OPT.
  2. Se agita la mezcla e incuba a temperatura ambiente por 15 minutos en oscuridad.
  3. Se determina la fluorescencia a 420 nm de emisión con 350 nm de excitación.
  4. Para la curva se toman 100, 75, 50, 25 y 12.5  $\mu\text{L}$  de la disolución 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de GSH, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de OPT y se llevan a 2mL con PBS (pH=8.0). Se incuban y determinan de igual forma que las muestras.
- (Se hace por duplicado, tanto para las muestras como para la curva)

Los valores fueron obtenidos a partir de la curva patrón para el GSH.



Gráfica 2. Curva patrón utilizada para realizar los cálculos del contenido de GSH en las muestras a partir de los valores determinados fluorométricamente.

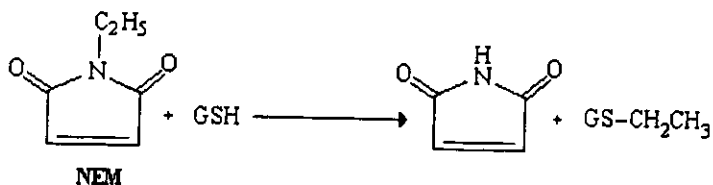
### 5.3 Estudio de recuperación.

1. Se toman 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de alguna muestra y se añaden 1.85 mL de PBS y 100  $\mu\text{L}$  de OPT.
2. Por otro lado se toman 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la misma muestra del punto anterior y 50  $\mu\text{L}$  de la solución 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de GSH; se añaden 1.80 mL de PBS y 100  $\mu\text{L}$  de OPT.
3. Se incuban en oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos y se determina fluorescencia a 420 nm de emisión con 350 nm de excitación.

## 5.4 Determinación de glutatión oxidado (GSSG)

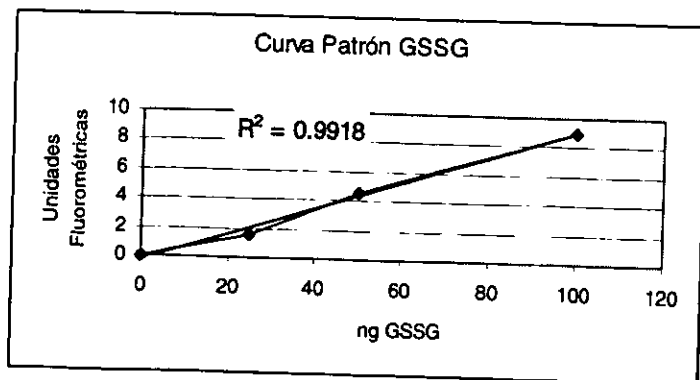
### Fundamento.

El método para la determinación de GSSG descrito por Hissin y Hilf (Hissin, Hilf, Anal. Biochem., 74, 214-226, (1976)) se basa en el mismo método fluorométrico que el de Cohn y Lyle para GSH utilizando OPT, sin embargo utiliza N-etilmaleimida (NEM) para prevenir que el GSH se oxide dando resultados falsos de la cantidad real de GSSG presente en la muestra. El NEM reacciona con tioles (como el GSH) para formar productos (Jocelyn, Biochem. of the SH group, Ac. Press., NY, 1972).



### Procedimiento.

1. Se toman 100  $\mu$ L del sobrenadante de la muestra ya centrifugada y se añade 40  $\mu$ L de NEM (0.04 M).
2. Se incuba en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añaden 860  $\mu$ L de NaOH 0.01 M (pH = 12.0).
4. Se toman 200  $\mu$ L de la mezcla anterior y se añade 1.7 mL de NaOH 0.01 M (pH = 12.0), y 100  $\mu$ L de OPT.
5. Se agita la mezcla e incuba a temperatura ambiente por 15 minutos en oscuridad.
6. Se determina la fluorescencia a 420 nm de emisión con 350 nm de excitación.
7. Para la curva se toman 100, 75, 50, 25 y 12.5  $\mu$ L de la disolución 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L de GSSG, se añaden 40  $\mu$ L de NEM y 100  $\mu$ L de OPT a cada tubo; se llevan a 2 mL con NaOH 0.01 M (pH= 12.0). Se incuban y determinan de igual forma que las muestras. (Se hace por duplicado, tanto para las muestras como para la curva)



Gráfica 3. Curva patrón utilizada para realizar los cálculos del contenido de GSSG a partir de las determinaciones fluorométricas. Ver Anexo 2 para mayor información.

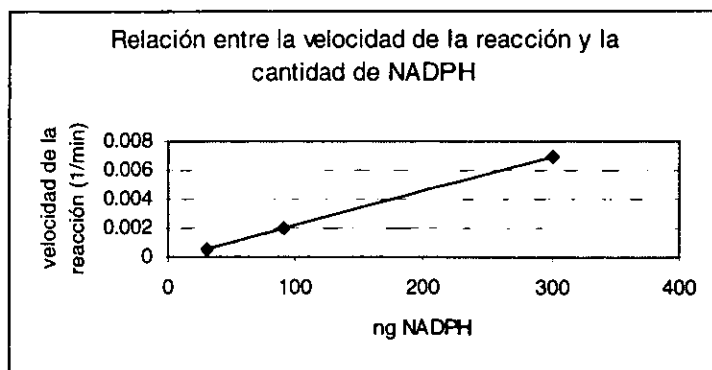
## 6. Determinación de glutatión reductasa (GR)

### Fundamento.

La determinación de la actividad de la Glutatión reductasa (GR) reportada por Carlberg y Mannervick (Carlberg, Mannervick, J. Biol. Chem., 350, 5474, (1975)) se basa en la lectura espectrofotométrica, a 340 nm, de la velocidad de desaparición de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . La enzima GR cataliza el flujo de equivalentes reductores del  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  al GSSG, en presencia de protones, para dar como productos  $\text{NADP}^+$  y dos moléculas de GSH. Esta reacción utiliza como cofactor el  $\text{FAD}^+$ . La velocidad de desaparición de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  (que absorbe a 340 nm) depende de la actividad de la GR.

### Procedimiento.

1. Se toman 15  $\mu\text{L}$  del homogenado, se añaden 165  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, 900  $\mu\text{L}$  de solución de GSSG 0.44 mmol/L (en PBS-EDTA 0.003 M) y 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  3.6 mmol/L (en PBS-EDTA 0.003 M). Esta mezcla se realiza a 30 °C.
2. Se hacen las determinaciones de absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro cada 15 segundos por 3 minutos.
3. Para determinar la actividad se considera el valor absoluto de la pendiente de cada muestra entre la cantidad de proteína en la muestra. Este valor se divide entre el coeficiente de exinción del  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  =  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ . Se corrige según las diluciones reportando la actividad enzimática por mg de proteína.



Gráfica 4. Análisis de la relación entre la cantidad de NADPH añadida y la velocidad de la reacción de la GR. Ver Anexo 2 para mayor información.

## 7. Estudio control.

Para el estudio control de la manipulación de muestras se tomó una rata macho de 10 semanas de edad que había tenido una dieta Harland Taklad LM-485 y se sacrificó por dislocación cervical. La extracción de órganos fue siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las ratas y se hicieron los homogenados con 500  $\mu\text{L}$  de PBS al igual que las muestras anteriores.

Antes de almacenar los homogenados de hígado y riñón se alicuotaron por duplicado y a una alicuota de cada muestra se añadieron 50, 15.5 y 3  $\mu\text{L}$  de una solución 1.2  $\mu\text{g}$  GSH/ $\mu\text{L}$ , respectivamente.

Las alicuotas fueron almacenadas en las mismas condiciones que las muestras.

Se les determinó GSH y GSSG después de una semana de estar almacenadas.

## **8. Método estadístico.**

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y los valores promedio fueron considerados como determinaciones independientes.

Para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de cada grupo de muestras se utilizó la prueba de t-student. Para el análisis se propuso una  $p < 0.05$ , es decir, un 95% de confianza. (Biostatistical Analysis, Zar, J., 2<sup>nd</sup> Ed., Prentice Hall, 1984, EUA)



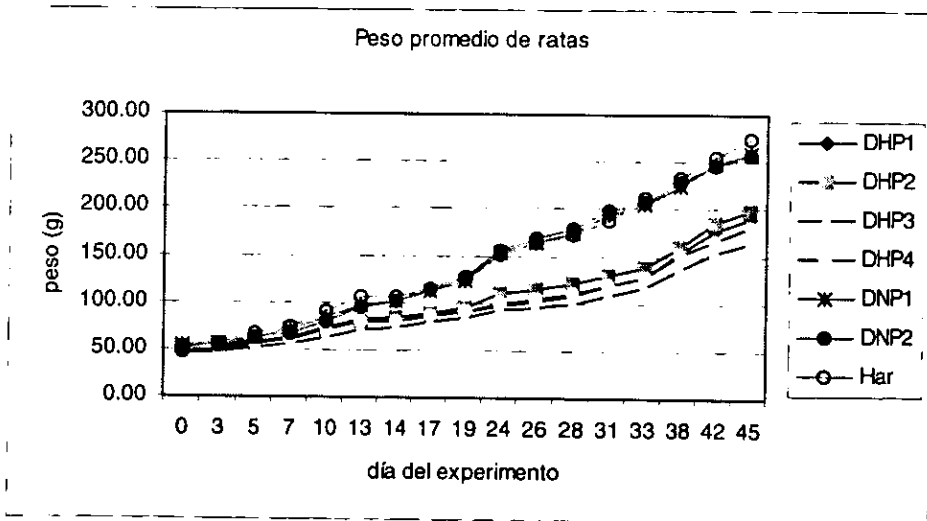
## Capítulo 6.

### Resultados Experimentales.

A continuación se presentan los resultados obtenidos a lo largo de los experimentos. En primer lugar se presentan los pesos de las ratas a través de la duración del experimento debido a que una medida de la calidad de la alimentación es la masa corporal. Siguiendo se presentan los datos de las determinaciones de proteínas debido a que los resultados obtenidos de glutatión se reportan por gramo de proteína. Los resultados de GSH y GSSG se presentan para poder llegar a la relación GSH/GSSG y entender el estado de estrés oxidativo en los tejidos. Finalmente el glutatión total es un cálculo obtenido de los resultados experimentales de GSH y GSSG que ayuda a comparar la cantidad de glutatión disponible para cada uno de los grupos experimentales, según su dieta. La actividad de la glutatión reductasa se determinó para cuantificar la capacidad retorno del GSSG a GSH dentro de cada tejido y así entender mejor el origen del estrés oxidativo. Por último, los estudios control nos ayudan a evaluar la precisión con la que se trabajaron las muestras durante el periodo de experimentación.

#### 1. Tratamiento de las ratas:

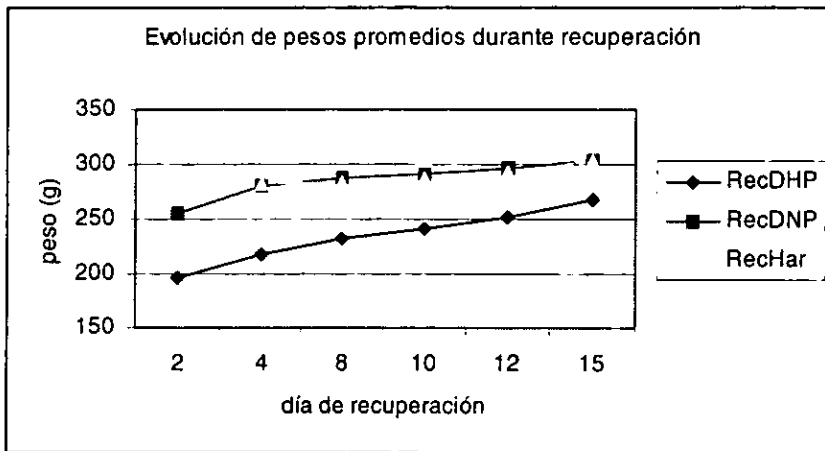
Se utilizaron 20 ratas para el tratamiento de dieta hipoproteica al 6% (DHP) divididas en 4 cajas, 9 para el control con dieta normal con un contenido proteico de 24% (DNP) divididas en 2 cajas y 6 ratas para el alimento Harland (Har) en una sola caja. La evolución de pesos promedio por cajas, a través del estudio fue de la siguiente forma:



Gráfica 5: Evolución de pesos promedios por caja y por tratamiento durante los primeros 45 días del experimento. (35 ratas) En el Anexo I se encuentran todos los valores utilizados para generar esta gráfica, así como otros valores relacionados con el tratamiento de las ratas.

Mostrando que aquellas ratas con alimentación DHP tuvieron un crecimiento retardado respecto a las dietas controles.

Durante el estudio de recuperación en que se administró la dieta DNP a 8 de las ratas que habían sido tratadas con DHP por 15 días se obtuvo la siguiente evolución de pesos promedios por tipo de tratamiento. (NOTA: Aquellas ratas que estaban bajo dieta DNP continuaron su dieta, así como las Har)

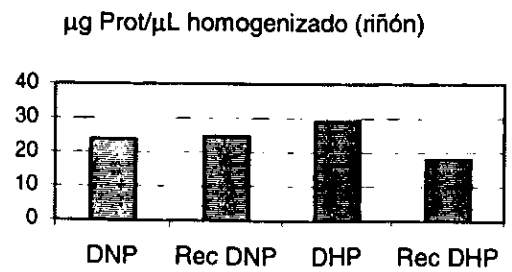
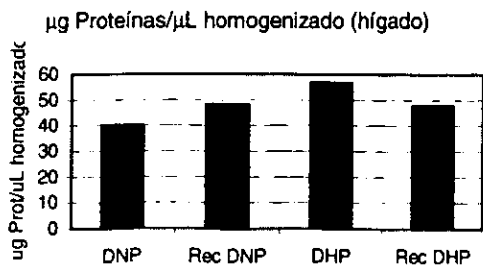


Gráfica 6. Evolución de pesos promedios durante los 15 días de la etapa de recuperación (días 45 a 60 del experimento). (Anexo 1)

A través de la Gráfica 2 se observa como aquellas ratas que estaban bajo tratamiento DHP comenzaron la recuperación en un peso significativamente menor, y lograron en 15 días recuperar una gran proporción de peso respecto a los controles.

## 2. Determinación de proteínas

Luego de sacrificar a las ratas se les determinó el contenido de proteína en los homogenados de hígado y riñón; encontrando los siguientes resultados.



Gráficas 7 y 8. Comparación del contenido promedio de proteínas  $\mu\text{g}$  por  $\mu\text{L}$  de homogenizado en hígado y riñón entre los tratamientos DNP y DHP. En el Anexo 2 se encuentran todos los valores utilizados para generar esta gráfica, así como otros valores relacionados con las determinaciones realizadas.

Los niveles de proteína, tanto en hígado como en riñón, son mayores en aquellas ratas con tratamiento DHP que las DNP; por una diferencia de aproximadamente  $10 \mu\text{g}$  de Proteína/ $\mu\text{L}$  de homogenizado. En el caso de los recuperados encontramos que los DNP Rec (ratas que recibieron por 60 días tratamiento DNP) tienen una mayor concentración de proteínas por  $\mu\text{L}$  de homogenizado que el mismo grupo 15 días antes (DNP). Mientras que para los DHP Rec (ratas que recibieron 45 días de tratamiento DHP y 15 días de DNP) tienen una menor concentración de proteínas por  $\mu\text{L}$  de homogenizado que el mismo grupo 15 días antes (DHP). Este comportamiento se observa para ambos tejidos.

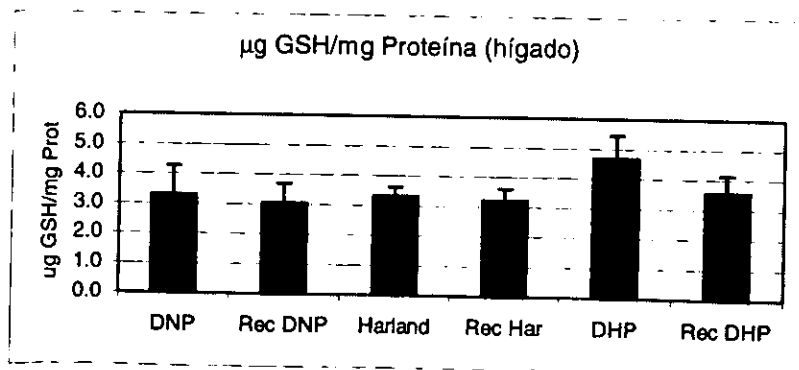
### 3. Determinación de glutatión reducido (GSH)

En la determinación de glutatión reducido se realizó para cuantificar el estado redox en el tejido. Se obtuvieron los siguientes resultados de contenido de GSH promedio en hígado, por tratamiento:

	Hígado
DNP	$3.2999 \pm 0.9$
RecDNP	$3.0291 \pm 0.6$
Har	$3.3125 \pm 0.3$
RecHar	$3.2007 \pm 0.4$
DHP	$4.6737 \pm 0.8$
RecDHP	$3.5683 \pm 0.6$

Tabla 1. Concentración promedio de  $\mu\text{g}$  de GSH por mg de Proteína (con desviación estándar) Para mayor información ver el Anexo 2.

Los valores de la Tabla 1, al ser graficados muestran que aquellos animales tratados con la dieta DHP presentaron una mayor concentración de GSH que los controles (DNP y Har). Durante los estudios de recuperación todas las muestras mostraron una menor concentración de GSH respecto al mismo grupo 15 días antes, sin embargo se encontró que los valores de GSH para RecDHP disminuyen en mayor proporción respecto a DHP que cualquiera de los otros casos.



Gráfica 9. Concentración promedio de GSH en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de proteína en hígado y riñón por tratamiento (con desviación estándar). En el Anexo 2 se encuentran todos los valores utilizados para generar esta gráfica, así como otros valores relacionados con las determinaciones realizadas.

#### 4. Determinación de glutatión oxidado (GSSG)

En la determinación de GSSG se obtuvieron los siguientes valores:

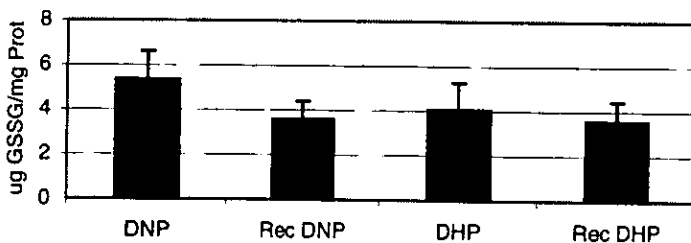
	Hígado	Riñón
<b>DNP</b>	$5.340 \pm 1.3$	$5.540 \pm 0.8$
<b>RecDNP</b>	$3.592 \pm 0.8$	$6.062 \pm 2.8$
<b>DHP</b>	$4.048 \pm 1.2$	$3.401 \pm 0.9$
<b>RecDHP</b>	$3.556 \pm 0.9$	$7.411 \pm 5.6$

Tabla 2. Concentración promedio de GSSG en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de proteína por tejido y tratamiento (con desviación estándar). Para mayor información ver el Anexo 2.

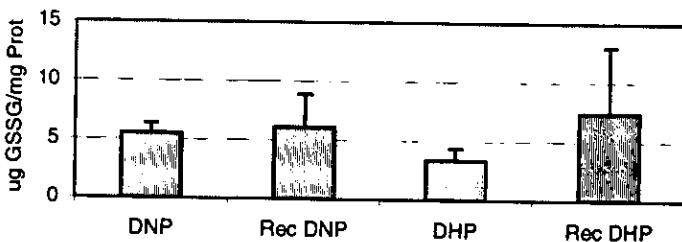
Si graficamos estos valores obtenemos los siguientes histogramas, en que las ratas DHP, tanto en hígado como en riñón contienen la menor concentración de GSSG respecto al control (DNP).

Gráficas 10 y 11. Concentración de GSSG promedio en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de proteína en hígado y riñón por tratamiento (con desviación estándar). En el Anexo 2 se encuentran todos los valores utilizados para

$\mu\text{g}$  GSSG/mg Proteína (hígado)



$\mu\text{g}$  GSSG/mg Proteína (riñón)



generar estas gráficas, así como otros valores relacionados con las determinaciones realizadas.

### 5. Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG)

Debido a que la proporción de GSH respecto a GSSG es un indicador del niveles de estrés oxidativo, es de gran interés para este trabajo analizar dicha relación.

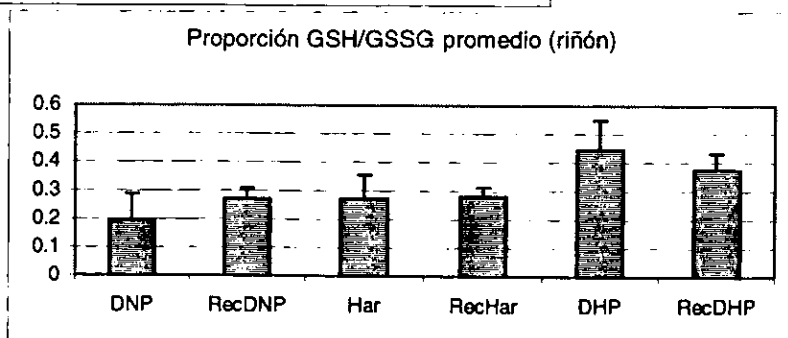
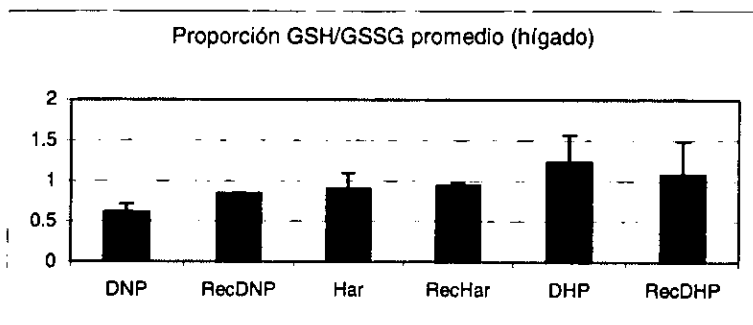
Para esto se tomaron los valores obtenidos de concentración de GSH ( $\mu\text{g GSH/mg}$  proteína) y los de GSSG ( $\mu\text{g GSSG/mg}$  proteína) para encontrar el factor GSH/GSSG adimensional. Este factor, en caso de ser mayor que la unidad indica que existe una mayor concentración de GSH que de GSSG. Entre mayor sea el valor de este factor, menor el estrés oxidativo en que se encuentra la muestra.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

	Hígado	Riñón
<b>DNP</b>	$0.6149 \pm 0.1$	$0.1928 \pm 0.1$
<b>RecDNP</b>	$0.8439 \pm 0.0$	$0.2693 \pm 0.0$
<b>Har</b>	$0.8977 \pm 0.2$	$0.2732 \pm 0.1$
<b>RecHar</b>	$0.9433 \pm 0.0$	$0.2819 \pm 0.0$
<b>DHP</b>	$1.2307 \pm 0.3$	$0.4444 \pm 0.1$
<b>RecDHP</b>	$1.0787 \pm 0.4$	$0.3738 \pm 0.1$

Tabla 3. Relación GSH/GSSG promedio en hígado y riñón para los distintos tratamientos (con desviación estándar). Ver Anexo 2 para mayor información.

De estos valores obtenemos los siguientes histogramas:



Gráficas 12 y 13. Proporción GSH/GSSG promedio en hígado y riñón por tratamiento (con desviación estándar). En el Anexo 2 se encuentran todos los valores utilizados para generar estas gráficas, así como otros valores relacionados con las determinaciones realizadas.

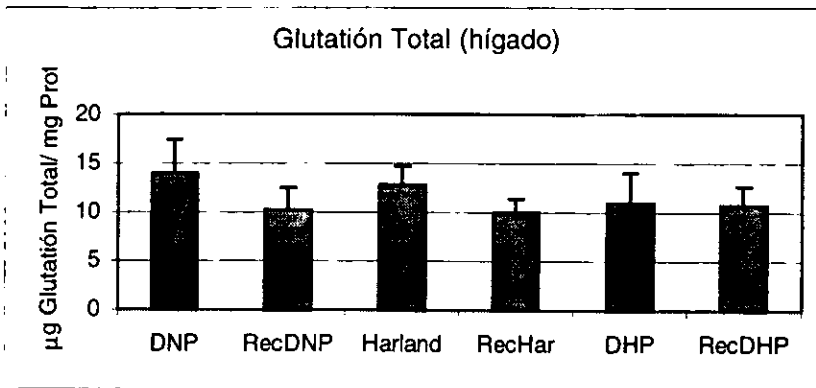
De estos histogramas se puede claramente observar que la proporción GSH/GSSG es mayor en el caso de las ratas DHP tanto en hígado como en riñón, respecto a los controles (DNP y Har). Indicando así, que la dieta hipoproteica genera menor estrés oxidativo. De hecho, en el hígado el valor de GSH/GSSG es mayor a la unidad.

Por otro lado, en la recuperación encontramos que para los controles la relación aumenta, mientras que en RecDHP el valor disminuye respecto a DHP; pero sigue siendo mayor que cualquiera de los valores controles.

## 6. Glutación Total

Para la determinación de glutatión total se consideró que el GSSG contiene dos equivalentes de GSH, por lo que glutatión total = (GSH) + (2 x GSSG).

De esta manera obtuvimos el siguiente histograma:



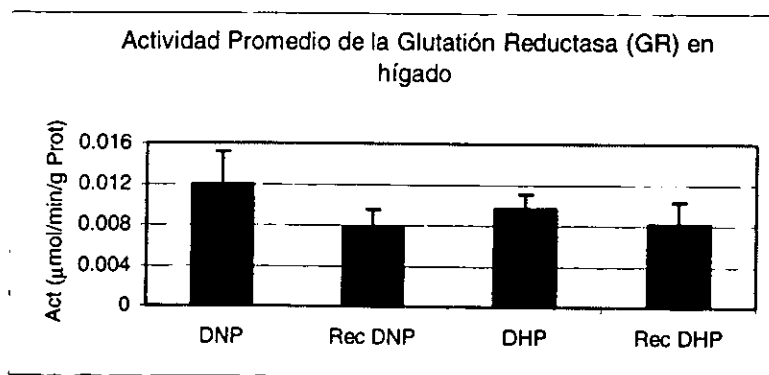
Gráfica 14. Glutación total en µg por mg de proteína en tejido hepático por tratamientos. En el Anexo 2 se encuentran todos los valores utilizados para generar estas gráficas, así como otros valores relacionados con las determinaciones realizadas.

Se realizó este cálculo por mg de proteínas debido a que es interesante conocer qué proporción de aminoácidos se encuentran formando al glutatión (GSH ó GSSG) y conproporción está en el resto de las proteínas totales. Encontramos que las ratas DHP presentan un menor nivel de glutatión total que los controles. En todos los casos, durante el estudio de recuperación, el glutatión total disminuye.

## 7. Determinación de la actividad de la Glutación reductasa (GR)

Para la determinación de la actividad de la GR se realizó un ensayo con distintas concentraciones de NADPH+H<sup>+</sup> añadidas a la muestra para determinar cómo variaba la velocidad de la reacción respecto al sustrato añadido. En el intervalo estudiado, tal como se muestra en la Gráfica 4, existe una relación directa entre la cantidad de NADPH+H<sup>+</sup> añadida y la velocidad determinada; lo cual significa que: 1. El GSSG (el otro sustrato de la reacción) no es el reactivo limitante, 2. El NADPH+H<sup>+</sup> añadido es el que determina la velocidad de la reacción, de manera lineal; ninguna otra sustancia presente en la muestra.

La actividad de la GR solamente se determinó en las muestras de hígado debido a la gran presencia de esta enzima en el tejido hepático. Los resultados se muestran en el siguiente histograma:



Gráfica 15. Actividad promedio en μmol/min/g de proteína de la GR en tejido hepático por tratamiento. En el Anexo 2 se encuentran todos los valores utilizados para generar esta gráfica, así como otros valores relacionados con las determinaciones realizadas.

Es claro observar que la actividad de la GR es menor para las ratas DHP que las DNP. Esta menor actividad refleja un menor estrés oxidativo. En ambos casos, las ratas recuperadas presentan una menor actividad que aquellas sin recuperar; sin embargo las RecDHP contienen ligeramente mayor actividad que las RecDNP.

## 8. Estudio control

En el estudio control se les añadió una cantidad conocida de GSH a las muestras para verificar si en las determinaciones encontramos todo el glutatión añadido, además de poder entender que proporción del GSH se oxida durante la manipulación de muestras. A continuación se presentan los resultados encontrados para verificar si en las determinaciones encontramos el glutatión total añadido:

Muestra	Glutación total	Total residual	Glutación añadido	% de recuperación
Hígado	0.2546			
Hígado +	0.3760	0.1214	0.15	80.9
Riñón	0.1273			
Riñón +	0.1573	0.0300	0.05	60.0

Tabla 4. Resultados del estudio control (ug de glutación/uL de homogenizado). En donde el Total residual de la muestra es la diferencia entre el GSH añadido y el total en la muestra. Ver Anexo 2 para mayor información.

	GSH residual	GSSG residual	Glutación total	% de oxidación
Hígado	0.1137	0.0039	0.1214	6.34
Riñón	0.0211	0.0044	0.0300	29.66

Tabla 5. Resultados del estudio control para determinar el % de oxidación de GSH durante la manipulación de muestras (ug de glutación/uL de homogenizado). NOTA: Se consideró que el GSSG genera dos equivalentes de GSH. Ver Anexo 2 para mayor información.



## Capítulo 7.

### Discusión.

Antes de comenzar la discusión es importante definir el concepto de "estrés oxidativo" debido a que será utilizado ampliamente a lo largo de este capítulo. El estrés oxidativo involucra la idea de que a pesar de que reacciones de oxidación ocurren constantemente en el organismo, cuando se comienza a acumular el agente oxidado se piensa que hay una presión celular. La pérdida neta de antioxidantes "consumibles" como el GSH y la acumulación de GSSG es un indicador del estrés oxidativo (72).

De la gráfica 5 observamos que las ratas que recibieron una dieta de 6% de proteínas (DHP) o dieta hipoproteica tuvieron un aumento de peso significativamente más retardado que los controles (dieta 24%: DNP, y dieta Harland: Har), los DNP tuvieron un peso final promedio 1.6 veces mayor a los DHP. De hecho, en el día 45 del experimento en que se sacrificaron algunas de las ratas el mayor tamaño entre controles y ratas DHP fue evidente. Sin embargo, al administrar la dieta DNP, durante el periodo de recuperación, a las ratas que habían estado bajo la dieta DHP estuvieron cerca de alcanzar a los controles (gráfica 6). Si el estudio de recuperación hubiera durado más de 15 días quizás las ratas de dieta DHP hubieran alcanzado a los controles.

Estos resultados en rata, si los extrapolamos con las debidas proporciones (tomando en cuenta que estamos hablando de diferentes géneros y especies), confirman lo encontrado en niños malnutridos o con PEM (malnutrición proteica energética); en que existe un crecimiento más lento que en niños normales.

La Organización Mundial de la Salud (WHO) describe que el aumento de talla y peso (crecimiento) determinan el estado de nutrición de los niños, debido a que una alteración en la nutrición de un individuo, cual sea su etiología, tiene efectos en el crecimiento del niño. Este crecimiento puede examinarse linealmente (altura-edad), o en proporción corporal (peso-altura); sin embargo, una medida que combina tanto el factor lineal como el de proporción corporal es peso-edad (64).

Las ratas DHP utilizadas en el estudio a pesar de que fueron alimentadas *ad libitum* (al igual que los controles) consumieron una cantidad menor de alimento que los controles para el mismo periodo (Ver Anexo 1). Así que el desarrollo tan retardado que tuvieron; determinado por nosotros como peso-edad (gráficas 5 y 6), quizás fue efecto de dos factores: menor porcentaje de proteína en la dieta, así como un menor consumo de alimento. La dieta proporcionada era isocalórica, sin embargo, si el consumo de las ratas DHP fue menor que los controles, quiere decir que tuvieron no solo un tratamiento hipoproteico, sino que también hipocalórico; generando una desnutrición leve tipo PEM.

Respecto a la determinación de proteínas, observamos que existe un mayor contenido de proteína por  $\mu\text{L}$  de homogenizado en las ratas DHP que en los controles (gráficas 7 y 8).

Este resultado se observa claramente tanto en tejido hepático como en el renal. Sin embargo este efecto se puede deber a que el valor expresado por  $\mu\text{L}$  de homogenizado en DHP resulta más concentrado que si lo hubieramos evaluado por órgano. Como la rata DHP tiene un menor tamaño general, sus órganos como consecuencia son también más pequeños. Por otro lado, es de esperarse que exista una menor o igual cantidad de proteína en los DHP, respecto a los controles, debido a que tienen una menor administración proteica. Con todo esto sólo podemos concluir que los valores obtenidos de proteína sólo reflejan la concentración, sin embargo al no poderlo ponderar con la proporción corporal del animal es difícil sustentarse en ellos.

Es evidente notar que en los casos de ratas DHP los niveles de GSH en  $\mu\text{g}$  por mg de proteína en hígado son 1.4 mayores que los valores encontrados en cualquiera de las otras poblaciones en estudio (gráfica 9). Este resultado es de gran importancia debido a que esto significaría que las ratas DHP tienen una mayor poza de GSH que los controles, y por lo tanto tienen a) el potencial de reducir agentes oxidantes en caso de presentarse y/o b) un menor estrés oxidativo, es decir un ambiente menos oxidante que los controles.

En el estudio de recuperación observamos que los niveles de GSH disminuyen, ya sea por efecto de la edad (debido a que en todos los casos de los controles disminuye el GSH con el tiempo) y/o por que durante la recuperación el alimento administrado es el DNP con mayor contenido proteico que pudiera crear un escenario similar a los controles; en que el estrés oxidativo es mayor.

En hígado (gráfica 9) observamos como los controles (DNP y Har) contienen casi la misma concentración de GSH por mg de proteína; y el decremento que tienen en el estudio de recuperación es casi el mismo. Este decremento como efecto de la edad fue observado en hígado de ratas (65); en donde los niveles de GSH fueron menores en ratas viejas que en ratas adultas con alimentación *ad libitum*; mientras que el nivel de GSH en hígado de ratas viejas con dieta restringida fue mayor que en ratas de la misma edad pero alimentación *ad libitum*.

En el caso del riñón los efectos son similares a los descritos para hígado, sin embargo las diferencias no son tan significativas.

Las determinaciones de GSH se podría decir que son confiables debido a que la curva de calibración utilizada presenta una linealidad extraordinaria (gráfica 2). Sin embargo, varios artículos y revisiones han argumentado que el método fluorométrico para la determinación de GSH propuesto por Hissin y Hilf (1976) (67) subestima el nivel real de GSH en hígado hasta por un 40% en extractos debido a la interferencia y reacción con componentes tisulares. Uno de estos componentes es el grupo hemo; que se encuentra en la gran variedad de citocromos presentes en el hígado. A pesar de que es difícil eliminar estos componentes intrínsecos del tejido, podemos disminuir la interferencia minimizando la contaminación de muestra con sangre (68).

Es por esto que a pesar de que existe una confianza en la tendencia de los valores de GSH, no podemos confiar en los valores numéricos de concentración de GSH debido a que seguramente están subestimados posiblemente por la interferencia mencionada anteriormente así como por una oxidación espontánea del GSH durante el manipuleo de las muestras.

Otras revisiones (66) indican que sustancias tisulares como aminoácidos podrían afectar la determinación fluorométrica de GSH subestimando los niveles reales. Por lo que el grado de interferencia cambia entre los diversos grupos de muestras estudiados; dependiendo del nivel de aminoácidos presentes.

Una manera de evitar estas interferencias es realizar el estudio en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): sin embargo esta técnica es muy cara, requiere de equipo especial, y no es práctica cuando se requiere analizar una gran cantidad de muestras (68).

Respecto a los resultados de las determinaciones de GSSG (Tabla 2) encontramos que tanto para hígado como para riñón los valores de concentración de GSSG en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de proteína son menores en las ratas DHP que en las DNP. Sugiriendo que existe una menor producción de GSSG en DHP que en DNP; por lo que se entiende que el estrés oxidativo es menor en las ratas hipoproteicas (gráficas 10 y 11).

Este resultado va de la mano con la tendencia encontrada para el GSH, en que las ratas DHP tenían mayor contenido de GSH. Esto se explica debido a que si existe un menor estrés oxidativo en este grupo, entonces menor cantidad de GSH es necesario utilizar para reducir agentes agresivos, por lo que encontraremos menor cantidad de GSSG formado.

Las ratas recuperadas en riñón presentan un mayor nivel de GSSG respecto a los mismos grupos 15 días antes, seguramente porque el alimento que se les administra para la recuperación (alimento 24% de proteína) aumenta el estrés oxidativo y con ello el nivel de GSSG (así como sucede en las ratas DNP).

Es importante mencionar que el aumento en el nivel de GSSG en riñón, en las ratas recuperadas de DHP es 7.7 veces mayor al aumento en Rec DNP. Este efecto seguramente se debe a que los RecDHP tienen un mayor estrés oxidativo que los DHP por la dieta de recuperación con contenido proteico (como muestra la tendencia entre DNP y Rec DNP).

En el caso de los métodos utilizados para determinar GSSG, en que el NEM previene la oxidación del GSH, se ha reportado que existe cierta interferencia que genera una sobrevaluación de los valores reales del contenido de GSSG (69). Al comparar los valores obtenidos con una prueba enzimática para GSSG, contra los valores de la técnica fluorométrica; la primera contaba con valores ocho veces más pequeños que los obtenidos con OPT. En varios tejidos se ha demostrado que la técnica fluorométrico descrito por Hissin y Hilf (1976) (67) arroja resultados mucho mayores a los obtenidos por métodos como HPLC.

Por lo que se entiende que la metodología de Hissin y Hilf a pesar de que es fácil de realizar y económicamente accesible es relativamente confiable debido a que subestima los niveles de GSH y sobreestima los niveles de GSSG (68).

Debido a que la proporción de GSH respecto a GSSG es un indicador del nivel de estrés oxidativo, es de gran interés para el estudio analizar dicha relación.

Si el factor adimensional GSH/GSSG es mayor a la unidad indica que existe una mayor cantidad de GSH que de GSSG; y por lo tanto predomina el ambiente reductor. Por otro lado, al comparar dos valores de GSH/GSSG entendemos que el mayor corresponde a aquél con menor estrés oxidativo. Es importante aclarar que la proporción GSH/GSSG es confiable para comparar los resultados experimentales debido a que todos ellos contienen el mismo error sistemático del método, y entre ellos la correlación ( $r^2$ ) es confiable.

En los resultados encontrados (gráficas 12 y 13) observamos que la proporción GSH/GSSG es 2.1 y 2.3 veces mayor en las ratas DHP que en cualquiera de los controles (DNP y Har) para tejido hepático y renal, respectivamente. Estadísticamente DHP tiene mayor GSH/GSSG que DNP con un 99.8% de confiabilidad. Este resultado es de gran importancia debido a que refleja lo ya discutido para el GSH y GSSG. Es importante notar que en el hígado la razón es mayor a la unidad; por lo que no sólo podemos aseverar que DHP produce menos oxidantes, sino que también se puede decir que existe una mayor cantidad de GSH que de GSSG.

En el RecDHP observamos que el valor de GSH/GSSG disminuye respecto a DHP; esto puede sugerir lo ya planteado en párrafos anteriores de que el comienzo de la administración de dieta proteica incrementa el estrés oxidativo acercándose a los valores encontrados en las ratas controles, pero manteniendo una diferencia significativa entre ellos.

Se reporta que la relación GSH/GSSG es mucho mayor a la que encontramos en este estudio (Tabla 3) debido a que los valores de GSH reportados son hasta 9 veces mayores a los de GSSG; sin embargo, las revisiones ya mencionadas de las interferencias en el método fluorométrico pueden ser responsables de esta diferencia entre lo encontrado y lo reportado. A pesar de ello, los resultados son confiables por tener el mismo error sistemático, con una correlación ( $r^2$ ) confiable.

Se realizó el cálculo de glutatión total por mg de proteína (gráfica 14) para conocer qué proporción de proteína era glutatión. Los resultados muestran que existe 0.9 menos glutatión total en las ratas DHP que en los controles. Este resultado se puede explicar por que las ratas DHP al obtener menos aminoácidos producen menos glutatión. Al ser los aminoácidos un insumo restringido deben de utilizarlo de la manera más eficiente. Además de que como las DHP tienen menor estrés oxidativo no requieren de grandes cantidades de glutatión total; además de que requieren utilizar esos aminoácidos para formar enzimas y otras proteínas funcionales.

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Para realizar la determinación de la enzima Glutatión reductasa (GR) de manera correcta se hizo una curva de la relación entre la velocidad de la reacción y la cantidad de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  (gráfica 4). Esto se realizó para determinar si en el intervalo de concentraciones de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  utilizadas se comportaba como reactivo limitante, y que la concentración de GSSG no determinara la velocidad de la reacción. Se encontró que la velocidad de la reacción depende, de manera proporcionalmente directa, de la concentración añadida de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  a la celda de ensayo. Por otro lado, se comprobó que no existían factores tisulares que afectaran la evolución de la reacción. Al obtener estos resultados se decidió comenzar con el análisis de actividad de la GR en tejido hepático.

Cuando se determinó la actividad de la GR, la cual cataliza la reacción de conversión del GSSG a GSH utilizando  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  como reductor, se encontró que la actividad de ésta disminuye en aquellas ratas DHP respecto al control (DNP) (gráfica 15). Estadísticamente la actividad en DNP es 1.2 veces mayor que la de DHP con un 95% de confianza. Este resultado podría inferir que si existe una menor actividad de la GR en DHP existe menor necesidad de regenerar GSH a partir del GSSG; por lo que sugiere que en las ratas DHP el estrés oxidativo es menor que en las DNP.

Estos resultados son consistentes con el hecho de que existe un menor estrés oxidativo en ratas DHP respecto a controles; las evidencias son la alta proporción de GSH/GSSG y la baja actividad de la GR.

Durante el estudio de recuperación se encontró que la actividad en ambos casos (RecDHP y RecDNP) disminuyó respecto al mismo grupo 15 días antes. Este resultado se puede deber a la ingesta de dieta proteica durante el estudio de recuperación. Estadísticamente no existe diferencia entre el nivel de actividad de GR en RecDHP que en RecDNP; por lo que se entiende que ambos grupos se recuperaron de igual manera.

El resultado de que en las ratas DHP la actividad de la GR (enzima de fase II) es menor que en las ratas DNP es interesante debido a que se ha encontrado que lo mismo sucede con enzimas de fase I como el citocromo P450. Una dieta baja en proteínas disminuye los niveles hepáticos de citocromo P450 (70). Asimismo, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas se llevó a cabo la determinación de la actividad de citocromo P450 en hígado, riñón y pulmón de las mismas ratas utilizadas en este estudio; encontrando que la actividad en las DHP es menor que en las DNP (71).

Todos estos resultados nos indican que las ratas DHP están bajo menor estrés oxidativo que las DNP.

Por último, se realizó el estudio control para determinar si existe una oxidación espontánea durante la minupulación de las muestras del GSH y para verificar si el método es capaz de determinar todo el GSH añadido.

En el caso de la determinación del GSH añadido encontramos que en el caso del hígado la recuperación fue del 80.9 % (es decir, hubo un 19.1% de glutatión total no

determinado) y en el caso del riñón la recuperación fue del 60.0% (Tabla 4). Para calcular el % de recuperación se tomó en cuenta el glutatión total=GSH y GSSG (se consideró que el GSSG contiene dos equivalentes de glutatión). Estos resultados confirman lo que muchos autores han comentado sobre el método de determinación fluorométrica con OPT del GSH y GSSG (66, 68).

En el caso del análisis para determinar si existe una oxidación espontánea del GSH añadido en las muestras encontramos (Tabla 5) que la oxidación mayor sucede en el caso del riñón, donde el 29.66 % del GSH fue oxidado espontáneamente por la manipulación de la muestra; mientras que en el hígado la oxidación fue solamente del 6.34%. Esto quizás haya sucedido por lo reportado por Scaduto, R. (1988) (66) que encontró que el GSH tiene una tendencia a oxidarse espontáneamente entre mayor sea la dilución de la solución. Sabemos que el riñón tiene menor GSH que el hígado, por lo que está más diluido que el GSH hepático; por lo que la oxidación tan alta en el tejido renal podría ser ocasionado por esta dilución. Esta es una de las razones por las cuales se decidió no analizar los resultados obtenidos para tejido pulmonar.

## Capítulo 8.

### Conclusión.

En nuestro estudio se encontró que las ratas DHP, dieta hipoproteica al 6%, tuvieron un menor estrés oxidativo que las ratas controles. Esto se fundamenta en los resultados de la relación GSH/GSSG; en la baja actividad de la GR y en los resultados del Dr. Javier Espinoza de las enzimas de fase I (citocromo P450) con baja actividad para el mismo grupo de animales (71).

Del estudio realizado se concluye que a pesar de que el método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un mejor método para la determinación de GSH y GSSG; el método fluorométrico utilizado es bueno en el caso de utilizar muchas muestras y poder tener una menor confiabilidad en datos. El método fluorométrico es bueno para entender tendencias (cualitativo) más que para dar valores de concentración confiables (cuantitativo).

Finalmente concluimos que una dieta baja en proteínas; sin llegar a la desnutrición disminuye el estrés oxidativo. O bien, que una dieta rica en proteínas incrementa la generación de sustancias reactivas que provocan un aumento en el estrés oxidativo tisular. Este fenómeno mostró tener mayor efecto en el hígado que en el riñón.

## Capítulo 9.

### Referencias.

1. Timbrell, J.A., Introduction to Toxicology, Taylor and Francis, Great Britain, 1989
2. Manahan, S., Toxicological Chemistry, Lewis Publishers, USA, 1989
3. Ariens, E.J., Introducción a la Toxicología General, Diana, México, 1981
4. Goodman y Gillman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ena. Ed., Mc Graw Hill Interamericana, México, 1996
5. Curtis, K., Casarett and Doull's Toxicology, 5<sup>th</sup> Ed., Mc Graw Hill, USA, 1995
6. Hernández, Francisco, Cuaderno de Toxicología 1848, Semestre 99-2, Fac. Química, UNAM
7. Mannervik, B., *et. al.*, Microsomes and Drug Oxidations, Taylor and Francis. Great Britain, 221-228, 1985
8. Mannervik, B., Chem Scripta, **26B**, 281-284
9. De Rey-Pailhade, J., C.R. Acad Sci, **106**, 1683-1694, 1888
10. De Rey-Pailhade, J., Bull Soc Hist Nat Toulouse, 173-180, 1888
11. Heffter, A., Med Naturwiss Arch, **1**, 81-103, 1908
12. Harington, C. R., and Mead, T. H., Biochem J, **29**, 1602-1611, 1935
13. Du Vigneaud, V., and Miller, G. L., J Biol Chem, **116**, 469-476, 1936
14. Meister, A., On the biochemistry of glutathione, Glutathione Centennial, Academic Press, Inc., USA, 1989
15. Kretzschmar, M., Exp Toxic Pathol, **48**, 439-446, 1996
16. Dolphin, D., Poulson, R., *et al.*, Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Part A Series: Coenzymes and Cofactors, John Wiley and Sons, USA, 1989
17. Dalton, T. P., Annu Rev Pharmacol Toxicol, **39**, 67-101, 1999
18. McKee, T., Biochemistry. WCBrown Publishers, 392-395, USA, 1996
19. Brigelius, R., Biochem Pharmacol, **32**, 2529-2534, 1983
20. Mannervik, B., *et al.*, On the biochemistry of glutathione, Glutathione Centennial, Academic Press, Inc., USA, 1989
21. Mannervik, B., Boggaram, V., Flavins and Flavoproteins, Japan Scientific Societies Press, 173-187, Japón, 1980
22. Thieme, R., Pai, E. F., J Mol Biol, **152**, 763-782, 1981
23. Askelöf, P., Axelsson, K., FEBS Lett, **38**, 263-267, 1974
24. Mannervik, B., Guthenberg, C., Conjugation Reactions in Drug Biotransformation, 101-110, Elsevier, Holanda, 1978
25. Mannervik, B., Danielson, U. H., CRC Crit Rev Biochem, **23**, 283-337, 1988
26. Seidegard, J., *et. al.*, Carcinogenesis, **7**, 751-753, 1986
27. Harada, S., Abei, M., Human Genet, **75**, 322-325, 1987
28. Bergelson, Pinjus, R., Daniel, V., Cancer Research, **54**, 36-40, 1994
29. Meister, A., Science, **200**, 471-477, 1983
30. Meister, A., Mechanisms of Drug Resistance in Neoplastic Cells; Part II Enzymatic Basis of Drug Resistance, Chap. 7, 99-126, Academic Press, USA, 1988



31. Vistica, D. T., *Pharmacol Ther*, **22**, 379-405, 1983
32. Griffith, O. W., *et. al.*, *J Biol Chem*, **254**, 1205-1210, 1979
33. Richman, P. G., *J Biol Chem*, **248**, 6684-6690, 1973
34. Griffith, O. W., and Meister, A., *Proc Natl Acad Sci U.S.*, **82**, 4668-4672, 1985
35. Martensson, J., *et. al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.*, **86**, 471-475, 1989
36. Dethmers, J. K., *Proc Natl Acad Sci U.S.*, **78**, 7492-7496, 1981
37. Anderson, M. E., Meister, A., *Methods Enzymol*, **143**, 313-325, 1987
38. Williamson, J. M., Meister, A., *Proc Natl Acad Sci U.S.*, **78**, 936-939, 1981
39. Puri, R. N., and Meister, A., *Proc Natl Acad Sci U.S.*, **80**, 5258-5260, 1983
40. Singhal, R. K., Anderson, M. E., and Meister, A., *The FASEB J*, **1**, 220-223, 1987
41. Martensson, J., *sin publicar*
42. Murata, K., *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Part A*, Chapt. 61, John Wiley and Sons, USA, 1988
43. Moore, W. R., Anderson, M. E., Maister, A., Murata, K., and Kimura, A., *Proc Natl Acad Sci U.S.*, **86**, 1989
44. Solomons, G., *Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc., USA, 1992
45. Stryer, L., *Biochemistry*, 3<sup>th</sup> Ed., W. H. Freeman and Company, USA, 1988
46. Sebrell, W., *Alimentos y Nutrición*. Offset Multicolor, S.A., Time-Life, México, 1976
47. Murray, M., *Encyclopedia of Nutritional Supplements*, Prima Publishing, USA, 1996
48. Von Braun, J., *Food Security and Nutrition*, World Food Summit, FAO, 1996
49. Raven, P., *Environment*, 2<sup>nd</sup> Ed., Saunders College Publishing, USA, 1997
50. Tórtora, G., *Principios de Anatomía y Fisiología*, 6a Ed., Harla, México, 1993
51. *Malnutrition Worldwide*, World Health Organization, USA
52. *The State of the World's Children*. 1998 report, UNICEF, USA
53. *Agricultura, Alimentación y Nutrición en México, Década de los Ochenta*, Madrigal, H., INNSZ, México, 1996.
54. *La Nutrición en México y la Transición Epidemiológica*, Chávez, A., INNSZ, México, 1993.
55. *Cuaderno de Información Estadística del Sector Salud y Seguridad Social*, INEGI, 1991-1996, México
56. *Combate a la pobreza: vertiente alimentaria*, Consejo consultivo PRONASOL y API Consultores, PRONASOL, México, 1992.
57. *Crisis económica y niveles de vida en México (1982-1985)*, Lustig, N., Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM, México, 1992.
58. *Encuesta Nacional de Alimentación en el Medio Rural, 1979*, INNSZ, México, 1980.
59. *Encuesta Nacional de Alimentación en el Medio Rural, 1989*, INNSZ, México, 1990.
60. *Necesidades esenciales en México: situación actual y prespectivas al año 2000*, Coplamar, Ed. Siglo XXI, 4a Ed., México, 1989.
61. *El gasto alimentario de la población de escasos recursos de la Ciudad de México*, INCO, Comercio Exterior. Vol.39, núm.1, México, enero de 1989, pg. 53-56.
62. *Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, ENURBAL 1994-1995*, INNSZ, México, 1995.
63. *Hernández Laos. Crecimiento económico y pobreza en México*. Colecc. Alternativas, UNAM, México, 1992.
64. *Magitud mundial de PEM*, Onis, M., *et. al.*, Unidad de Nutrición, WHO
65. Armeni, T., *et. al.*, *Mech Ageing Dev*, **101**, 1-10, 1998

66. Scaduto, R., , Anal Biochem., **174**, 265-270, 1988
67. Hissin, P. Hilf, R., Anal Biochem, **74**, 214-226, 1976
68. Senft, A., Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorometric probe o-phtalaldehyde.
69. Beutler, E., Anal Biochem., **81**, 458-460, 1977.
70. Mendel, H., Carcinogenesis, **10**, 1853-7, 1992
71. Espinoza, J., Departamento de Genética y Toxicología Ambiental. IIB, UNAM, sin publicar
72. Wallace, K., Free Radical Toxicology, Tayler & Francis, pp. 402. USA, 1997.

## **Capítulo 10.**

### **Anexos.**

#### **Anexo 1: Tratamiento de ratas.**

1. Peso inicial y peso total de órganos antes de recuperación
2. Consumo de alimento
3. Evolución de pesos individuales
4. Evolución de pesos promedio por cajas y porcentaje de aumento de pesos promedio
5. Evolución de pesos promedio por tratamiento y peso de alimento administrado
6. Evolución de pesos individuales y promedio durante recuperación
7. Peso total de órganos después de la recuperación
8. Composición de las dietas administradas

No de Rata	Peso inicial(g)	Caja	Dieta
1	51.0		DH
2	54.4		
3	55.0		
4	53.0		
5	49.0	1	
6	43.7		
7	57.1		
8	54.0		
9	51.0		
10	53.3	2	
11	46.0		
12	48.1		
13	45.5		
14	43.0		
15	42.5	3	
16	50.0		
17	44.7		
18	47.5		
19	50.0		
20	44.0	4	

No de Rata	Peso inicial(g)	Caja	Dieta	
21	53.0		DN	
23	52.5			
24	52.0			
25	56.0	5		
26	56.5			
27	49.0			
28	50.5			
29	51.0			
30	48.0	6		
31	46.5			Harland
32	42.5			
33	47.0			
34	46.5			
35	48.0			
22	55.0	7		

No. rata	Tipo de dieta	Peso total de órgano (g)		
		hígado	pulmón	riñón
1		12.5	1.9	1.6
3		10.1	1.3	1.3
5		9.3	1.7	1.0
6		9.0	1.4	1.0
8		14.0	0.7	0.9
10		9.1	2.0	1.0
13		10.5	1.0	1.3
14		11.2	0.9	0.4
15		8.7	2.1	1.2
17		10.6	1.1	1.6
18		8.6	0.7	0.9
19	DH	11.8	0.8	0.4
24		11.6	0.8	1.0
25		10.4	1.9	2.5
26		10.7	1.0	2.6
27		11.0	2.1	1.3
30	DN	9.1	1.7	2.3
31		10.4	2.0	1.5
35		10.2	1.1	1.6
22	Harland	11.5	1.9	2.2

No. ratas	No. caja	Consumo de alimento (g)												
		día:												
		3	3 a 5	5 a 7	7 a 10	10 a 13	13 a 14	14 a 17	17 a 19	19 a 24	24 a 26	26 a 28	28 a 31	31 a 33
5	1	84.6	72.9	87.5	160.0	157.0	48.0	139.0	84.0	252.5	98.1	101.4	177.2	131.0
5	2	72.5	73.4	90.0	154.8	161.0	55.9	145.0	106.8	289.0	116.6	116.6	188.3	137.2
5	3	80.0	67.0	77.5	140.5	149.0	51.0	148.0	87.3	193.0	81.5	94.2	166.3	122.2
5	4	80.0	78.8	89.0	151.6	147.5	44.7	136.5	95.5	226.0	93.2	102.4	168.9	118.5
4	5	57.6	62.4	73.0	142.5	190.0		157.4	117.1	320.8	168.6	166.8	290.0	184.8
5	6	77.0	81.5	81.6	158.4	208.9	51.1	211.0	162.0	447.7	204.6	219.2	360.0	226.7
6*	7	131.0	106.0	109.0	203.0	243.3	35.5	197.0	152.0	457.3	197.2	195.1	327.8	199.0
<b>Intervalo:</b>		<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

\* en el día 31 la rata No. 32 murió

33 a 38	38 a 42	42 a 45	No. caja	No. ratas	Consumo de alimento (g) recuperación					
					día:					
					0 a 2	2 a 4	4 a 8	8 a 10	10 a 12	12 a 15
398.8	342.4	256.0								
385.0	367.8	254.5	1	4	145.0	151.8	350.9	211.5	225.5	362.0
336.6	301.5	197.6	2	4	137.0	146.4	309.8	165.3	173.2	302.0
360.8	297.5	219.4	3	4	204.6	204.2	347.5	169.5	175.5	312.7
479.3	424.0	260.4	4	2	91.0	97.2	145.0	74.2	78.2	133.2
581.2	497.5	314.0	<b>Intervalo:</b>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
514.6	335.4	312.3								
5	4	3								

**Consumo de alimento promedio (g)/día/rata**

No. ratas	No. caja	Consumo de alimento promedio (g)/día/rata												
		día:												
		3	5	7	10	13	14	17	19	24	26	28	31	33
DHP	1	5.64	7.29	8.75	10.67	10.47	9.6	9.267	8.4	10.1	9.81	10.14	11.81	13.1
	2	4.833	7.34	9	10.32	10.73	11.18	9.667	10.68	11.56	11.66	11.66	12.55	13.72
	3	5.333	6.7	7.75	9.367	9.933	10.2	9.867	8.73	7.72	8.15	9.42	11.09	12.22
	4	5.333	7.88	8.9	10.11	9.833	8.94	9.1	9.55	9.04	9.32	10.24	11.26	11.85
DNP	5	4.8	7.8	9.125	11.88	15.83		13.12	14.64	16.04	21.08	20.85	24.17	23.1
	6	5.133	8.15	8.16	10.56	13.93	10.22	14.07	16.2	17.91	20.46	21.92	24	22.67
Har	7	7.278	8.833	9.083	11.28	13.52	5.917	10.94	12.67	15.24	16.43	16.26	18.21	19.9

REC									
38	42	45	47	49	53	55	57	60	
15.95	17.12	17.07	18.13	18.98	21.93	26.44	28.19	30.17	
15.4	18.39	16.97	17.13	18.3	19.36	20.66	21.65	25.17	
13.46	15.08	13.17							
14.43	14.88	14.63							
23.97	26.5	21.7	25.58	25.53	21.72	21.19	21.94	26.06	
23.25	24.88	20.93							
20.58	16.77	20.82	22.75	24.3	18.13	18.55	19.55	22.2	

No. caja	No. rata	Dia:	Peso de rata (g)																
			0	3	5	7	10	13	14	17	19	24	26	28	31	33	38	42	45
1	1		51.0	51.1	55.2	62.1	73.3	86.5	89.2	98.0	103.2	113.8	121.1	129.0	145.2	156.8	189.5	208.2	222.0
	2		54.4	56.6	59.2	62.8	75.4	84.0	83.5	87.1	87.4	86.2	89.0	91.5	100.0	107.0	136.0	164.6	176.1
	3		55.0	60.0	65.2	70.3	85.0	93.8	96.3	101.1	103.6	111.0	114.8	122.6	131.0	141.0	168.0	193.6	210.0
	4		53.0	54.5	56.1	58.3	66.8	73.1	74.0	78.8	82.7	90.0	94.3	98.3	106.4	115.3	138.3	161.6	180.0
	5		49.0	50.0	53.7	59.0	68.5	75.7	75.2	80.5	81.1	87.6	92.5	95.5	106.3	111.8	134.4	155.4	166.4
2	6		43.7	45.4	49.2	51.5	57.5	65.0	65.4	69.3	74.0	87.2	89.4	91.8	95.3	100.0	116.7	139.0	156.1
	7		57.1	60.8	64.0	71.1	83.4	92.5	97.2	101.6	107.0	121.5	126.0	134.0	140.0	148.5	172.0	197.4	208.1
	8		54.0	54.8	58.9	64.2	74.8	83.1	87.1	93.4	99.5	117.4	122.5	130.8	142.5	153.8	183.8	207.1	219.0
	9		51.0	51.0	53.5	58.0	66.4	76.8	83.0	91.0	98.0	116.4	122.2	130.0	140.2	149.7	173.0	202.0	213.1
	10		53.3	54.5	60.4	67.0	77.4	85.0	88.7	91.4	95.0	105.8	108.4	114.8	125.7	137.0	157.8	184.1	197.0
3	11		46.0	47.0	49.0	53.5	61.8	68.1	69.8	76.8	79.0	83.1	83.6	87.2	92.3	99.5	113.6	127.8	136.1
	12		48.1	52.0	58.0	62.8	75.6	87.4	91.8	98.0	96.7	110.2	111.6	118.5	130.0	138.2	165.0	175.4	197.4
	13		45.5	48.0	51.8	55.4	61.4	69.3	71.1	82.4	86.5	97.3	99.8	104.0	114.5	122.0	144.4	162.4	173.0
	14		43.0	45.0	48.5	54.1	63.0	70.0	73.0	79.2	83.5	92.0	95.0	100.4	105.0	112.5	128.0	151.0	159.1
	15		42.5	46.9	48.2	51.0	56.5	58.8	61.1	67.3	72.7	83.6	80.3	88.1	100.6	108.0	127.8	147.7	156.6
4	16		50.0	51.5	56.7	62.1	71.2	78.7	81.0	91.4	94.1	105.9	109.3	116.4	124.0	131.0	151.3	172.6	188.0
	17		44.7	49.5	54.5	61.0	73.2	81.2	81.5	87.5	90.0	95.5	100.7	107.0	114.8	124.1	153.5	172.8	189.4
	18		47.5	50.0	56.7	61.0	68.8	77.4	87.0	84.0	89.5	97.1	98.3	103.5	114.6	122.5	145.5	165.5	173.0
	19		50.0	51.5	59.1	66.2	77.0	85.8	77.0	93.4	98.5	110.0	113.2	121.0	130.6	138.7	165.3	178.2	189.4
	20		44.0	44.5	50.0	54.6	63.7	71.2	73.1	78.6	82.4	93.1	94.0	99.1	110.1	115.8	135.4	146.4	162.0
5	21		53.0	58.5	66.0	72.5	88.5	98.0	100.0	111.4	119.8	152.0	166.0	174.0	194.3	205.0	219.8	243.5	253.4
	23		52.5	56.3	64.0	71.0	86.5	94.0	99.0	100.5	109.0	140.0	149.6	157.6	178.2	190.0	216.4	243.6	250.5
	24		52.0	56.0	61.4	70.2	85.0	98.5	106.0	119.5	139.0	167.3	181.0	192.1	212.1	224.5	244.1	268.0	273.1
	25		56.0	56.0	63.0	68.0	81.0	96.0	99.2	114.5	125.7	153.5	161.2	172.1	193.2	204.8	221.0	242.0	262.3
	26		56.5	58.5	62.5	68.0	80.0	93.0	98.8	110.0	120.5	145.2	159.0	173.5	190.5	202.0	223.0	250.5	263.5
6	27		49.0	53.5	60.5	66.5	80.5	97.5	104.5	120.0	138.5	165.2	179.7	193.5	211.1	219.2	236.6	244.0	258.4
	28		50.5	53.0	59.5	64.5	79.1	93.5	99.8	116.5	130.0	168.8	178.8	192.4	211.0	220.8	240.0	266.8	274.6
	29		51.0	54.0	66.1	71.4	83.4	98.0	105.0	122.0	132.4	168.0	177.7	189.4	210.6	217.0	237.6	249.8	258.6
	30		48.0	55.0	63.0	67.5	78.3	89.5	95.0	102.0	111.5	134.4	142.0	152.0	169.2	178.7	203.7	214.4	230.0
	31		46.5	56.5	66.0	74.5	90.0	108.0	101.0	114.2	123.5	154.0	167.8	181.5	202.6	207.5	234.4	253.0	276.2
7	32		42.5	49.8	57.7	62.5	80.0	100.0	98.3	104.0	105.2	129.2	135.8	128.3	129.9	...	...	...	...
	33		47.0	54.0	64.5	71.0	86.3	94.0	105.4	113.0	125.7	152.0	167.8	177.6	194.4	210.0	232.0	250.0	264.4
	34		46.5	56.5	68.4	77.4	94.0	104.0	105.5	107.5	121.0	146.3	158.0	169.0	187.2	197.7	221.5	243.5	264.6
	35		48.0	58.1	69.6	78.4	94.4	106.7	103.3	113.3	120.0	145.2	151.7	165.7	179.4	192.0	210.5	239.0	260.0
	22		55.0	63.6	73.0	81.0	97.6	115.4	122.2	139.1	155.1	183.6	200.5	212.3	230.5	246.1	267.1	285.0	302.0

No. ratas	No. caja	Peso promedio de ratas (g)												
		Día:												
		0	3	5	7	10	13	14	17	19	24	26	28	31
5	DHP1	52.48	54.44	57.88	62.50	73.80	82.62	83.64	89.10	91.60	97.72	102.34	107.38	117.78
5	DHP2	51.82	53.30	57.20	62.36	71.90	80.48	84.28	89.34	94.70	109.66	113.70	120.28	128.74
5	DHP3	45.02	47.78	51.10	55.36	63.66	70.72	73.36	80.74	83.68	93.24	94.06	99.64	108.48
5	DHP4	47.24	49.40	55.40	60.98	70.78	78.86	79.92	86.98	90.90	100.32	103.10	109.40	118.82
4	DNP1	53.38	56.70	63.60	70.43	85.25	96.63	101.05	111.48	123.38	153.20	164.45	173.95	194.45
5	DNP2	51.00	54.80	62.32	67.58	80.26	94.30	100.62	114.10	126.58	156.32	167.44	180.16	198.48
6*	Har	47.58	56.42	66.53	74.13	90.38	104.68	105.95	115.18	125.08	151.72	163.60	172.40	187.33

\* en el día 31 la rata No. 32 murió

	33	38	42	45
	126.38	153.24	176.68	190.90
	137.80	160.66	185.92	198.66
	116.04	135.76	152.86	164.44
	126.42	150.20	167.10	180.36
	206.08	225.33	249.28	259.83
	207.54	228.18	245.10	257.02
	210.70	233.10	254.10	273.44



No. ratas	No. caja	Porcentaje de aumento de peso promedio de ratas (%)												
		Día:												
		3	5	7	10	13	14	17	19	24	26	28	31	33
5	1	3.73	6.32	7.98	18.08	11.95	1.23	6.53	2.81	6.68	4.73	4.92	9.69	7.30
5	2	2.86	7.32	9.02	15.30	11.93	4.72	6.00	6.00	15.80	3.68	5.79	7.03	7.04
5	3	6.13	6.95	8.34	14.99	11.09	3.73	10.06	3.64	11.42	0.88	5.93	8.87	6.97
5	4	4.57	12.15	10.07	16.07	11.42	1.34	8.83	4.51	10.36	2.77	6.11	8.61	6.40
4	5	6.23	12.17	10.73	21.05	13.34	4.58	10.32	10.68	24.17	7.34	5.78	11.78	5.98
5	6	7.45	13.72	8.44	18.76	17.49	6.70	13.40	10.94	23.50	7.11	7.60	10.17	4.56
6*	7	18.56	17.93	11.42	21.92	15.82	1.21	8.71	8.59	21.29	7.83	5.38	8.66	12.47

	38	42	45
	21.25	15.30	8.05
	16.59	15.72	6.85
	16.99	12.60	7.58
	18.81	11.25	7.94
	9.34	10.63	4.23
	9.95	7.42	4.86
	10.63	9.01	7.61

Anexo 1

5.

Cajas	No. ratas	Tipo dieta	Peso promedio de ratas (g)												
			Día:												
			0	3	5	7	10	13	14	17	19	24	26	28	31
1,2,3,4	20	DH	49.14	51.23	55.40	60.30	70.04	78.17	80.30	86.54	90.22	100.24	103.30	109.18	118.46
5,6	9	DN	52.19	55.75	62.96	69.00	82.76	95.46	100.84	112.79	124.98	154.76	165.95	177.06	196.47
7	6*	Harland	47.58	56.42	66.53	74.13	90.38	104.68	105.95	115.18	125.08	151.72	163.60	172.40	187.33

\* en el día 31 la rata No. 32 murió

33	38	42	45
126.66	149.97	170.64	183.59
206.81	226.75	247.19	258.42
175.55	194.25	211.75	227.87

No. caja	No. ratas	Peso de alimento (g)													
		día 0	3	5	7	10	13	14	17	19	24	26	28	31	33
		400.0		500.0		500.0		500.0	1000	500.0		500.0	500.0	1000.0	
1	5	400.0	315.4	242.5	412.5	252.5	343.0	295.0	361.8	277.0	747.5	401.9	300.5	322.8	369.0
2	5	400.0	327.5	254.1	410.0	255.2	339.0	283.1	355.0	248.2	711.0	383.4	266.8	311.7	362.8
3	5	400.0	320.0	253.0	422.5	282.0	351.0	300.0	352.0	264.7	807.0	418.5	324.3	333.7	377.8
4	5	400.0	320.0	241.2	411.0	259.4	352.5	307.8	363.5	268.0	774.0	406.8	304.4	331.1	381.5
5	4	400.0	342.4	280.0	427.0	284.5	310.0	300.0	342.6	225.5	649.2	331.4	164.6	210.0	315.2
6	5	400.0	323.0	241.5	418.4	260.0	291.1	240.0	289.0	127.0	552.3	295.4	76.2	140.2	273.3
7	6*	400.0	269.0	163.0	391.0	188.0	256.7	221.2	303.0	151.0	542.1	302.8	107.7	172.2	301.0

38	42	45
500.0	500.0	500.0
401.2	157.6	244.0
415.0	132.2	245.5
463.4	198.5	302.4
439.2	202.5	280.6
520.7	76.0	239.6
418.8	25.0	180.0
485.4	164.6	187.5

No. caja	No. ratas	Peso alimento (g) en recuperación								Dieta	
		día 0	2	4	8	10	12	15	inicio	rec.	
		500.0	500.0	500.0	500.0						
1	4	500.0	355.0	203.2	149.1	288.5	63.0	138.0	DH	DN	
2	4	500.0	363.0	216.6	190.2	334.7	161.5	198.0			
3	4	500.0	295.1	90.8	152.5	330.5	155.0	187.3	DN		
4	2	500.0	409.0	311.8	355.0	425.8	347.6	366.8	Har.	Har.	



Anexo 1  
6.

No. caja	No. rata	Día:	Peso de rata en recuperación (g)						Dieta original	Dieta recuperación		
			2	4	8	10	12	15				
1	2		193.5	214.2	231.8	239.3	248.8	265.8	DH	DN		
	4		196.3	222.4	239.0	251.9	267.2	290.0				
	7		220.7	237.3	257.0	265.7	278.0	303.7				
	9		228.3	248.5	256.0	266.1	278.8	300.0				
2	11		151.5	170.0	187.0	196.9	210.5	218.0				
	12		211.5	233.4	245.7	257.0	268.4	278.4				
	16		198.9	216.7	226.6	234.8	246.6	254.2				
	20		177.5	197.1	210.0	211.2	214.0	230.5				
3	21		260.4	272.0	280.0	282.9	287.0	288.0			DN	DN
	23		264.2	280.0	284.4	286.5	290.3	293.2				
	28		286.3	300.0	302.5	305.9	313.1	329.3				
	29		213.9	272.0	284.4	286.8	292.8	303.6				
4	33		272.4	285.0	286.0	289.6	295.2	307.7				
	34		270.1	277.8	282.0	285.4	290.4	298.7	Harland	Harland		

No. ratas	No. caja	Peso de rata en recuperación (g)						
		Día:	2	4	8	10	12	15
8	RecDHP		197.275	217.45	231.6375	240.3625	251.5375	267.575
4	RecDNP		256.2	281	287.825	290.525	295.8	303.525
2	RecHar		271.25	281.4	284	287.5	292.8	303.2

Anexo 1  
7.

No. caja	No. rata	Peso total de órgano (g)			Dieta original	Dieta recuperación
		hígado	pulmón	riñón		
1	2	13.3	2.1	2.2		
	4	14.4	1.9	2.4		
	7	17.6	1.5	2.5		
	9	14.5	0.8	2.2		
	11	10.1	2.2	1.9		
	12	13.3	2.2	1.3		
2	16	12.2	2.0	2.5	DH	
	20*	...	...	...		
3	21	12.4	1.1	2.0	DN	DN
	23	12.3	1.6	2.4		
	28	14.8	2.0	2.4		
	29	13.7	1.7	2.8		
	33	13.1	1.5	1.2		
4	34	13.0	1.8	2.0	Harland	Harland

\* La rata 20 desarrolló tumor de riñón

## Anexo I

### 8. Composición de las dietas administradas

1. La dieta Har fue la número: TD 90017 comprada de los Laboratorios Harland.
2. Las dietas DHP y DNP fueron producidas por el Laboratorio Abene, S. A. de C.V. bajo la clave 71000 (Tel.: 91-5-378-0130).

- **Análisis de laboratorio por el método A.O.A.C. Químico Proximal del alimento DHP y DNP en el Laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM:**

(muestras 403 y 404 del 14 de mayo de 1997)

	DNP	DHP	unidades
Materia seca	93.65	97.42	%
Humedad	6.35	2.58	%
%P.C. (nitrógeno)	25.84	12.78	%
Extracto etéreo	6.72	6.63	%
Cenizas	9.08	3.89	%
Fibra cruda	3.60	5.09	%
Extracto libre de nitrógeno	48.41	69.03	%
T.N.D. %	78.35	87.68	%
Energía D.	3454.34	3865.80	cal/g
Energía M.	2832.26	3169.62	cal/g
Energía bruta	5.033	4.976	Kcal/g

- **Reporte de la dieta DNP elaborada por Laboratorios Abene:**

No menos de, proteína cruda	23%
No menos de, grasa cruda	4.5%
No más de, fibra cruda	6.0%
No más de, humedad	12.0%
No más de, cenizas	8.0%
No más de, minerales añadidos	2.5%
E.L.N.	46.50%

---

Proteínas	23.00%
Arg	1.44%
Lys	1.40%
Met	0.43%

Tre	0.90%
Trp	0.28%
Val	1.19%
Grasa	4.5%
Fibra cruda	5.5%
Total Nutrientes Digeribles	77.00%
Extracto libre de nitrógeno	46.50%
Cenizas	8.00%
Ca	0.95%
P	0.67%
K	1.10%
Mg	0.20%
Na	0.40%
Cl	0.48%
Zn	73.30ppm
Co	0.40ppm
I	0.80ppm
Cr	1.40ppm
Carotenos	4.50ppm
Tiamina	15.10ppm
Riboflavina	5.50ppm
Niacina	60.00ppm
Ac. Pantoténico	15.00ppm
Biotina	0.10ppm
Vit. B12	19.80mcg
Vit. A	22.00U.I./gr
Vit. D3	4.50 U.I./gr
Vit. E	49.00 U.I./gr
Vit. K	0.50ppm

Energía bruta: 5.033 Kcal/g

## **Anexo 2: Determinaciones experimentales.**

1. Resultados de la determinación de proteínas
2. Curvas patrón utilizadas para determinación de proteínas, GSH y GSSG
3. Resultados de la determinación de GSH
4. Resultados de la determinación de GSSG
5. Valores individuales y promedio de la razón GSH/GSSG
6. Valores de Glutación total
7. Análisis de la relación entre la cantidad de NADPH y la velocidad de reacción (GR)
8. Resultados de la determinación de actividad de la GR
9. Resultados del estudio de control

Anexo 2

1.

Muestra	Abs promedio	ug Prot/ uL homog	ug Prot/uL homog prom		Abs promedio	ug Prot/ uL homog	ug Prot/uL homog prom		
<b>DNP</b>					<b>Rec DNP</b>				
Hígado	24	0.2330	56.47		Hígado	21	0.5405	61.99	
	25	0.1650	30.71			23	0.5285	60.35	
	26	0.1765	40.75			28	0.2440	21.60	
	27	0.1410	31.85			29	0.4480	49.39	48.33
	30	0.1665	40.36	40.03	Riñón	21	0.1875	13.90	
Riñón	24	0.2475	24.57			23	0.2680	24.87	
	25	0.1880	16.79			28	0.2965	28.75	
	26	0.2600	26.21			29	0.1080	30.75	24.57
	27	0.3155	33.46		<b>Rec Har</b>				
	30	0.1930	17.45	23.70	Hígado	33	0.4820	54.02	
<b>Harland</b>						34	0.3485	35.83	44.93
Hígado	22	0.5290	61.37		Riñón	33	0.1380	7.16	
	31	0.4790	54.83			34	0.2275	19.35	13.26
	35	0.4105	45.88	54.03	<b>Rec DHP</b>				
Riñón	22	0.2790	28.69		Hígado	2	0.5405	61.99	
	31	0.2540	25.43			4	0.4955	55.86	
	35	0.2390	23.47	25.86		7	0.4755	53.13	
<b>DHP</b>						9	0.2785	26.30	
Hígado	1	0.4410	77.86			11	0.4860	54.56	
	3	0.3415	59.14			12	0.3195	31.88	
	5	0.2630	44.37			16	0.2795	26.43	
	6	0.4015	70.43			20	0.6190	72.68	47.85
	8	0.3000	51.33		Riñón	2	0.2770	26.10	
	10	0.3005	51.43			4	0.3035	29.71	
	13	0.3360	58.11			7	0.2795	26.43	
	14	0.3035	51.99			9	0.2325	20.03	
	15	0.3630	63.19			11	0.1920	14.52	
	17	0.3440	59.61			12	0.1510	8.93	
	18	0.2575	43.33			16	0.1335	6.55	
	19	0.3035	51.99	56.90		20	0.1715	11.72	18.00
Riñón	1	0.3005	34.28						
	3	0.1365	13.71						
	5	0.2340	25.94						
	6	0.2935	33.40						
	8	0.2960	33.72						
	10	0.2180	23.93						
	13	0.3115	35.66						
	14	0.2640	29.70						
	15	0.3550	41.12						
	17	0.1755	18.60						
	18	0.2835	32.15						
	19	0.2450	27.32	29.13					

**Curva patrón para Proteínas**

ug BSA	Promedio	Abs1	Abs2
0	0	0	0
1.25	0.105	0.105	0.105
2.5	0.2116	0.230	0.220
5	0.3243	0.357	0.386
7.5	0.4153	0.402	0.411
10	0.577	0.634	0.550
12.5	0.7	0.700	0.700

**Curva patrón para GSH**

ug GSH	Fluorom1	Fluorom2
10	931	926
7.5	694	687
5	480	487
2.5	237	241
1.25	121	114

**Curva patrón para GSSG**

ng GSSG	Fluorom1	Fluorom1
100	9	9
50	4	5
25	1	2
0	0	0

Anexo 2

3.

Muestra	Unidades Fluorométricas	ug GSH (sin diluir)	ug GSH/ uL homog	ug Prot/ uL homog	ug GSH/ mg Prot	ug GSH/ mg Prot promedio
<b>DNP</b>						
<b>Hígado</b>						
	24	472.5	5.0433	0.15121	56.47	2.678
	25	383.0	4.0676	0.12203	30.71	3.974
	26	525.0	5.6108	0.16832	40.75	4.131
	27	380.0	4.0350	0.12105	31.85	3.801
	30	246.0	2.5787	0.07736	40.36	1.917
						3.300
<b>Riñón</b>						
	24	106.5	1.0627	0.03188	24.57	1.298
	25	95.5	0.9432	0.02830	16.79	1.685
	26	124.0	1.2529	0.03759	26.21	1.434
	27	102.5	1.0193	0.03058	33.46	0.914
	30	17.5	0.0955	0.00287	17.45	0.164
						1.099
<b>Harland</b>						
<b>Hígado</b>						
	22	575.0	6.1542	0.18463	61.37	3.008
	31	560.0	5.9912	0.17974	54.83	3.278
	35	522.5	5.5836	0.16751	45.88	3.651
						3.312
<b>Riñón</b>						
	22	115.0	1.1551	0.03465	28.69	1.208
	31	36.5	0.8454	0.02536	25.43	0.997
	35	143.5	1.4648	0.04394	23.47	1.872
						1.359
<b>DHP</b>						
<b>Hígado</b>						
	1	798.5	8.5830	0.28610	77.86	3.675
	3	723.5	7.7680	0.25893	59.14	4.378
	5	833.5	8.9634	0.26890	44.37	6.060
	6	786.0	8.4472	0.25342	70.43	3.598
	8	820.5	8.8222	0.26466	51.33	5.156
	10	698.5	7.4963	0.22489	51.43	4.373
	13	910.5	9.8002	0.29401	58.11	5.059
	14	809.0	8.6971	0.26091	51.99	5.019
	15	804.0	8.6428	0.25928	63.19	4.103
	17	747.0	8.0234	0.24070	59.61	4.038
	18	770.0	8.2733	0.24820	43.33	5.728
	19	789.5	8.4853	0.25456	51.99	4.896
						4.674
<b>Riñón</b>						
	1	173.5	1.7910	0.05373	34.28	1.567
	3	73.5	0.7041	0.02112	13.71	1.541
	5	113.0	1.1333	0.03400	25.94	1.311
	6	148.0	1.5137	0.04541	33.40	1.360
	8	143.5	1.4648	0.04394	33.72	1.303
	10	122.0	1.2312	0.03694	23.93	1.543
	13	148.5	1.5192	0.04558	35.66	1.278
	14	123.5	1.2475	0.03743	29.70	1.260
	15	157.5	1.6170	0.04851	41.12	1.180
	17	93.5	0.9214	0.02764	18.60	1.486
	18	158.0	1.6224	0.04867	32.15	1.514
	19	163.5	1.6821	0.05046	27.32	1.847
						1.433
<b>Rec DNP</b>						



Anexo 2

3.

Hígado	21	480.0	5.1217	0.15365	61.99	2.479	
	23	486.5	5.1924	0.15577	60.35	2.581	
	28	267.5	2.8124	0.08437	21.60	3.906	
	29	486.0	5.1869	0.15561	49.39	3.151	3.029
Riñón	21	112.0	1.1225	0.03368	13.90	2.423	
	23	121.0	1.2203	0.03661	24.87	1.472	
	28	162.0	1.6659	0.04998	28.75	1.738	
	29	78.5	0.7584	0.02275	30.75	0.740	1.593
<b>Rec Har</b>							
Hígado	33	493.0	5.2630	0.15789	54.02	2.923	
	34	391.0	4.1545	0.12464	35.83	3.479	3.201
Riñón	33	102.0	1.0138	0.03041	7.16	4.248	
	34	124.0	1.2529	0.03759	19.35	1.942	3.095
<b>Rec DHP</b>							
Hígado	2	653.0	7.0019	0.21006	61.99	3.389	
	4	633.0	6.7845	0.20354	55.86	3.644	
	7	611.0	6.5454	0.19636	53.13	3.696	
	9	292.0	3.0787	0.09236	26.30	3.512	
	11	588.0	6.2954	0.18886	54.56	3.462	
	12	442.0	4.7088	0.14126	31.88	4.431	
	16	332.0	3.5133	0.10540	26.43	3.988	
	20	549.5	5.8771	0.17631	72.68	2.426	3.568
Riñón	2	145.5	1.4866	0.04460	26.10	1.709	
	4	139.5	1.4213	0.04264	29.71	1.435	
	7	162.5	1.6713	0.05014	26.43	1.897	
	9	134.5	1.3670	0.04101	20.03	2.047	
	11	65.0	0.6117	0.01835	14.52	1.264	
	12	157.5	1.6170	0.04851	8.93	5.432	
	16	101.5	1.0085	0.03025	6.55	4.619	
	20	83.0	0.8073	0.02422	11.72	2.067	2.559

Anexo 2

4.

Muestra	Unidades Fluorométricas	ng GSSG (sin diluir)	ug GSSG/ uL homog	ug Prot/ uL homog	ug GSSG/ mg Prot	ug GSSG/ mg Prot promedio
<b>DNP</b>						
Hígado						
24	132.5	1431.3492	0.21470	56.47	3.80	
25	110.5	1193.6913	0.17905	30.71	5.83	
26	167.5	1809.4415	0.27142	40.75	6.66	
27	122.5	1323.3229	0.19850	31.85	6.23	
30	104.0	1123.4741	0.16852	40.36	4.18	5.34
Riñón						
24	76.0	821.0003	0.12315	24.57	5.01	
25	71.5	772.3885	0.11586	16.79	6.90	
26	93.5	1010.0465	0.15151	26.21	5.78	
27	105.0	1134.2768	0.17014	33.46	5.08	
30	53.0	572.5397	0.08588	17.45	4.92	5.54
<b>Harland</b>						
Hígado						
22	147.0	1587.9875	0.23820	61.37	3.88	
31	98.5	1064.0516	0.15961	54.83	2.91	
35	130.5	1409.7440	0.21146	45.88	4.61	3.80
Riñón						
22	81.5	880.4148	0.13206	28.69	4.60	
31	79.0	853.4082	0.12801	25.43	5.03	
35	75.5	815.5390	0.12234	23.47	5.21	4.95
<b>DHP</b>						
Hígado						
1	79.0	853.4082	0.14223	77.86	1.83	
3	79.0	853.4080	0.14223	59.14	2.41	
5	160.5	1733.8231	0.26007	44.37	5.86	
6	148.5	1604.1914	0.24063	70.43	4.42	
8	151.5	1636.5993	0.24549	51.33	4.78	
10	145.5	1571.7835	0.23577	51.43	4.58	
13	151.5	1636.5993	0.24549	58.11	4.22	
14	137.5	1485.3624	0.22280	51.99	4.29	
15	130.0	1404.3427	0.21065	63.19	3.33	
17	127.0	1371.9348	0.20579	59.61	3.45	
18	154.0	1663.6059	0.24954	43.33	5.76	
19	149.0	1609.5927	0.24144	51.99	4.64	4.05
Riñón						
1	52.0	561.7371	0.08426	34.28	2.46	
3	41.0	442.9081	0.06644	13.71	4.85	
5	57.5	621.1516	0.09317	25.94	3.59	
6	61.5	664.3621	0.09965	33.40	2.98	
8	67.0	723.7766	0.10857	33.72	3.22	
10	59.0	637.3555	0.09560	23.93	4.00	
13	46.5	502.3226	0.07535	35.66	2.11	
14	41.0	442.9081	0.06644	29.70	2.24	
15	71.0	766.9871	0.11505	41.12	2.80	
17	37.5	405.0988	0.06076	18.60	3.27	
18	87.0	939.8293	0.14097	32.15	4.38	
19	83.0	896.6188	0.13449	27.32	4.92	3.40
<b>Rec DNP</b>						

Anexo 2

4.

<b>Hígado</b>							
	21	112.0	1209.8952	0.18148	61.99	2.93	
	23	113.5	1226.0992	0.18391	60.35	3.05	
	28	62.0	669.7634	0.10046	21.60	4.65	
	29	114.0	1231.5005	0.18473	49.39	3.74	3.59
<b>Riñón</b>							
	21	81.0	875.0135	0.13125	13.90	9.44	
	23	101.5	1096.4675	0.16447	24.87	6.61	
	28	100.0	1080.2636	0.16204	28.75	5.64	
	29	48.5	523.9278	0.07859	30.75	2.56	6.06
<b>Rec Har</b>							
<b>Hígado</b>							
	33	101.5	1096.4675	0.16447	54.02	3.04	
	34	83.0	896.6188	0.13449	35.83	3.75	3.40
<b>Riñón</b>							
	33	72.0	777.7898	0.11667	7.16	16.29	
	34	76.5	826.4016	0.12396	19.35	6.41	11.35
<b>Rec DHP</b>							
<b>Hígado</b>							
	2	129.5	1398.9413	0.20984	61.99	3.39	
	4	135.0	1458.3558	0.21875	55.86	3.92	
	7	132.0	1425.7479	0.21389	53.13	4.03	
	9	28.5	307.3751	0.04618	26.30	1.76	
	11	128.0	1382.7374	0.20741	54.56	3.80	
	12	65.5	707.5726	0.10614	31.88	3.33	
	16	79.0	853.4082	0.12801	26.43	4.84	
	20	152.0	1642.0006	0.24630	72.68	3.39	3.56
<b>Riñón</b>							
	2	87.0	939.8293	0.14097	26.10	5.40	
	4	65.0	702.1713	0.10533	29.71	3.55	
	7	79.5	858.8095	0.12882	26.43	4.87	
	9	59.5	642.7568	0.09641	20.03	4.81	
	11	26.5	286.2698	0.04294	14.52	2.96	
	12	81.0	875.0135	0.13125	8.93	14.70	
	16	72.0	777.7898	0.11667	6.55	17.81	
	20	37.5	405.0988	0.06076	11.72	5.18	7.41

Anexo 2  
5.

Muestra	ug GSH/ mg Prot	ug GSSG/ mg Prot	GSH/ GSSG	prom GSH /GSSG	SD		ug GSH/ mg Prot	ug GSSG/ mg Prot	GSH/ GSSG	prom GSH /GSSG	SD
<b>DNP</b>											
Hígado						<b>Rec DNP</b>					
24	2.68	3.80	0.70			Hígado	21	2.48	2.93	0.85	
25	3.97	5.83	0.68			23	2.58	3.05	0.85		
26	4.13	6.66	0.62			28	3.91	4.65	0.84		
27	3.80	6.23	0.61			29	3.15	3.74	0.84	0.84 0.00	
30	1.92	4.18	0.46	0.61	0.10	Riñón					
Riñón						21	2.42	9.44	0.26		
24	1.30	5.01	0.26			23	1.47	6.61	0.22		
25	1.69	6.90	0.24			28	1.74	5.64	0.31		
26	1.43	5.78	0.25			29	0.74	2.56	0.29	0.27 0.04	
27	0.91	5.08	0.18			<b>Rec Har</b>					
30	0.16	4.92	0.03	0.19	0.09	Hígado					
<b>Harland</b>						33	2.92	3.04	0.96		
Hígado						34	3.48	3.75	0.93	0.94 0.02	
22	3.01	3.88	0.78			Riñón					
31	3.28	2.91	1.13			33	4.25	16.29	0.26		
35	3.65	4.61	0.79	0.90	0.20	34	1.94	6.41	0.30	0.28 0.03	
Riñón						<b>Rec DHP</b>					
22	1.21	4.60	0.26			Hígado					
31	1.00	5.03	0.20			2	3.39	3.39	1.00		
35	1.87	5.21	0.36	0.27	0.08	4	3.64	3.92	0.93		
<b>DHP</b>						7	3.70	4.03	0.92		
Hígado						9	3.51	1.76	2.00		
1	3.67	1.83	2.01			11	3.46	3.80	0.91		
3	4.38	2.41	1.82			12	4.43	3.33	1.33		
5	6.06	5.86	1.03			16	3.99	4.84	0.82		
6	3.60	3.42	1.05			20	2.43	3.39	0.72	1.08 0.41	
8	5.16	4.78	1.08			Riñón					
10	4.37	4.58	0.95			2	1.71	5.40	0.32		
13	5.06	4.22	1.20			4	1.44	3.55	0.40		
14	5.02	4.29	1.17			7	1.90	4.87	0.39		
15	4.10	3.33	1.23			9	2.05	4.81	0.43		
17	4.04	3.45	1.17			11	1.26	2.96	0.43		
18	5.73	5.76	0.99			12	5.43	14.70	0.37		
19	4.90	4.64	1.05	1.23	0.33	16	4.62	17.81	0.26		
Riñón						20	2.07	5.18	0.40	0.37 0.06	
1	1.57	2.46	0.64								
3	1.54	4.85	0.32								
5	1.31	3.59	0.36								
6	1.36	2.98	0.46								
8	1.30	3.22	0.40								
10	1.54	4.00	0.39								
13	1.28	2.11	0.60								
14	1.26	2.24	0.56								
15	1.18	2.80	0.42								
17	1.49	3.27	0.45								
18	1.51	4.38	0.35								
19	1.85	4.92	0.38	0.44	0.10						

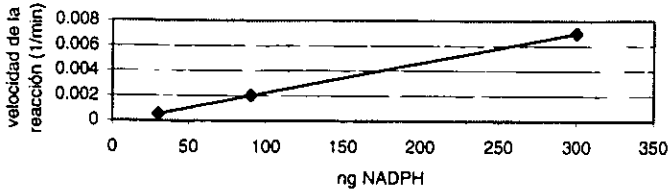
Anexo 2

6.

Muestra	ug GSH/ mg Prot	ug GSSG/ mg Prot	ug glutatión total		ug GSH/ mg Prot	ug GSSG/ mg Prot	ug glutatión total
<b>DNP</b>				<b>Rec DNP</b>			
Hígado				Hígado			
24	2.68	3.80	10.28180936	21	2.48	2.93	8.3339178
25	3.97	5.83	15.6344962	23	2.58	3.05	8.67608534
26	4.13	6.66	17.45169205	28	3.91	4.65	13.2083809
27	3.80	6.23	16.26520776	29	3.15	3.74	10.6308392
30	1.92	4.18	10.26767191	Riñón			
Riñón				21	2.42	9.44	21.3078454
24	1.30	5.01	11.32198198	23	1.47	6.61	14.6984142
25	1.69	6.90	15.48613692	28	1.74	5.64	13.0106252
26	1.43	5.78	12.99507575	29	0.74	2.56	5.85143257
27	0.91	5.08	11.08370679	<b>Rec Har</b>			
30	0.16	4.92	10.00730716	Hígado			
<b>Harland</b>				33	2.92	3.04	9.01203742
Hígado				34	3.48	3.75	10.9857838
22	3.01	3.88	10.77108751	Riñón			
31	3.28	2.91	9.099999805	33	4.25	16.29	36.8368484
35	3.65	4.61	12.86903211	34	1.94	6.41	14.7549092
Riñón				<b>Rec DHP</b>			
22	1.21	4.60	10.41399255	Hígado			
31	1.00	5.03	11.06505975	2	3.39	3.39	10.1587014
35	1.87	5.21	12.29755866	4	3.64	3.92	11.4758638
<b>DHP</b>				7	3.70	4.03	11.7475321
Hígado				9	3.51	1.76	7.02366298
1	3.67	1.83	7.328145518	11	3.46	3.80	11.0645751
3	4.38	2.41	9.188407339	12	4.43	3.33	11.0895795
5	6.06	5.86	17.78338778	16	3.99	4.84	13.6746678
6	3.60	3.42	10.43125695	20	2.43	3.39	9.20353872
8	5.16	4.78	14.72130526	Riñón			
10	4.37	4.58	13.54120269	2	1.71	5.40	12.5132432
13	5.06	4.22	13.50861812	4	1.44	3.55	8.52542575
14	5.02	4.29	13.58956969	7	1.90	4.87	11.6451708
15	4.10	3.33	10.77048264	9	2.05	4.81	11.674341
17	4.04	3.45	10.94250001	11	1.26	2.96	7.17857128
18	5.73	5.76	17.24626762	12	5.43	14.70	34.827934
19	4.90	4.64	14.18420508	16	4.62	17.81	40.2428602
Riñón				20	2.07	5.18	12.4359943
1	1.57	2.46	6.483404876				
3	1.54	4.85	11.23234288				
5	1.31	3.59	8.49438968				
6	1.36	2.98	7.326935069				
8	1.30	3.22	7.742523145				
10	1.54	4.00	9.533725634				
13	1.28	2.11	5.504003646				
14	1.26	2.24	5.733919895				
15	1.18	2.80	6.775441232				
17	1.49	3.27	8.019981356				
18	1.51	4.38	10.28369504				
19	1.85	4.92	11.69284892				

ng NADPH	m= pendiente Vel. Reacción
30	0.0005167
90	0.002
300	0.007

Relación entre la velocidad de la reacción y la cantidad de NADPH



## Anexo 2

8.

Muestra	m	Actividad ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	mg Prot /mL homog	Act ( $\mu\text{mol}$ /min/g Prot)	Prom Act ( $\mu\text{mol}$ /min/g Prot)	SD
<b>Higado</b>						
<b>DNP</b>						
	24	0.00307	0.40422	56.47	0.007158206	
	25	0.00363	0.47789	30.71	0.015561269	
	26	0.00394	0.51827	40.75	0.01271827	
	27	0.00329	0.43316	31.85	0.013600088	
	30	0.00331	0.43579	40.36	0.010797662	0.011967099 0.003187554
<b>Harland</b>						
	22	0.00442	0.58141	61.37	0.00947383	
	31	0.00299	0.39291	54.83	0.007165994	
	35	0.00342	0.44987	45.88	0.009805328	0.008815051 0.001437712
<b>DHP</b>						
	1	0.00363	0.47710	77.86	0.006127631	
	3	0.00429	0.56391	59.14	0.009535239	
	5	0.00387	0.50867	44.37	0.011464211	
	6	0.00520	0.68401	70.43	0.00971192	
	8	0.00396	0.52090	51.33	0.010148068	
	10	0.00354	0.46565	51.43	0.009054119	
	13	0.00471	0.61995	58.11	0.010668565	
	14	0.00374	0.49196	51.99	0.009462616	
	15	0.00418	0.54984	63.19	0.008701365	
	17	0.00446	0.58667	59.61	0.009841815	
	18	0.00379	0.49893	43.33	0.011514726	
	19	0.00385	0.50683	51.99	0.009748519	0.009664899 0.001408162
<b>Rec DNP</b>						
	21	0.00294	0.38673	61.99	0.006238571	
	23	0.00290	0.38147	60.35	0.006320918	
	28	0.00160	0.21007	21.60	0.00972547	
	29	0.00331	0.43579	49.39	0.008823519	0.00777712 0.001768114
<b>Rec Har</b>						
	33	0.00258	0.33937	54.02	0.006282385	
	34	0.00227	0.29860	35.83	0.003333712	0.007308049 0.001450507
<b>Rec DHP</b>						
	2	0.00377	0.49630	61.99	0.008006166	
	4	0.00432	0.56825	55.86	0.010172841	
	7	0.00351	0.46131	53.13	0.008682712	
	9	0.00138	0.18153	56.30	0.003224261	
	11	0.00354	0.46565	54.56	0.008534702	
	12	0.00238	0.31307	31.88	0.009820149	
	16	0.00189	0.24901	26.43	0.009421345	
	20	0.00389	0.51209	72.68	0.007045778	0.008113494 0.002217515

Anexo 2

9.

Muestra	Fluorom GSH	ug GSH	ug GSH/ uLhomog	ug/uL GSH residual	Fluorom GSSG	ng GSSG
H1	730	7.8387	0.2352		6	64.81581506
H1+	1030	11.0989	0.3488	0.1137	8	86.42108675
R2	270	2.8396	0.0852		13	140.434266
R2+	330	3.4916	0.1063	0.0211	15	167.4408556

ug GSH/ uL h	ug GSSG*2	Gtotal
0.2352	0.019444745	0.2546
0.3488	0.027160913	0.3760
0.0852	0.04213028	0.1273
0.1063	0.05097378	0.1573

ug GSSG/ uL homog	ug/uL GSSG residual	ug/uL GS total residual	ug/uL GS añadido	% de recu- peración
0.00972				
0.01358	0.0039	0.121379168	0.15	80.91944564
0.02107				
0.02549	0.0044	0.029951701	0.05	59.90340134

	% de recu- peración
H	80.91944564
R	59.90340134



### **Anexo 3: Análisis estadístico.**

1. Algoritmo utilizado para obtener la  $t_c$  de la prueba de t-student.
2. Resultados de las pruebas de t-student para:
  - Valores de la razón GSH/GSSG
  - Valores de actividad de la GR

### 1. Algoritmo utilizado para obtener la $t_c$ de la prueba de t-student.

La prueba de t-student se utiliza para conocer si dos medias (de dos muestras diferentes) pertenecen a la misma población. (Biostatistical Analysis, Zar, J., 2<sup>nd</sup> Ed., Prentice Hall, 1984, USA)

Para encontrar la  $t_c$  es necesario contar con los siguientes elementos de las muestras a comparar:  $\bar{x}$  (media), n (elementos en la muestra), v (grados de libertad = n-1), DE (desviación estándar) y SS (suma de cuadrados =  $DE^2(n-1)$ ).

Con estos valores se calcula  $Sp^2 = (SS_1 + SS_2) / (v_1 + v_2)$

$$y \quad S_{\bar{x}-\bar{x}} = \sqrt{(Sp^2 / n_1) + (Sp^2 / n_2)}$$

$$\text{finalmente, } t_c = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / S_{\bar{x}-\bar{x}}$$

Para validar o rechazar la hipótesis planteada al hay que comparar la  $t_c$  obtenida, con la  $t_c$  que se encuentra en la tabla de la sección 2 tomando en cuenta los grados de libertad ( $v_1 + v_2$ ).

Anexo 3

2.

Hígado	GSH/GSSG prom	SD	Riñón	GSH/GSSG prom	SD	GR Prom Act (umol/min/g Prot)	SD
<b>DNP</b>	0.614968952	0.09587	<b>DNP</b>	0.192856137	0.094416411	0.011967099	0.003187554
<b>RecDNP</b>	0.843950947	0.00346	<b>RecDNP</b>	0.269274658	0.03778595	0.00777712	0.001768114
<b>Har</b>	0.897777419	0.19791	<b>Har</b>	0.273239464	0.081081779	0.008815051	0.001437712
<b>RecHar</b>	0.943347856	0.02354	<b>RecHar</b>	0.281956649	0.030068343	0.007308049	0.001450507
<b>DHP</b>	1.230760977	0.33341	<b>DHP</b>	0.444376571	0.104389569	0.009664899	0.001408162
<b>RecDHP</b>	1.078772801	0.41253	<b>RecDHP</b>	0.373827293	0.058271844	0.008113494	0.002217515

Pruebas t

No.	Pob 1	Pob 2	Estudio	Sp2	Sxx	v	tc	Conclusion
1	DNP, hígado	DHP, hígado	GSH/GSSG		0.08378	0.1541	15	3.997 son dif. con 99.8% confianza
2	DNP, hígado	Har, Hígado	GSH/GSSG		0.02214	0.1087	6	2.42 no son dif para 95%
3	Har, Hígado	DHP, hígado	GSH/GSSG		0.1012	0.20534	13	1.718
4	RecDHP, Hígado	DHP, hígado	GSH/GSSG		0.13394	0.167	18	0.9053 casi no cambió
5	DNP, hígado	RecDNP, hig	GSH/GSSG		0.0052766	0.048728	7	4.719 99.5 son diferentes
6	RecDHP, Hígado	RecDNP, hig	GSH/GSSG		0.1191	0.2113	10	1.1111 75% son iguales
7	DNP	DHP	GR	4.1635 E-6		0.001086	15	2.1195 95% que son dif
8	Rec DNP	Rec DHP	GR	4.38 E-6		0.0012816	10	0.26217 son iguales, se recup igual
9	DHP	RecDHP	GR	3.1241 E-6		0.0008068	18	1.9237 con 93% conf son dif
	DNP	RecDNP	GR	7.1455 E-6		0.001793	7	2.3366 con 95% son dif