

1988-1

EXP. No.- 80302568

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL ACIDO
LACTICO DURANTE LA INTOXICACION AGUDA
CON TETRACLORURO DE CARBONO (CCl₄)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MONICA AYUB AYALA

GUADALAJARA, JAL., 1989

DEDICATORIAS

A MI PADRE:

Con todo cariño por el amor, la dedicación y el apoyo que siempre me ha brindado.

A MI TIA:

Por recibir de ella el amor y la comprensión de madre.

A MI HERMANA:

Por el entusiasmo y el apoyo que me ha brindado.

A JAVIER FLORES:

Por ser mi amigo y creer en mí.

A MI TIA JOSEFINA:

Por el cariño que siempre me ha demostrado.

A ERIKA Y LUIS FERNANDO:

Sobrinos que adoro.

A LA MEMORIA DE:

MI MADRE:

Por darme la vida.

A ESTELA GASCA:

Por la enseñanza que de ella recibí, cuyo ejemplo como persona y profesionalista siempre admiraré.

| | |
|---|----|
| Lista de Figuras | 1 |
| Lista de Tablas | 2 |
| 1.- Introducción | |
| 1.1.- Estructura y función del Hígado | 4 |
| 1.2.- Bioquímica hepática | 5 |
| 1.3.- Homeostasis del ácido láctico | 7 |
| 1.4.- Patología hepática | 8 |
| 1.4.1.- Lesiones reversibles | 8 |
| 1.4.2.- Lesiones irreversibles | 8 |
| 1.5.- Toxicidad del tetracloruro de carbono (CCL ₄) | 10 |
| 2.- Antecedentes | 11 |
| 3.- Planteamiento del problema | 16 |
| 4.- Hipótesis | 17 |
| 5.- Objetivos | 18 |
| 5.1.- General | 18 |
| 5.2.- Particulares | 18 |
| 6.- Diagrama experimental | 19 |
| 7.- Material y métodos | 20 |
| 7.1.- Origen de los materiales | 20 |
| 7.1.1.- Material | 20 |
| 7.1.2.- Equipo | 20 |
| 7.2.- Preparación de reactivos | 21 |
| 7.2.1.- Mezcla de reacción para determinación de lactato | 21 |
| 7.2.2.- Reactivos para determinación de (ALT) | 21 |
| 7.2.3.- Soluciones para estudio morfológico | 22 |

| | | |
|---------|---|----|
| 7.3.- | Material biológico | 23 |
| 7.4.- | Condiciones de alimentación | 23 |
| 7.5.- | Administración y dosis de CCL | 23 |
| 7.6.- | Fundamento de la determinación de ácido láctico | 25 |
| 7.7.- | Método de obtención de sangre | 25 |
| 7.8.- | Fundamento para la determinación de ALT | 28 |
| 7.9.- | Método de obtención de sangre para determinación de alanina aminotransferasa | 28 |
| 7.10.- | Cálculos | 29 |
| 7.11.- | Preparación de la muestra para estudio morfológico .. | 30 |
| 7.12.- | Análisis estadístico | 30 |
| 8.- | Resultados | 32 |
| 8.1.- | Resultados bioquímicos | 32 |
| 8.1.1.- | Efecto del CCL sobre el ácido láctico en sangre | 32 |
| 8.1.2.- | Efecto del tiopental sódico en ratas tratadas con CCL durante tres días | 33 |
| 8.1.3.- | Efecto de una dosis de CCL en ratas con anestésico sobre el ácido láctico en sangre | 34 |
| 8.1.4.- | Efecto de la galactosa en ratas con tres dosis de CCL sobre el ácido láctico en sangre | 35 |
| 8.2.- | Comprobación enzimática e histopatológica del daño hepático | 36 |
| 8.2.1.- | Comprobación enzimática | 36 |
| 8.2.2.- | Comprobación histopatológica | 36 |
| 9.- | Discusión | 53 |
| 10.- | Conclusiones | 56 |
| 11.- | Resumen | 57 |
| 12.- | Agradecimientos | 60 |
| 13.- | Bibliografía | 61 |

Lista de figuras

Página

Figura 1. Mecanismos que inician la reacción hepatotóxica al tetracloruro de carbono 15

Figura 2. Curva de calibración del lactato 27

Figura 3. Efecto de CCL tres dosis sin anestésico 38

Figura 4. Efecto de tiopental sódico CCL tres dosis 39

Figura 5. Efecto de tiopental sódico CCL una dosis 40

Figura 6. Efecto de galactosa CCL tres dosis 41

Figura 7. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata testigo con administración de tres dosis de aceite mineral vía intraperitoneal 42

Figura 8. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata testigo con administración de tres dosis de aceite mineral vía intraperitoneal 43

Figura 9. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata testigo con administración de tres dosis de aceite mineral vía intraperitoneal 44

Figura 10. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata con tres dosis de CCL vía intraperitoneal 45

Figura 11. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata con tres dosis de CCL vía intraperitoneal 46

Figura 12. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata con tres dosis de CCL vía intraperitoneal 47

Figura 13. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata con tres dosis de CCL vía intraperitoneal 48

Figura 14. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata con tres dosis de CCL vía intraperitoneal 49

Figura 15. Fotomicrografía de un corte de hígado de rata con tres dosis de CCL vía intraperitoneal 50

Lista de tablas

Página

| | |
|---|---------|
| Tabla 1. Determinación de alanina amonittransferasa (ALT) en ratas tratadas con una dosis de CCL sin tiopental sódico | 4 51 |
| Tabla 2. detrminación de alanina aminotransferasa (ALT) en ratas tratadas con tres dosis de CCL y anestésico (tiopental sódico) | 4 52 |

"ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL ACIDO LACTICO
DURANTE LA INTOXICACION AGUDA CON CCL4"

1.- INTRODUCCION

1.1 Estructura y función del Hígado.

El hígado es la glándula más grande del organismo, en el humano, ocupa el espacio subfrénico derecho, parte del epigastrio e hipocondrio izquierdo. Tiene consistencia firme, pero es friable y se deja deprimir por los órganos vecinos. Su peso en el cadáver es de 1500 gr. En el sujeto vivo contiene además de 800 a 900 gr de sangre. Recibe sangre a partir de la vena porta la cual deriva de la mesentérica superior, de tal forma que los nutrientes absorbidos por el intestino delgado ingresan primeramente al hígado antes de pasar a la circulación general (Crouch, 1983).

La mayor parte del hígado está compuesto por masas de células epiteliales (hepatocitos) dispuestas por placas o láminas que parecen irradiar desde una región, denominada espacio porta, (el cual está formado por la arteria hepática, la vena porta, los conductos biliares y con frecuencia un vaso linfático y tejido conectivo) hasta la vena central. las zonas portales están dispuestas en forma tal que limitan los lobulillos del tejido hepático y se denominan, espacios interlobulillares, espacios porta o espacios de Kiernan (Rouviere, 1987).

Los cordones que forman las células epiteliales están separados por espacios denominados sinusoides, los cuales presentan un revestimiento discontinuo de endotelio. Es a través de los sinusoides que la sangre proveniente tanto de la arteria hepática como de la vena porta se mezcla y nutre a los hepatocitos para finalmente desembocar en la vena central. Tal disposición permite distinguir tres zonas las

que curiosamente, difieren en sus funciones bioquímicas, contenido enzimático y diferente susceptibilidad a fármacos hepatotóxicos (Giraudet y Cols., 1979).

La zona I es la de mayor celularidad, se localiza alrededor de la vena central y por lo tanto es la menos oxigenada y consecuentemente la más susceptible a hipoxia y fármacos que incrementan el metabolismo aeróbico. La zona I contiene gran cantidad de glucógeno, alcohol deshidrogenasa, ATP asa, fosfatasa alcalina y citocromo oxidasa. La zona III se encuentra alrededor de los espacios porta y por lo tanto es la más oxigenada, contiene numerosas enzimas como: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, beta hidroxibutirato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, diaforasas, esterases, etc. La zona II se encuentra localizada entre el espacio porta y la vena central, es rica en alfa glicerofosfato, isocitrato y malato, (Giraudet y Cols. 1979).

1.2 BIOQUIMICA HEPATICA.

En el hígado ocurren la mayor parte de los procesos químicos relacionados con el metabolismo intermediario, algunos de los cuales solamente se realizan en él. Para una mejor comprensión, estos procesos se clasifican en 4 grupos:

- 1.- Síntesis, almacenamiento y secreción de compuestos esencialmente energéticos.
- 2.- Síntesis, almacenamiento y secreción de compuestos no energéticos.
- 3.- Captación, degradación y detoxificación de compuestos circulantes.
- 4.- Síntesis y excreción de la bilis.

El primer grupo está relacionado con el metabolismo de carbohidratos y lípidos. El hígado participa en el mantenimiento de la homeostasis de la glucemia mediante dos vías metabólicas reguladas hormonalmente; la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

En condiciones fisiológicas normales, el hígado de un humano envía diariamente a la circulación 225 grs. de glucosa de los cuales 170 gr. son proporcionados por la degradación de glucógeno y 55 gr. por la gluconeogénesis (Giraudet y Cols. 1979).

Después de la alimentación, el hígado almacena calorías en forma de glucógeno (polímero de glucosa) a fin de tener reservas que le permitan mantener la glucemia durante las comidas. Por otra parte el hígado no consume glucosa para la obtención de la energía necesaria para realizar sus funciones, sino que ésta es proporcionada por la degradación de los ácidos grasos. El hígado se encarga también de captar triglicéridos en forma de quilomicrones y los devuelve a la circulación general en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (vldl). El hígado sintetiza cuerpos cetónicos durante el ayuno prolongado a fin de que sean utilizados por otros tejidos como el corazón, los músculos, el cerebro y los riñones como combustible.

El segundo grupo se encuentra relacionado con los aminoácidos, colesterol y vitaminas. Después de captar aminoácidos, el hígado puede enviarlos nuevamente a la circulación para que estos sean utilizados para síntesis de proteínas tisulares. También el hígado puede utilizar aminoácidos con el mismo fin, por ejemplo; la albúmina, proteína producida únicamente por el hígado, se sintetiza a razón de 14 gr/día. Por otra parte los aminoácidos pueden ser utilizados para formar glucosa. En cuanto al metabolismo del colesterol, el hígado es responsable de la síntesis del 80% del total, además de participar en

el reciclaje del mismo mediante la circulación enterohepática. En lo que a vitaminas corresponde, el hígado es el sitio donde se almacenan las vitaminas A, K y B9 (ácido fólico). Además participa en la conversión de la vitamina B12 a la coenzima correspondiente.

El tercer grupo se encuentra relacionado con las funciones de detoxificación de sustancias, tanto endógenas como exógenas. Entre las primeras se encuentra la eliminación de amoníaco, producto final del metabolismo de proteínas, y la eliminación de bilirrubina.

Finalmente el cuarto grupo se encuentra relacionado con la síntesis y excreción de la bilis cuyos componentes se encuentran en tal proporción que facilitan la emulsificación de grasas, y de esta forma participar en la absorción de las mismas.

1.3 HOMEOSTASIS DEL ACIDO LACTICO.

El ácido láctico es el producto final de la glucólisis en condiciones anaerobias. Se produce en prácticamente todas las células de nuestro organismo y especialmente en eritrocitos y en los músculos. El ácido láctico puede ser captado por el hígado para su utilización como precursor de glucosa, o bien por los músculos para su oxidación completa hasta bióxido de carbono y agua. La concentración normal de lactato en el humano es de 9 a 16mg/100ml de sangre y se mantiene constante gracias a un balance entre la producción y la utilización de lactato (Cohen y Simpson 1975).

En ciertas condiciones fisiológicas el ácido láctico se incrementa considerablemente, es así que durante el ejercicio intenso se alcanzan valores superiores hasta de 100mg/100ml de sangre, sin embargo estos valores retornan rápidamente a la normalidad al suspender el ejercicio.

1.4 PATOLOGIA HEPATICA

Las células hepáticas al igual que todas las células del organismo, pueden lesionarse por diversos factores, como cambios en el microambiente, con agentes químicos o físicos que modifican su estructura y función.

El daño se manifiesta por cambios morfológicos que resultan de lesiones reversibles e irreversibles.

1.4.1 LESIONES REVERSIBLES

- a) Tumefacción celular.
- b) Degeneración hidròpica.
- c) Metamorfosis grasa.

1.4.2 LESIONES IRREVERSIBLES

- d) Picnosis.
 - e) Cariolisis
 - f) Cariorrexis.
 - g) Necrosis.
-
- a) Tumefacción celular: Aparece en cualquier forma de daño no mortal debido a la incapacidad de mantener la homeostasis de líquidos y electrolitos.
 - b) Degeneración hidròpica: Es una variante de la tumefacción celular ocasionada por un acùmulò mayor intracelular de agua.
 - c) Metamorfosis grasa: Afección que se observa principalmente en hígado y miocardio en donde se presenta un acùmulò de grasa.
 - d) Picnosis: El núcleo se contrae en una masa pequeña compacta y arrugada de cromatina íntimamente conglomerada (contracción y aumento de la basofilia de los núcleos.

- e) Cariolisis: Disolución progresiva de la cromatina por la acción hidrolítica de las dexoxirribonucleasas y catalasas de origen lisosómico (desvanecimiento de la basofilia nuclear).
- f) Cariorrexis: Rompimiento de un núcleo picnótico.
- g) Necrosis: Conjunto de cambios morfológicos provocados por la acción digestiva de enzimas sobre organelos intracelulares (L. Robbins 1975).

Fibrosis hepática: Consiste en el aumento total de colágena ocasionado por un incremento en la síntesis de la misma, una disminución en la degradación o ambos.

Cirrosis: Proceso patológico que afecta a todo el hígado caracterizado por un aumento en el contenido total de colágena y la presencia de nódulos de regeneración hepática.

Clasificación:

- I Cirrosis adquiridas.
- II Cirrosis de etiología desconocida.
- III Cirrosis secundarias a trastornos congénitos del metabolismo.

Las causas más comunes de las cirrosis adquiridas son las siguientes:

- Alcoholismo.
- Virus.
- Alcoholismo + virus.
- Otras.

Las lesiones hepáticas por alcohol pueden ser: Agudas y crónicas.

LESIONES AGUDAS

- a) Esteatosis.
- b) Hepatitis alcohólica.

LESIONES CRONICAS

c) Hepatitis crónica activa.

d) Hepatitis alcohólica crónica. (Simposium de tópicos actuales en cirrosis hepática, Octubre 1989).

1.5 Toxicidad del Tetracloruro de Carbono (CCL₄).

El tetracloruro de carbono es un solvente orgánico que al igual que otros hidrocarburos halogenados lesiona el hígado y actualmente se encuentra clasificado como hepatotoxina directa. La lesión hepática por el CCL₄ puede ser aguda como necrosis hepática o crónica como fibrosis hepática, cáncer de hígado, lesión renal y cierto grado de cardiotoxicidad. (L. Robbins 1975).

2.- ANTECEDENTES.

El alcoholismo es un problema grave de salud pública y social que conduce finalmente a la cirrosis hepática irreversible.

El principal componente de la cirrosis hepática es la fibrosis que desde el punto de vista molecular se explica mediante un incremento en el contenido total de colágena a expensas de un aumento en la síntesis de la misma (Rojkind y Cols. 1979).

La colágena es una proteína que se localiza en la matriz extracelular y es la más abundante en los mamíferos, sin embargo un balance inadecuado entre la síntesis de colágena y su degradación puede producir fibrosis hepática, la cual es un hallazgo frecuente en la enfermedad hepática alcohólica donde el incremento del depósito de colágena se asocia con el progreso de la enfermedad. Cuando la lesión es aguda y el número de células destruidas es pequeño, el hígado se regenera completamente sin dejar cicatriz residual. Sin embargo con un daño persistente y crónico se forma una cicatriz generalizada a expensas de colágena que es en gran parte responsable de la enfermedad (Rojkind y Cols. 1979).

El aumento de colágena afecta la función hepática por dos mecanismos; primeramente el parénquima hepático se sustituye por material cicatrizal a expensas de colágena y ésta al comprimir los vasos sanguíneos que irrigan al hígado produce hipertensión portal que en conjunto se manifiestan como cirrosis hepática.

La etiología de la fibrosis hepática es muy variada, ya que se puede originar por desnutrición, obstrucción biliar, fármacos, errores innatos del metabolismo (glucogenosis hepática, tirosinemia, galactosemia) y por la ingesta crónica de etanol. Sin embargo el 70%

de la cirrosis hepática es causada por el etanol.

Los estudios para esclarecer la fisiopatología de la cirrosis hepática utilizan modelos experimentales, entre los que destacan la intoxicación durante 7 semanas con tetracloruro de carbono (Rojkind y Dunn, 1979), y la intoxicación durante 9 meses con etanol en monos (Rubin y Lieber, 1973). Por otra parte existen otros modelos en donde se incrementa la hepatotoxicidad del etanol en ratas sometidas a hipoxia (French y Cols, 1984), o bien en ratas intoxicadas con fenformina (Gasca-Centeno, 1988).

Una línea de investigación que cuenta con numerosos adeptos es la búsqueda de factores que inducen a los fibroblastos a sintetizar colágena, el resultado de estas investigaciones sugieren que el ácido láctico juega un papel importante en el aumento de la síntesis de colágena en el hígado cirrótico. La primera asociación entre el ácido láctico y la síntesis de colágena data de 1964, cuando Green y Goldberg observaron que un exceso de lactato (40 mM) estimuló selectivamente la síntesis de colágena en una línea de células obtenidas de fibroblastos de ratón (3 T3), sin embargo la dosis utilizada nunca se observa en el humano.

Mas tarde en 1977 Kowaloff y Cols. encontraron que el ácido láctico disminuyó la oxidación de prolina (principal aminoácido de colágena) a través de inhibir a la prolina oxidasa.

En 1981 Kershenovich y Cols. observaron que los alcohólicos crónicos tenían niveles elevados de ácido láctico en la sangre, además de que la prolina se encontró aumentada en la sangre en relación directa con la concentración de lactato. Por otra parte el ácido láctico resulta ser un producto secundario que se forma durante la oxidación del etanol, la cual ocurre principalmente en el hígado y no

se encuentra sujeta a ningún mecanismo de regulación que impida su oxidación, de tal forma que cualquier cantidad que se ingiera se metaboliza teniendo como consecuencia inmediata una alteración del sistema redox de la célula por un aumento de la relación NADH/NAD^+ que entre otras cosas produce hiperlactatemia (Ruben y Lieber, 1973).

Experimentos in vitro han mostrado que el ácido láctico a dosis fisiológicas (5mM) incrementaron la síntesis de colágena en una línea celular obtenida de miofibroblastos de monos intoxicados con etanol (Savolainen y Cols. 1984). En otro estudio se encontró que el ácido láctico incrementó la incorporación de prolina marcada con tritio en colágena de ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono (Carbon y Cols. 1987).

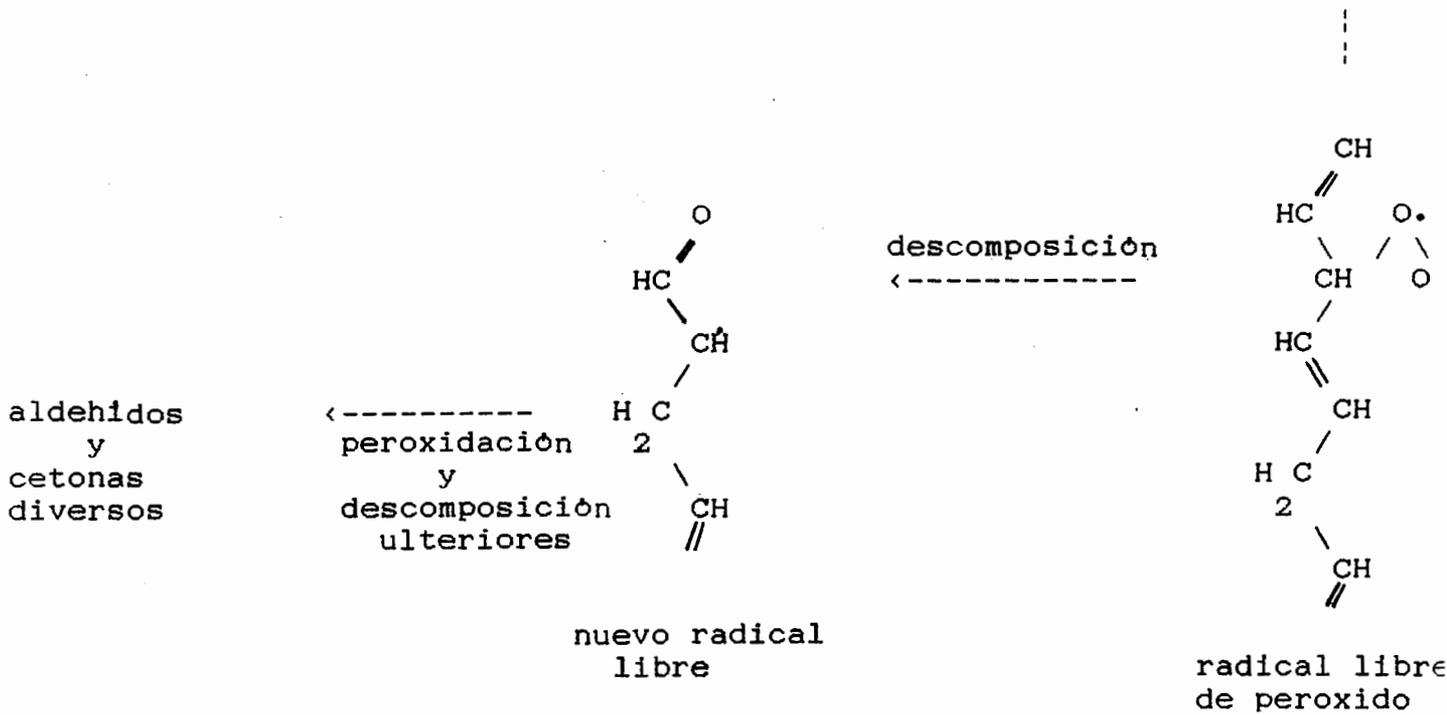
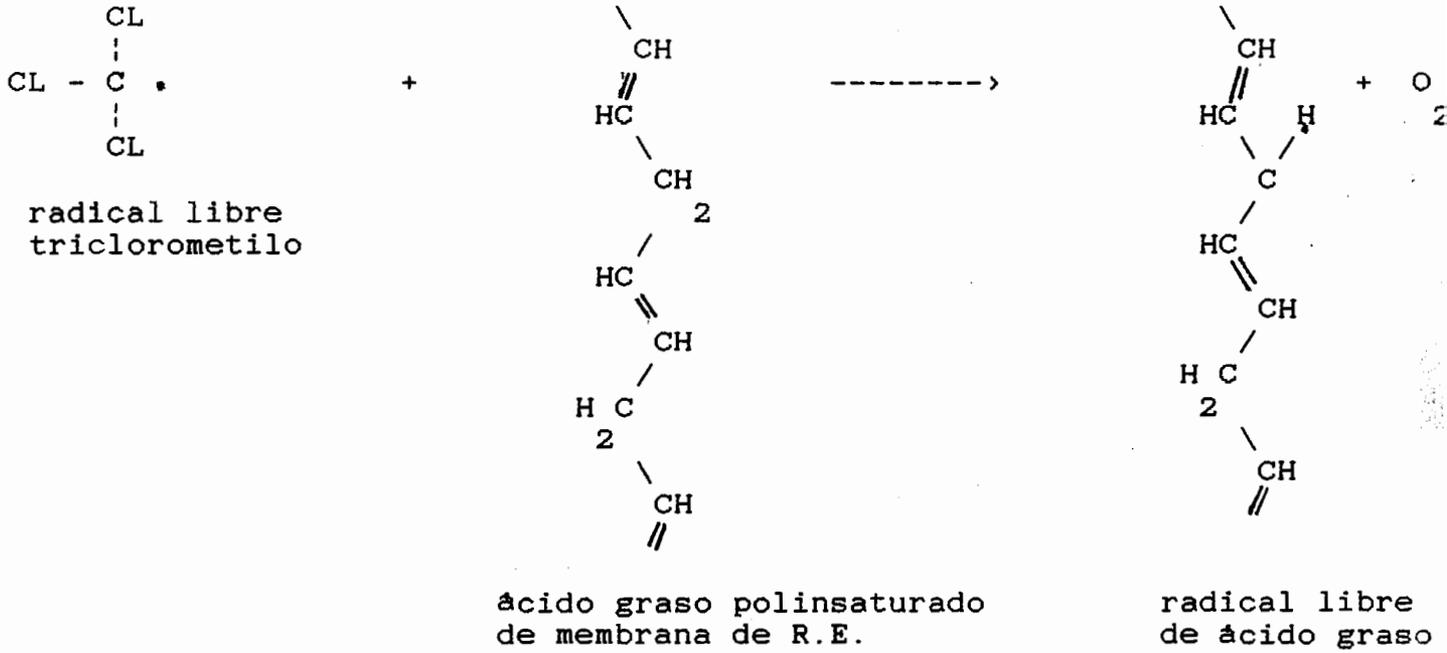
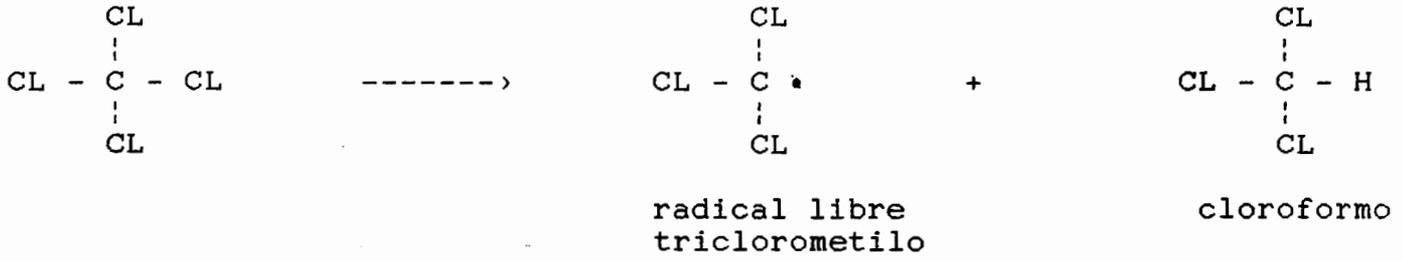
Los estudios anteriores sugieren fuertemente que el ácido láctico es por lo menos un factor que interviene en la génesis de la fibrosis hepática. El modelo más utilizado para el estudio de la cirrosis hepática es el de la intoxicación con CCL_4 sin embargo no existen estudios que relacionen la intoxicación aguda o crónica con tetracloruro de carbono con una alteración en la homeostasis de ácido láctico en las ratas tratadas con el tóxico.

Lo que actualmente se reconoce es que el tetracloruro de carbono es tóxico por sí solo y además por los productos del metabolismo del mismo, que forman radicales libres altamente reactivos, como el triclorometilo, que inicia una reacción en cadena atacando los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana del retículo endoplásmico y posiblemente de las mitocondrias del hepatocito (Fig.1), dicha disrupción de la estructura membranosa origina pérdida de proteínas de los organelos, además de afectarse la síntesis de proteínas, en

especial de lipoproteínas, que a la postre son las responsables de los cambios morfológicos iniciales en el hígado graso (Bowman y Rand, 1985).

En vista de lo anterior, el presente estudio está encaminado a definir la relación que probablemente existe entre la intoxicación aguda con tetracloruro de carbono y la aparición de fibrosis, a través de una alteración en la homeostasis del ácido láctico.

Fig. 1 Mecanismos que inician la reacción hepatotóxica al tetracloruro de carbono (Bowman y Rand 1985).



3. - PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En virtud de que el CCL produce fibrosis hepática y de que se ha involucrado al ácido láctico como factor fibrogénico en la fibrosis hepática alcohólica, en el presente trabajo queremos investigar si en la intoxicación con CCL se incrementan los niveles de lactato en la sangre a fin de aportar más datos sobre el posible papel del ácido láctico en la fibrosis hepática.

4. - HIPOTESIS

En la intoxicación aguda con CCL se altera la capacidad
4
hepática para mantener la homeostasis del ácido láctico.

5. - OBJETIVOS

5.1 General

Investigar los efectos de la intoxicación aguda con CCL₄ sobre la homeostasis del ácido láctico.

5.2 Particulares:

1. - Corroborar histológica y enzimáticamente la presencia de daño hepático con la administración aguda de CCL₄.
2. - Determinar los niveles de lactato en sangre de ratas intoxicadas con CCL₄.
3. - Evaluar la producción de lactato en las ratas intoxicadas con CCL₄ mediante una carga oral de galactosa comparadas con ratas testigo.
4. - Evaluar la utilización de lactato en ratas intoxicadas con CCL₄ mediante el uso de un anestésico comparada con ratas testigo.

6.- DIAGRAMA EXPERIMENTAL

Grupos Experimentales

E-1

0.5 ml de CCL4 y Aceite Mineral (1:1) vía intraperitoneal

E-2

0.5 ml de CCL4 y Aceite Mineral (1:1), 10 mg/kg de Tiopental Sódico vía intraperitoneal

E-3

0.5 ml de CCL4 y Aceite Mineral (1:1), 10mg/kg de Tiopental Sódico vía intraperitoneal
Galactosa 1 gr/kg de peso vía oral

Grupos testigos

T-1

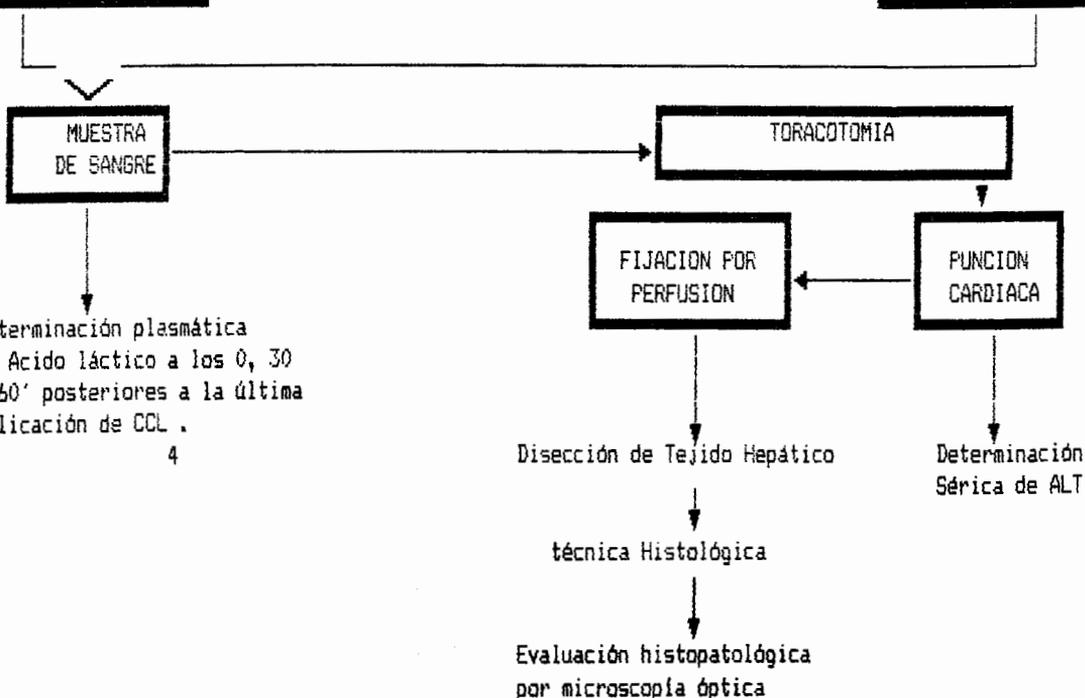
0.5 ml de Aceite Mineral vía intraperitoneal

T-2

0.5 ml de Aceite Mineral 10 mg/kg de Tiopental Sódico vía intraperitoneal

T-3

0.5 ml de Aceite Mineral 10 mg/kg de Tiopental Sódico vía intraperitoneal
Galactosa 1 gr/kg de peso vía oral



7. - MATERIAL Y METODOS

7.1 ORIGEN DE LOS MATERIALES

La calidad de los reactivos utilizados en este trabajo fueron de calidad reactivo analítico de las siguientes firmas: J.T. Baker, Sigma Co., American Scientific Products, Algodones Absorbentes América, Becton Dickinson de México, 20TH Century Chemical de México, Laboratorios Jaloma, Beckman Instruments.

7.1.1 MATERIAL

Capilares de vidrio heparinizados de 150 ul - American Scientific Products.

Etanol - J.T. Baker.

Gasa esterilizada - Laboratorios Jaloma.

Acido perclórico - J.T. Baker.

Algodón - Algodones Absorbentes América.

Galactosa - Sigma Co.

Lactato Deshidrogenasa (LDH) - Sigma Co.

Buffer Glicina/hidrazina - Sigma Co.

Nicotin Adenina Dinucleótido (NAD) - Sigma Co.

Jeringas - Becton Dickinson de México.

Tiopental Sódico - 20TH Century Chemical de México.

Reactivo ALT optimizado (alanina-aminotransferasa) - Beckman Instruments Inc.

7.1.2 EQUIPO

Espectrofotómetro Shimadzu UV - 240.

Centrífuga Clínica.

Centrífuga BHG óptima II.

Espectrofotómetro Coleman Jr. II.

Microtomo rotatorio 820 AO Scientific Instruments.

Microscopio Microstar IV con control Expostar AO Scientific Instruments.

7.2 PREPARACION DE REACTIVOS

7.2.1 MEZCLA DE REACCION PARA LA DETERMINACION DE LACTATO.

Reactivos:

| Contenido | Concentración |
|----------------------------------|-------------------|
| 1 Amortiguador glicina/hidrazina | |
| Glicina | 0.5 mol/l; pH 9.0 |
| Hidrazina | 0.4 mol/l |
| + | |
| 2 NAD | 27 mmol/l |
| 3 LDH | 650 u/ml |

7.2.2 REACTIVOS PARA DETERMINACION DE ALANINA-AMINOTRANSFERASA (ALT).

| <u>Ingredientes activos</u> | <u>Concentración en el Ensayo</u> |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| L-Alanina | 800 mmol/L |
| Alfa-cetoglutarato | 18 mmol/L |
| Lactato Deshidrogenasa (Animal) | 1200 UI/liter |
| NADH (Levadura) | 0.18 mmol/L |
| Buffer fosfato | 80 mmol/L (pH 7.4) |

7.2.4 SOLUCIONES PARA ESTUDIO MORFOLOGICO.

SOLUCION "A" (CLAVADORA).

Amortiguador de fosfatos 0.1 M.

Heparina 1,000 U.I / 1,000 ml de solución.

Procaína 1 gr. / 1,000 ml de solución.

p.H. 7.3 - 7.4

SOLUCION "B" (FIJADORA)

Amortiguador de fosfatos 0.1 M.

Formaldehido al 10%

p.H. 7.3 - 7.4

7.3 MATERIAL BIOLÓGICO

| | |
|------------------------------|---------------|
| Número de Grupos | <u>6</u> |
| Número de animales por Grupo | <u>7</u> |
| Cepa | Sprage Dawley |
| Sexo | Macho |
| Peso Promedio | 200-250 grs. |

7.4 CONDICIONES DE ALIMENTACION

Los animales se mantuvieron en condiciones óptimas de bioterio, ciclos de luz/obscuridad de 12 x 12 horas. Se alimentaron con una dieta comercial nutri-cubos (Purina) baja en grasa (2.5%), la ingesta de agua fué a libre demanda y se vigilaron condiciones ambientales.

7.5 ADMINISTRACION Y DOSIS DE CCL₄

Se formaron 3 grupos experimentales los cuales recibieron Tetracloruro de Carbono a una dosis de 0.5 ml en aceite mineral (1:1) seguido de la determinación de lactato en la sangre, a los 0, 30 y 60' posteriores a la última aplicación de CCL₄.

A fin de observar los cambios metabólicos producidos por el tóxico el primer grupo recibió únicamente el Tetracloruro de Carbono a dosis única.

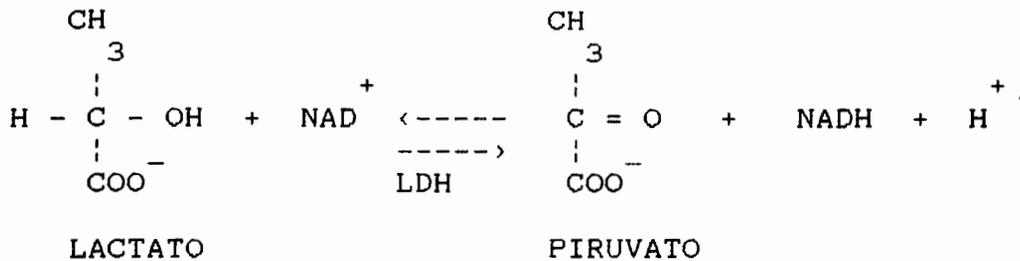
El segundo recibió la dosis de CCL₄ descrita, durante 3 días respectivamente y tiopental sódico 10 mg/kg de peso vía intraperitoneal.

Finalmente en el tercer grupo se investigaron los efectos del CCL4 con tres dosis sobre la producción de ácido láctico mediante una carga oral de galactosa a una dosis de 1 gr/kg de peso, mediante cánula orogástrica 30 minutos después de la aplicación del CCL4.

Se formaron grupos testigo para cada grupo experimental los cuales recibieron 0.5 ml de aceite mineral en lugar de CCL4.

7.6 FUNDAMENTO DE LA DETERMINACION DE ACIDO LACTICO

Para la determinación de ácido láctico se siguió el método de Gutmann y Wahlefeld (1974), el cual se basa en la producción cuantitativa de NADH, compuesto que absorbe a 340 nm mediante la siguiente reacción:



A fin de favorecer la reacción en el sentido en que está escrita, se utilizó un amortiguador con Glicina/Hidrazina 0.5 M a pH 9. En condiciones fisiológicas la reacción se lleva a cabo en sentido inverso, con la producción de Lactato y NAD⁺, sin embargo a pH 9 cambia la constante de equilibrio favoreciendo la producción de piruvato, que se combina con la Hidrazina, formando una hidrazona que impide la reacción inversa. En estas condiciones todo el lactato presente se transforma en piruvato y la concentración de NADH es directamente proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra.

7.7 METODO DE OBTENCION DE SANGRE

Con la finalidad de impedir la producción de ácido láctico se utilizó tiopental sódico (10 mg/kg de peso corporal). Una vez relajados los animales por efecto del anestésico se colocaron en bolsas de plástico, abiertas por la parte posterior; más tarde la cola del animal fue lavada y se procedió a cortar el extremo distal y finalmente se obtuvieron las muestras de sangre de 150 ul con un

capilar de vidrio heparinizado para determinación de lactato.

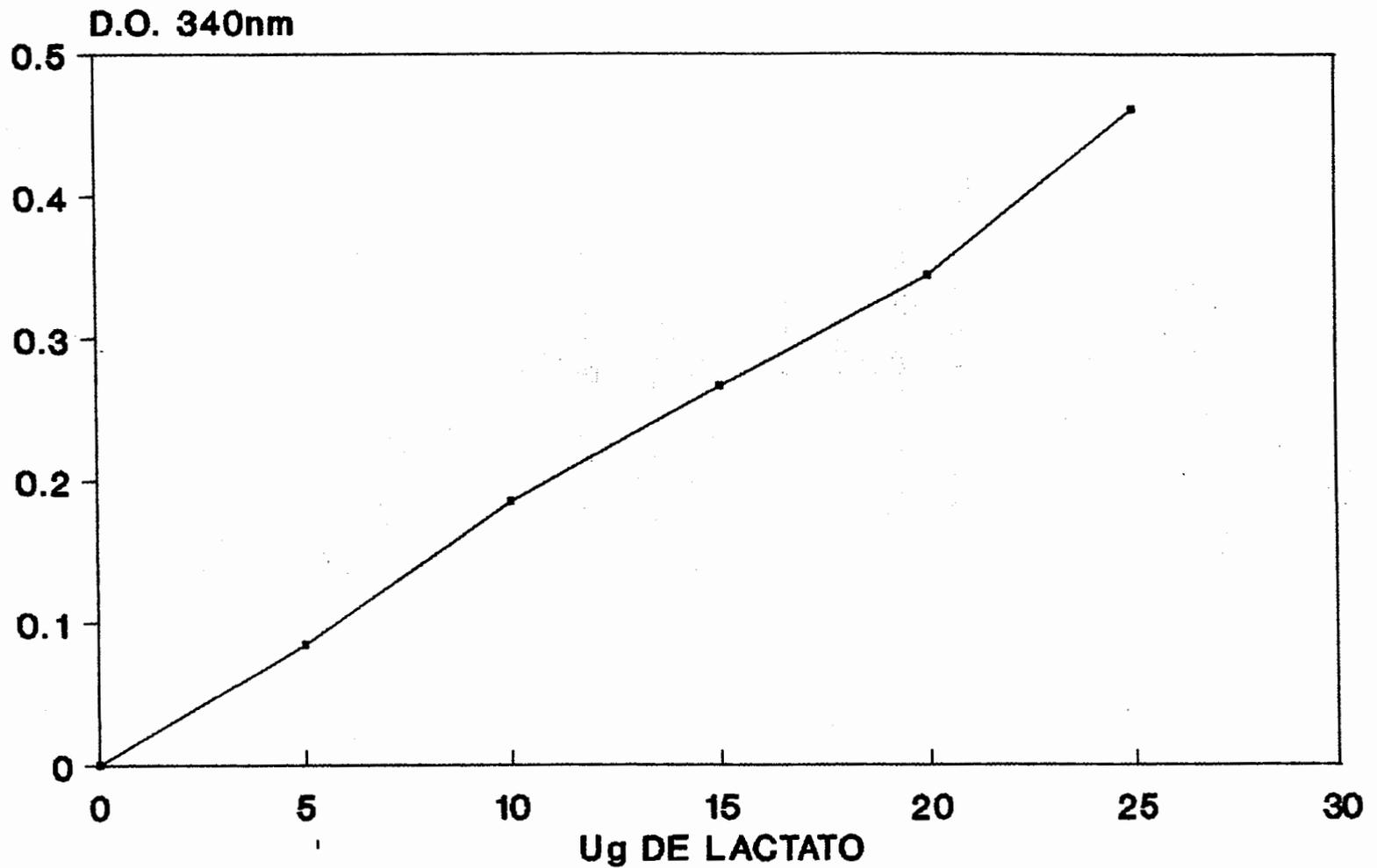
Las muestras de sangre se colocaron en tubos de ensayo que contenían 300 μ l de ácido perclórico 0.6 N previamente enfriado, se agitaron vigorosamente y se mantuvieron a 4 °C durante 24 horas. Al término de este tiempo se centrifugaron 10 min/3,000 rpm, posteriormente se tomaron 100 μ l del sobrenadante en tubos de ensayo y se preparó la mezcla de reacción que contenía: 0.1 ml de sobrenadante, 1 ml de amortiguador glicina 0.5 mol/l e hidrazina 0.4 M/l, NAD⁺ 27mM/l y deshidrogenasa láctica 650 U/ml en un volumen total de 1.2 ml, se incubaron 30 minutos a 37 °C y se midió la extinción (ΔE) de la muestra frente al blanco reactivo, a 340 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240.

Cálculos:

$\Delta E \times 49.3 =$ Concentración de L-lactato en mg/100 ml de sangre.

El valor 49.3 se obtuvo a partir de la pendiente de la curva de calibración de ácido láctico (Fig 2).

CURVA DE CALIBRACION DE LACTATO

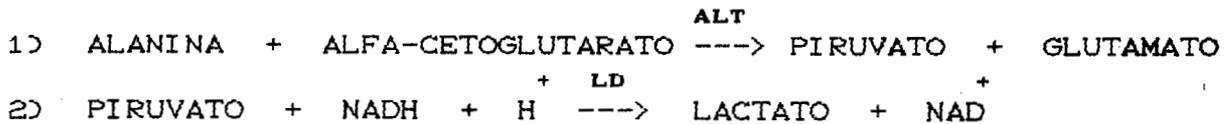


X = D.O./0.0181

FIG. 2

7.8 FUNDAMENTO PARA LA DETERMINACION DE ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT).

La actividad de ALT se determinó mediante la disminución de la extinción a 340 nm de la coenzima NADH la cual se consume en proporción directa mediante la actividad de esta enzima por la siguiente reacción:



ALT = ALANINA AMINOTRANSFERASA

LD = LACTATO DESHIDROGENASA

7.9 METODO DE OBTENCION DE SANGRE PARA DETERMINACION DE ALANINA AMINOTRANSFERASA.

Se practicó toracotomía previa anestesia con éter, posteriormente se visualizó el ventrículo izquierdo y se obtuvo una muestra de 4-5 ml de sangre por punción cardiaca con aguja del No. 20 para determinación de alanina aminotrasferasa sérica.

7.10 CALCULOS

Se calculó la actividad de ALT como sigue:

$$\text{ALT(UI/L)} = \frac{\wedge \text{ A/min}}{\text{Absorbancia}} \times \frac{V_1}{V_2} \times 1000$$

$V_1 = \text{VOLUMEN TOTAL} = 1.75 \text{ mL}$ $V_2 = \text{VOLUMEN DE LA MUESTRA} = 0.25 \text{ mL}$

$\text{ABSORBANCIA} = \text{Absorbancia milimolar del NADH a } 340 \text{ nm} = 6.22$

$$\text{ALT(UI/liter)} = \frac{\wedge \text{ A/min}}{6.22} \times \frac{1.75}{0.25} \times 1000 = \wedge \text{ A/min} \times 1125$$

7.11 PREPARACION DE LA MUESTRA PARA ESTUDIO MORFOLOGICO

Los animales se perfundieron por vía intracardiaca mediante un cateter al ventriculo izquierdo y un corte a nivel de auricula derecha, para infundir una solución lavadora amortiguada en fosfatos (Sol. "A") por espacio de 3-4 minutos y una solución fijadora amortiguada en fosfatos (Sol. "B") por espacios de 8-10 minutos, con una presión de 1.4 m. (Según el método de Feria-Karnowsky).

Posteriormente se sometió una muestra de hígado en la solución "B" por espacio de 2 horas.

Las muestras de tejido hepático se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de etanol (70%, 80%, 90% y absoluto) 2 baños en cada una por espacio de 20 minutos cada baño. Posteriormente se aclararon en xilol (etanol/xilol 1:1 por 15-20 minutos, y xilol absoluto por 15 minutos).

Finalmente las muestras se incluyeron en paraplast/plus, el cual fue mantenido en estado líquido en una estufa a 60-62 grados centígrados. De los bloques se practicaron cortes en un microtomo rotatorio 820 AO Scientific Instruments, la tinción de los cortes se hizo utilizando la técnica de hematoxilina-eosina (H.E.). Se tomaron microfotografías en un microscopio Microstar IV equipado con un control de disparo Expostar AO Scientific Instruments.

7.12 Análisis estadístico.

Para la evaluación de los resultados obtenidos se calcularon medidas descriptivas de \bar{X} , S y S^2 en todos los grupos.

Posteriormente se aplicó la prueba T de student para determinar si las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas.

En algunos casos, en los que el número de animales fué pequeño (4 a 6) y las varianzas de los grupos diferentes hubo la necesidad de aplicar una prueba estadística inferencial no paramétrica seleccionando en este caso la prueba de U de Mann-Whitney para asegurar que las diferencias encontradas en la prueba T de student fueron realmente significativas. La probabilidad fué apoyada por la T y la U.

El análisis de la información obtenida en el presente estudio indica que el uso de la prueba de U de Mann-Whitney es apropiado para comparar los resultados de los grupos de animales cuando el número de animales es pequeño y las varianzas de los grupos diferentes son diferentes. Este método estadístico es más adecuado que la prueba T de student en estos casos, ya que no requiere que las varianzas de los grupos sean iguales. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la prueba de U de Mann-Whitney es capaz de detectar diferencias significativas entre los grupos de animales cuando se aplican diferentes tratamientos. La probabilidad de que las diferencias encontradas sean realmente significativas es mayor cuando se utiliza la prueba de U de Mann-Whitney que cuando se utiliza la prueba T de student. Esto se debe a que la prueba de U de Mann-Whitney es una prueba no paramétrica que no requiere que los datos sigan una distribución normal, lo cual es una ventaja importante cuando se trabaja con muestras pequeñas y con datos que no cumplen con los supuestos de la prueba T de student.

8.- Resultados.

8.1 Resultados Bioquímicos

8.1.1 Efecto del CCL sobre el ácido láctico en sangre.

En la fig. 3⁴ se muestran los resultados obtenidos con la administración i.p. de 0.5 ml de CCL⁴ diluido en aceite mineral 1:1 durante tres días continuos.

En la gráfica se observan claramente diferencias estadísticamente significativas en las ratas que recibieron el tóxico comparadas con los grupos testigos que sólo recibieron el vehículo.

El valor basal se obtuvo después de la última aplicación de CCL⁴ y en ambos grupos se encontró por arriba de los valores considerados como normales (9-16 mg/dl).

Sin embargo el grupo experimental mostró un incremento cercano al 100% (30.6 mg/dl) sobre el valor superior normal mientras que el grupo testigo (21.9 mg/dl) tuvo un incremento menor al 40%. El análisis estadístico entre estos dos grupos reveló diferencias significativas $p=0.032$; treinta minutos después de la primera toma, se observaron diferencias las cuales fueron estadísticamente significativas ($p=0.011$). El valor del ácido láctico en sangre aunque menor que el basal, se observó por arriba de los límites normales (25.8 mg/dl). Por otra parte el grupo testigo presentó un valor promedio normal (15.4 mg/dl).

8.1.2 Efecto del tiopental sódico en ratas tratadas con CCL durante
tres días.

A fin de investigar si los valores de ácido láctico que se encontraron anormalmente elevados aún en el grupo testigo, eran debidos a la producción de lactato que se obtiene durante la actividad muscular por la tensión a la que se sometieron las ratas se decidió utilizar un anestésico para mantener a la rata relajada y suprimir el dolor ocasionado por el corte de la cola para la obtención de la muestra de sangre. El anestésico utilizado en el presente trabajo y el resto de los experimentos fue Tiopental Sódico, en virtud de los experimentos preliminares mostraron que las ratas sanas normalizaron el valor del láctico después de la administración del barbitúrico (datos no mostrados).

La fig. 4 muestra un importante incremento (100%) de ácido láctico en el grupo que recibió el CCL en la toma basal y persiste elevado a los 30 y 60' después de la última administración de CCL. Como era de esperarse el grupo testigo presentó valores normales de ácido láctico (16 mg/dl) en la toma basal, a los 30' y a los 60' posteriores a la administración de tiopental.

Las diferencias observadas con los testigo fueron estadísticamente significativas en la toma basal, ($p=0.02$) a los 30', ($p=0.007$) y a los 60', ($p=0.005$).

8.1.3 Efecto de una dosis de CCL en ratas con anestésico⁴
(Tiopental Sódico) sobre el ácido láctico en sangre.

Para corroborar que el ácido láctico no muestra cambios en la toma basal se utilizó una sola dosis de CCL (0.5 ml en aceite mineral 1:1). Los resultados en la fig. 5 muestran que no hubo diferencias significativas en la toma basal ($p=0.86$) en ambos grupos ya que los valores obtenidos fueron normales. Sin embargo se encontró un aumento significativo a los 30' ($p=0.016$) y a los 60' de la administración de CCL ($p=0.003$).

⁴ El grupo experimental alcanzó los valores de lactato observados en las ratas que recibieron 3 dosis de CCL a los 60'. Por otra parte las ratas que recibieron tiopental sódico⁴ no incrementaron el ácido láctico durante los 60' del experimento y el valor de lactato permaneció sin cambios: 16.2 y 16.0 mg/dl en la toma basal y a los 60' respectivamente.

8.1.4 Efecto de la galactosa en ratas con tres dosis de CCL₄ sobre el ácido láctico en sangre.

En virtud de que la galactosa se oxida principalmente en el hígado para formar glucosa, glucógeno y/o ácido láctico se decidió investigar el efecto del monosacárido en las ratas tratadas con CCL₄ durante tres días consecutivos.

Los resultados muestran en la fig. 6 el valor promedio del ácido láctico, el cual fué similar al encontrado en los experimentos donde se utilizó CCL₄ con el anestésico, por lo que parece no haber ningún efecto de la galactosa en el grupo que recibió CCL₄, sin embargo el análisis individual mostró incrementos de lactato en algunas ratas que fueron superiores a los 50 mg. Por otra parte un aspecto interesante fué que la galactosa disminuyó significativamente ($p=0.024$) la concentración de lactato a los 60' en el grupo testigo.

Las diferencias encontradas en ambos grupos fueron estadísticamente significativamente en la toma basal ($p=0.00006$) y los 60' ($p=0.0009$).

La incorporación de un grupo experimental con galactosa sin anestésico no pudo ser evaluada en virtud de que la rata sin tiopental presenta valores de lactato muy elevados como consecuencia de la actividad muscular.

8.2 Comprobación enzimática e histopatológica del daño hepático.

8.2.1 Comprobación enzimática.

A fin de comprobar que el CCL administrado en las condiciones descritas en material y métodos se determinó la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa (ALT).

La tabla 1 muestra los resultados de la actividad de alanina aminotransferasa 120' después de la aplicación de una dosis de CCL y la tabla 2 muestra la actividad de ALT en ratas tratadas durante tres días con CCL, los resultados sugieren daño hepático por el aumento de ALT, enzima que predomina en hígado.

8.2.2 Comprobación histopatológica.

Finalmente para comprobar que efectivamente se produce daño hepático visible a nivel morfológico se realizó una tinción de hematoxilina y eosina en hígados de ratas testigos y experimentales. Con tres días de intoxicación con el CCL en las figs. 7, 8 y 9 se observa citoarquitectura normal del hígado en donde se pueden apreciar claramente los cordones hepáticos bien definidos así como sinusoides claramente limitados y la triada portal característica del lobulillo.

En cambio las figuras 10-15 muestran los cambios morfológicos provocados por la intoxicación con tres dosis de CCL donde se puede apreciar en las figuras 10 y 11 el daño inicial caracterizado por tumefacción turbia con enmascaramiento del núcleo.

Las figuras 12 y 13 nos muestran tumefacción turbia con esteatosis de gota fina.

Finalmente en las figuras 14 y 15 se observan cambios más avanzados de daño hepático como esteatosis de gota gruesa y zonas de necrosis celular.

EFFECTO DE CCL4 TRES DOSIS SIN ANESTESICO

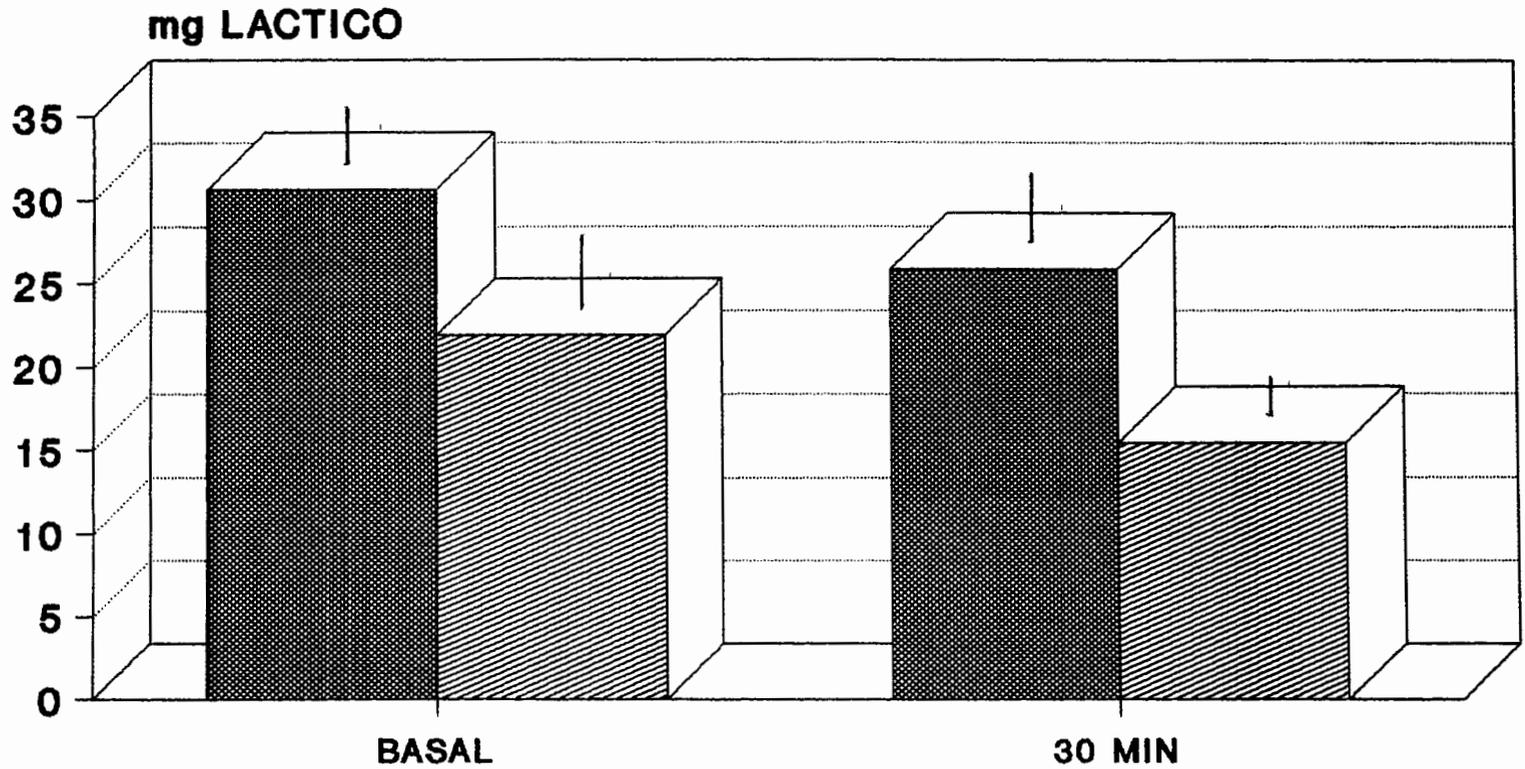


FIG.3

Series 1 CCL4

Series 2 A.MINERAL

P=0.032

P=0.011

EFECTO DE TIOPENTAL SODICO CCL4 TRES DOSIS

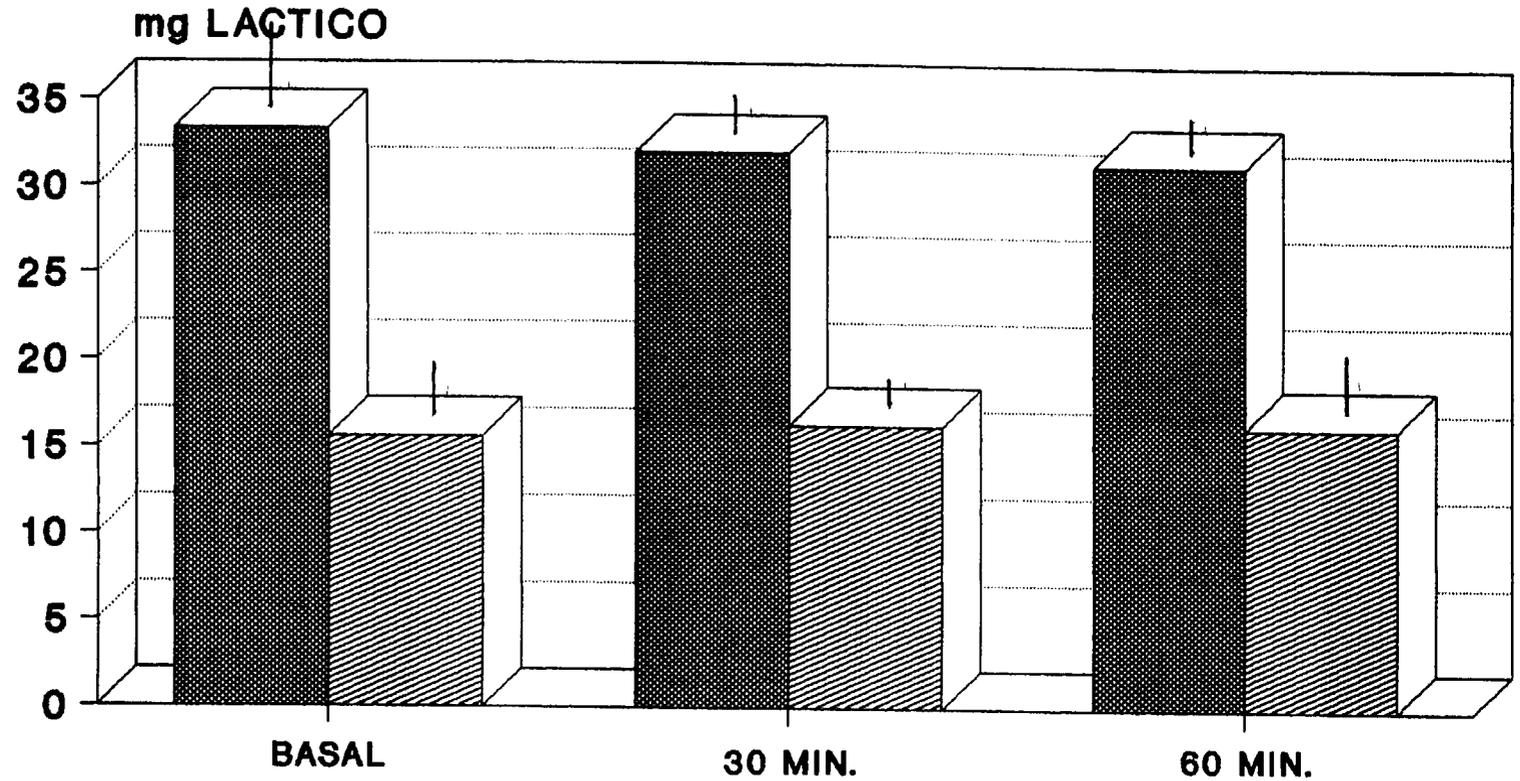


FIG.4

■ Series 1 CCL4 ▨ Series 2 A.MINERAL

P=0.021

P=0.007

P=0.005

EFECTO DE TIOPENTAL SODICO CCL4 UNA DOSIS

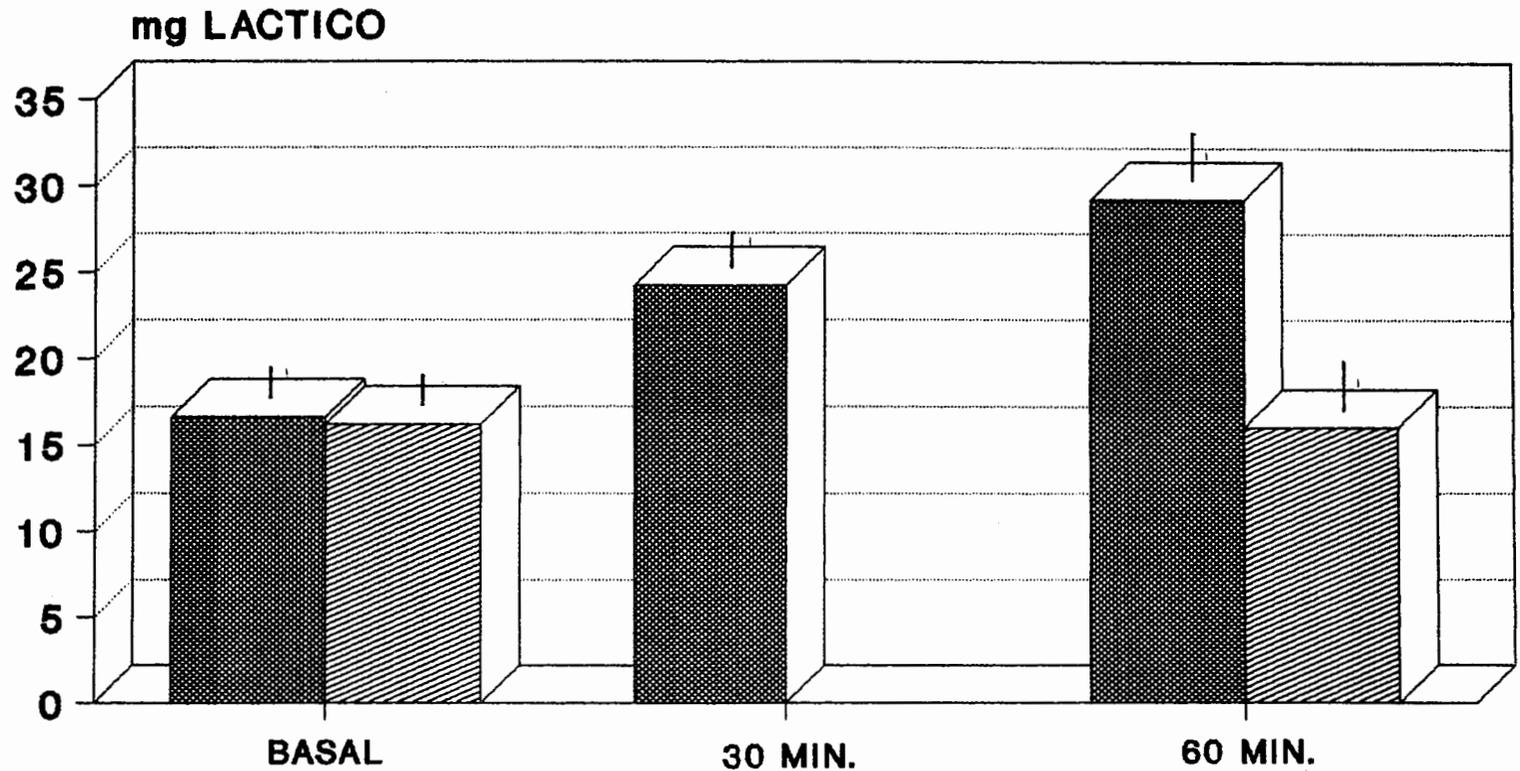


FIG.5

Series 1 CCL4

Series 2 A.MINERAL

P=0.86

P=0.007

EFECTO DE GALACTOSA CCL4 TRES DOSIS

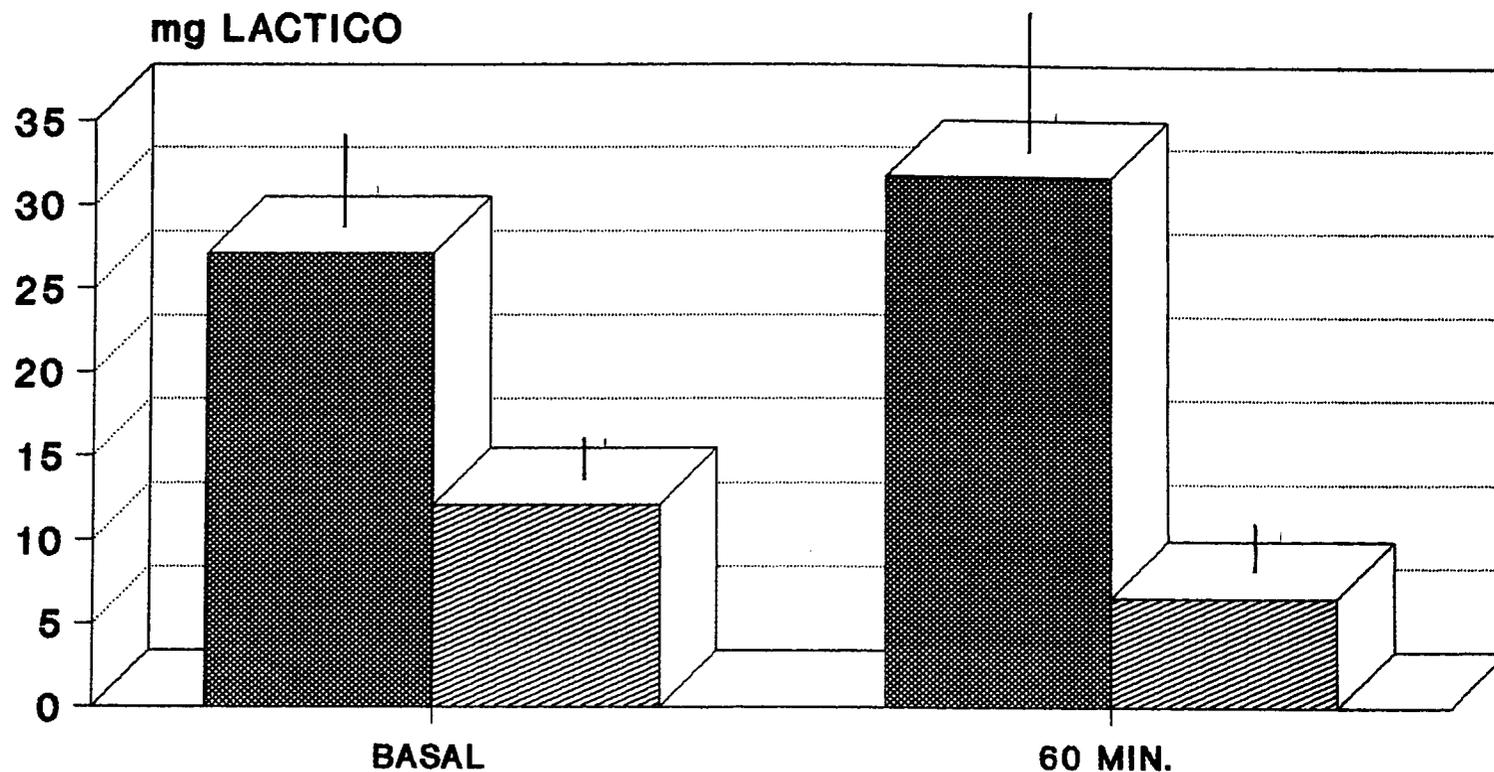


FIG.6

Series 1 CCL4

Series 2 A.MINERAL

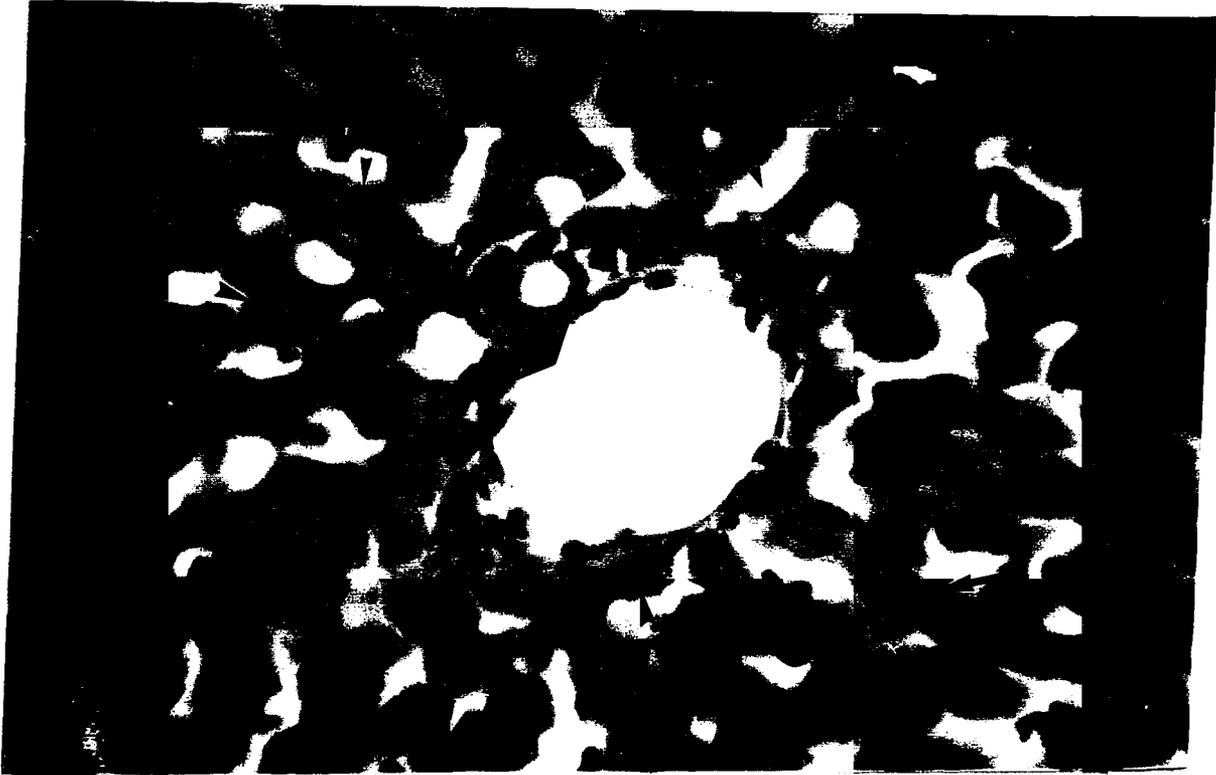
P=0.00006

P=0.0009

Fig. 7 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA TESTIGO CON ADMINISTRACION DE 3 DOSIS DE ACEITE MINERAL VIA INTRAPERITONEAL

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 190X)



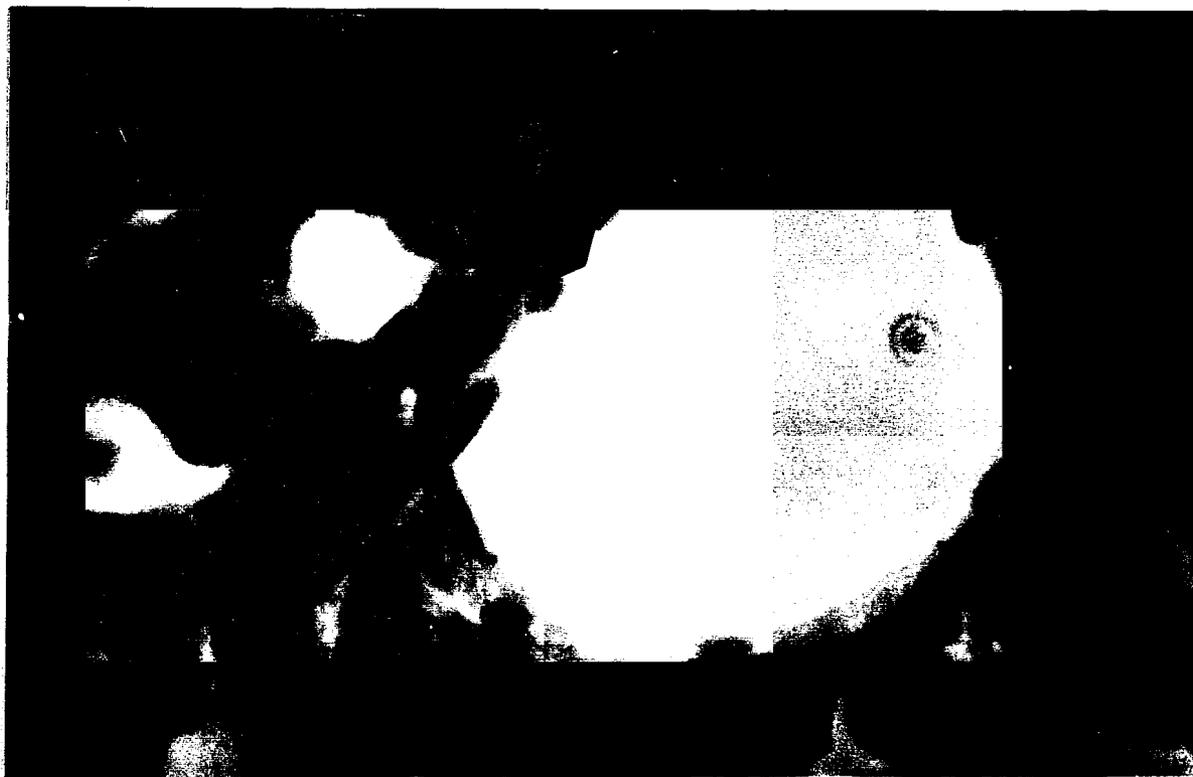
Esta fotomicrografía nos muestra un corte de hígado normal con las siguientes características:

- (↗) Cordones hepáticos bien definidos.
- (↗) Sinusoides claramente limitados.
- (▶) Presencia de células nucleadas y binucleadas.
- (▶) Células de Kupffer de tonalidad oscura.
- (◀) En el centro se observa la vena porta, en la parte lateral la Arteria hepática y el conducto biliar.

Fig. 8 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA TESTIGO CON ADMINISTRACION DE 3 DOSIS DE ACEITE MINERAL VIA INTRAPERITONEAL

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 380X)



Esta fotomicrografia nos muestra un corte de higado normal amplificado que nos muestra:

- (▶) La distribución de la vena Porta, Arteria hepática y conducto biliar así como la conformación hepática antes mencionada.

Fig. 9 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA TESTIGO CON ADMINISTRACION DE 3 DOSIS DE ACEITE MINERAL VIA INTRAPERITONEAL

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 750X)



Esta fotomicrografia nos muestra un corte de higado normal donde se observa:

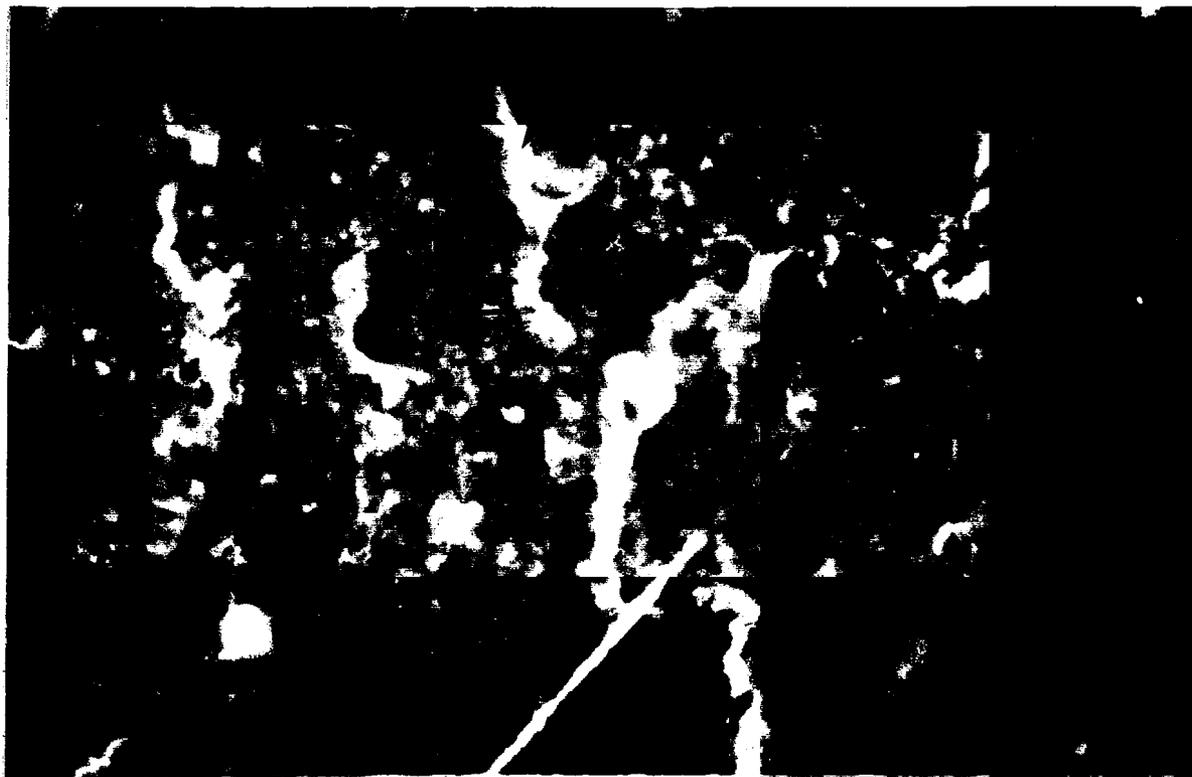
- (↗) La forma y distribución de las células hepáticas.
- (↗) Sinusoides claros y bien definidos.

FIGURA 10 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA CON 3 DOSIS DE CCL VIA INTRAPERITONEAL.

4

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 750X)



En esta fotomicrografia se aprecia tumefacción turbia con las siguientes características:

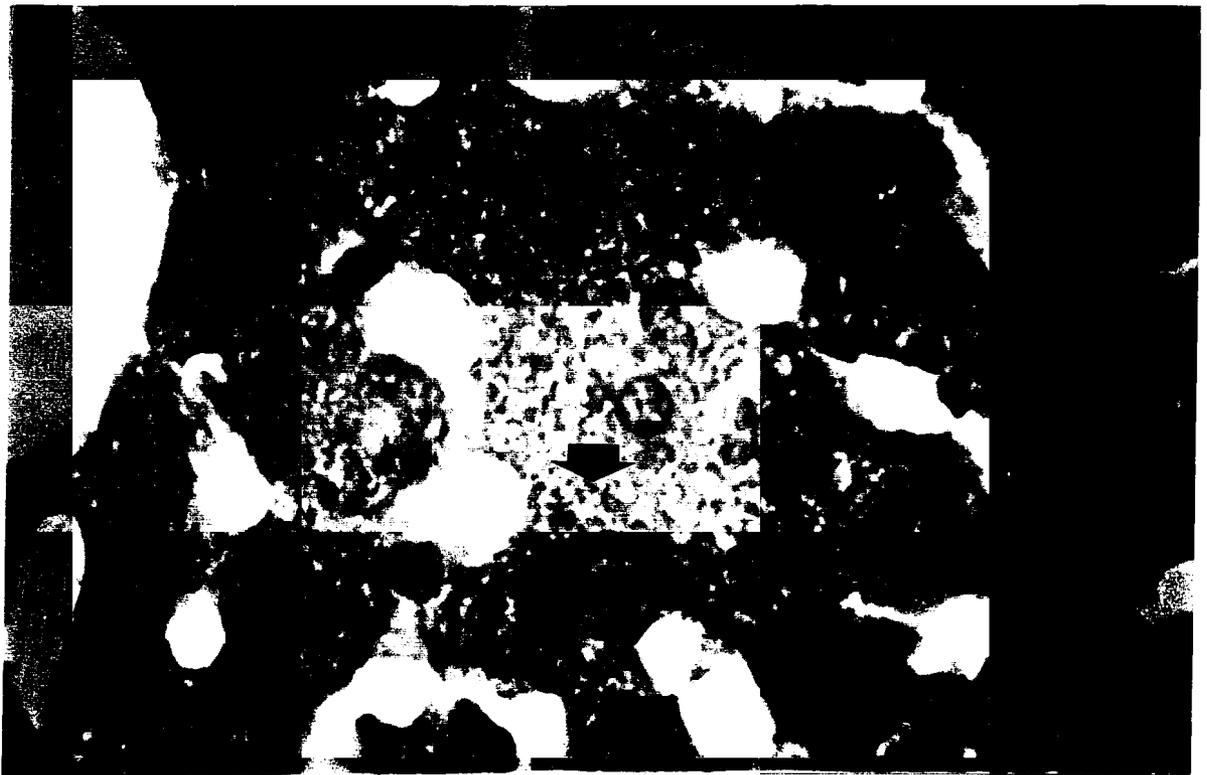
- (▶) Citoplasma denso y granuloso.
- (↘) Pérdida de los bordes de los hepatocitos.
- (↗) Reducción del espacio sinusoidal.
- (◻) Aparente aumento del volumen celular.
- (◼) Proceso inicial de la pérdida en la citoarquitectura hepática.

FIGURA 11 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA CON 3 DOSIS DE CCL VIA INTRAPERITONEAL.

4

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 750X)



Esta fotomicrografía muestra tumoración turbia con enmascaramiento del núcleo observándose:

- (▶) Citoplasma denso y granuloso.
- (▶) Células de Kupffer con apariencia normal.
- (↙) Disminución de la luz de los sinusoides.
- (▶) Pérdida de la citoarquitectura normal.

FIGURA 12 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA CON 3 DOSIS DE CCL VIA INTRAPERITONEAL.

4

Material incluido en paraplást y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 750x)



En esta fotomicrografía se manifiesta tumefacción turbia y esteatosis presentando:

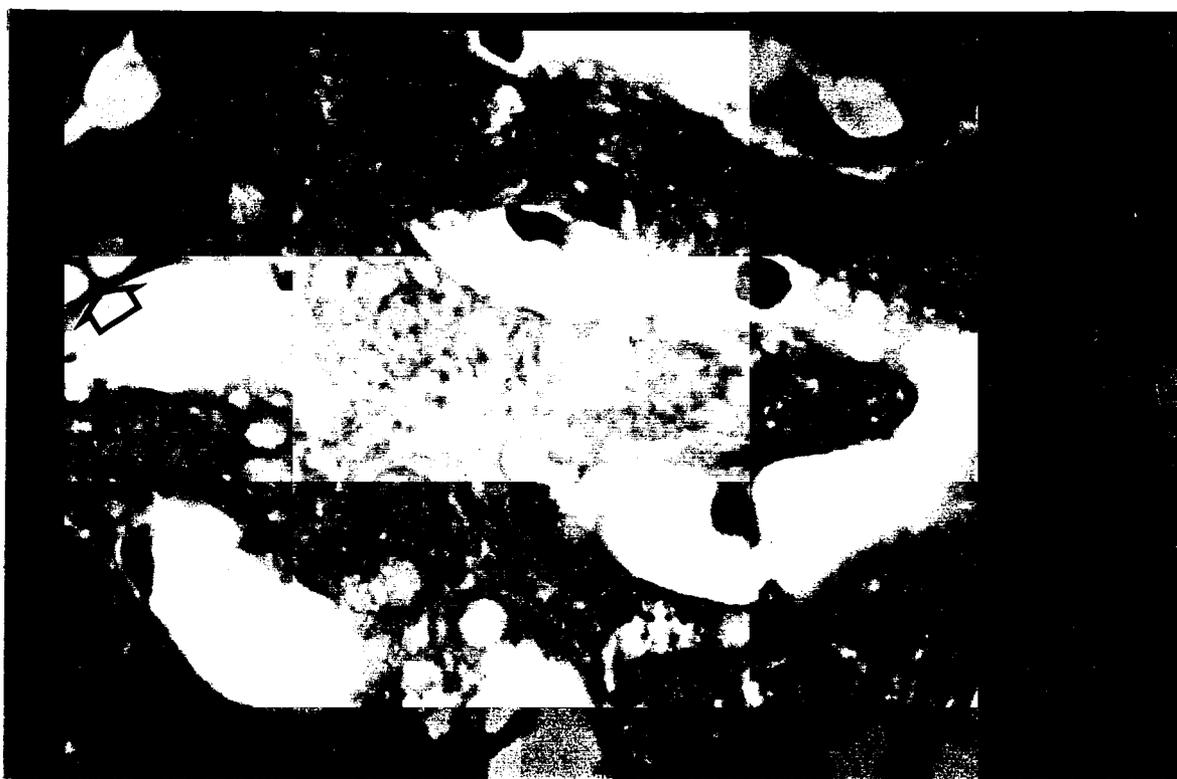
- (◻) Esteatosis de gota fina con confluencia de vacuolas.
- (◼) Pérdida completa de la citoarquitectura normal.
- (▶) Citoplasma denso con gránulos finos.
- (▶) Células de Kupffer aparentemente normales.

FIGURA 13 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA CON 3 DOSIS DE CCL VIA INTRAPERITONEAL.

4

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 750X)



Esta fotomicrografia presenta esteatosis de gota fina con:

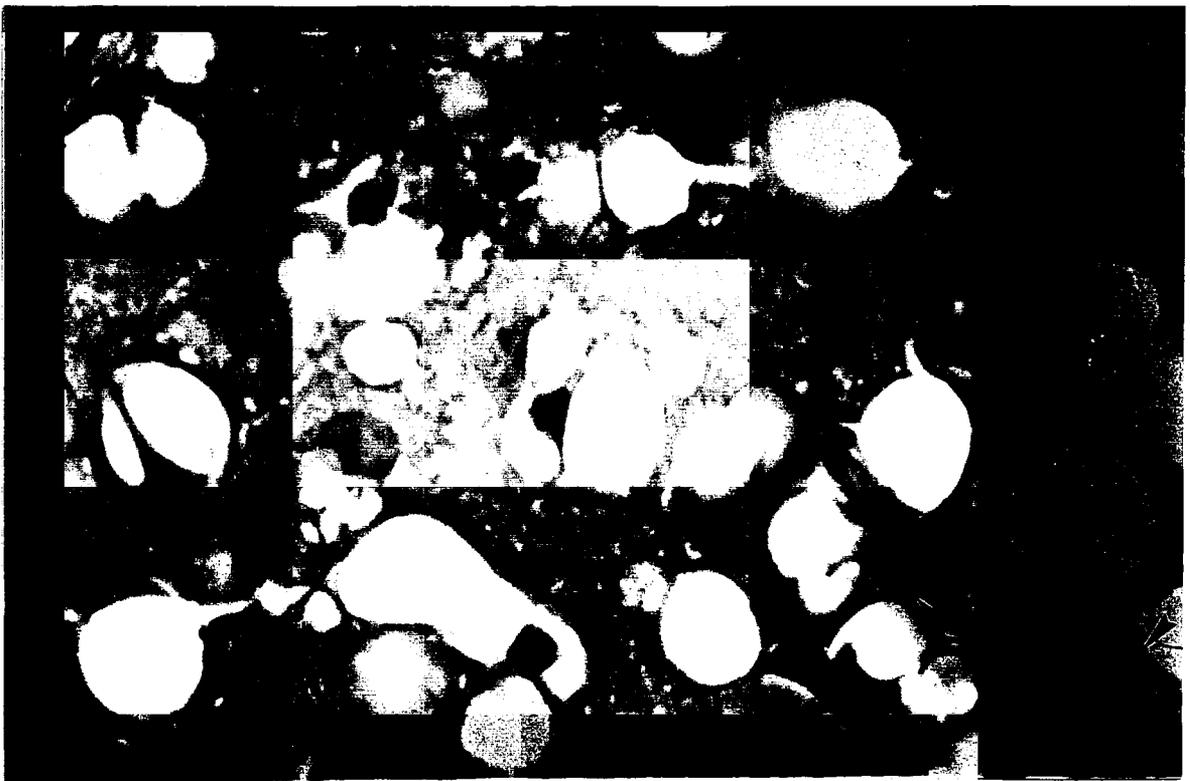
- (▶) Citoplasma granuloso y amorfo.
- (◻) Acumulación intracelular de grasa en hepatocitos.
- (↗) Moderada distensión de sinusoides.

FIGURA 14 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA CON 3 DOSIS DE CCL VIA INTRAPERITONEAL.

4

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 190X)



En esta fotomicrografia se observa esteatosis de gota gruesa con las siguientes características:

- (◻) Formación de gotas gruesas de grasa intracelular en hepatocitos.
- (▶) Células de Kupffer aparentemente normales.

FIGURA 15 FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO DE RATA CON 3 DOSIS DE CCL₄ VIA INTRAPERITONEAL.

4

Material incluido en paraplast y teñido con hematoxilina y eosina.

(Amplificación 750X)



Esta fotomicrografía muestra esteatosis de gota gruesa observándose:

(►) Núcleos picnóticos hacia la periferia.

TABLA 1

DETERMINACION DE ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT) EN RATAS TRATADAS
 CON UNA DOSIS DE CCL SIN TIOPENTAL SODICO.

4

| # DE RATA | GRUPO EXPERIMENTAL (CCL4) U/L | GRUPO TESTIGO (ACEITE MINERAL) U/L |
|-----------|----------------------------------|--|
| 1 | 90 | 5.6 |
| 2 | 95 | 11.2 |
| 3 | 106 | 50 |
| 4 | 73 | 16.8 |
| 5 | 106 | --- |
| 6 | 90 | --- |
| 7 | 61 | --- |
| 8 | 78 | --- |
| 9 | 78 | --- |

TABLA 2

DETERMINACION DE ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT) EN RATAS TRATADAS
 CON TRES DOSIS DE CCL₄ Y ANESTESICO (TIOPENTAL SODICO).

4

| # DE RATA | GRUPO EXPERIMENTAL (CCL ₄) U/L | GRUPO TESTIGO (ACEITE MINERAL) U/L |
|-----------|---|---------------------------------------|
| 1 | 325 | 11 |
| 2 | 112 | 11 |
| 3 | 348 | 2 |
| 4 | 349 | 34 |
| 5 | 100 | --- |

9.- Discusión

El ácido láctico se incrementó en un 100% en todos los grupos experimentales que recibieron el CCL₄. En cambio los grupos testigo en general no mostraron ningún incremento, excepto el grupo de ratas que no se anestesiaron. Experimentos preliminares en nuestro laboratorio indicaron que los valores normales de ácido láctico en sangre de ratas es difícil de obtener en virtud de que la toma de la muestra de sangre produce tensión muscular y nerviosa en las ratas, que por este motivo incrementaron el valor del ácido láctico, en algunas ocasiones hasta los 50 mg/dl. Es por la razón anterior que se decidió medir lactato utilizando diferentes anestésicos. Los resultados (no mostrados) revelaron que con el tiopental sódico se obtuvieron los valores de ácido láctico a las concentraciones normales (9-16 mg/dl).

Los grupos testigo utilizados en todos los experimentos donde se utilizó tiopental sódico presentaron valores promedio de ácido láctico entre el 15.6 y 16.3 mg/dl con un promedio de 16.08 mg/dl.

Por otra parte los valores promedio de ácido láctico en los grupos de ratas que recibieron CCL₄ durante tres días mostraron incrementos entre 25.8 y 33 mg/dl tanto en la toma basal como a los 30 y 60 minutos después de la última aplicación de CCL₄ así como en los animales que además recibieron galactosa por vía oral.

El valor promedio de lactato en el grupo de ratas que recibieron una sola dosis de CCL₄ fue a los 60', similar al encontrado en los grupos experimentales que recibieron 3 dosis de CCL₄ en un periodo de tiempo de 48 hrs; es decir, 60' después se alcanzó el valor máximo de lactato en todas las condiciones experimentales manejadas en el presente trabajo.

El tiopental sódico actúa como depresor del SNC y puede producir hipoxia (Lumb y Jones 1979), en base a este mecanismo es de esperarse que aún en las ratas normales se incremente el ácido láctico. Sin embargo como observamos en este trabajo los grupos testigo con tiopental presentaron valores de lactato normales. En cambio en el grupo experimental, el ácido láctico se encontró aproximadamente al doble del valor normal lo cual pudiera significar que el hígado es más susceptible a las sustancias que producen hipoxia, como el tiopental sódico y que es incapaz de mantener la homeostasis de lactato. Esta posibilidad que tiene fundamento teórico no puede ser apoyada por nuestros experimentos en el cual se determinó el ácido láctico sin utilizar ningún anestésico tratando de mantener a las ratas con la menor tensión posible.

El grupo experimental mostró incrementos que fueron estadísticamente significativos comparados con el grupo testigo, lo cual indica que el CCL por si solo altera la homeostasis del ácido láctico.

⁴ Sin embargo el valor del lactato en el grupo testigo fue significativamente superior a los valores normales, lo cual se explica en base a producción de lactato muscular.

Finalmente la disminución de ácido láctico provocada en los grupos testigo con la administración oral de galactosa a 1 gr/kg de peso posiblemente sea debido a un aumento en la síntesis de glucógeno a partir de precursores como el ácido láctico.

El mecanismo por el cual el CCL altera la homeostasis del ácido láctico puede ser explicado en base a una alteración en la función mitocondrial. El CCL, a través de los radicales libres que se forman, aumenta la peroxidación de los organelos de la célula como RER y mitocondrias (Bowman y Rand 1985). En 1988 Ikai, I. y Cols. mostraron

que durante la fase de recuperación del choque hipovolémico en ratas con cirrosis hepática producida mediante intoxicación durante tres meses con CCL₄ (dos dosis por semana), el ácido láctico y el ácido pirúvico se encontraron significativamente elevados, comparados con las ratas testigo. Por otra parte Rao y Mehendale en 1989 encontraron una disminución considerable de ATP y fructosa 1,6 difosfato en el hígado de ratas que recibieron una inyección intraperitoneal de CCL₄ en aceite mineral a una dosis de 2.5 ml/kg lo cual sugiere que la disminución de ATP es consecuencia de una alteración en la glucólisis hepática pero no se descarta una disminución del nucleótido por un daño mitocondrial.

Otra posibilidad que explique la alteración del lactato es en base a una disminución en la captación hepática del mismo, sin embargo esta posibilidad requiere mayor investigación.

Por otra parte experimentos preliminares no mostrados, indican que existe una disminución importante en el contenido total de glucógeno la cual puede deberse a una disminución en la gluconeogénesis como el lactato. Nuestros experimentos con galactosa concuerdan con la idea anterior. En estas condiciones el aumento de lactato puede ser debido a un defecto en la síntesis de glucógeno a partir de lactato y de una disminución en la oxidación de lactato por daño mitocondrial lo que por supuesto requiere de confirmación experimental con isótopos radiactivos.

Finalmente nuestros datos apoyan la hipótesis acerca del posible papel del ácido láctico en la génesis de la fibrosis hepática en virtud de que el ácido láctico se incrementa en sangre 60' después de la administración del tóxico antes de que se inicie el proceso de fibrosis.

10.- Conclusiones

- 1.- El tiopental sódico puede ser utilizado para medir los valores normales de ácido láctico en sangre de ratas.
- 2.- La galactosa disminuye el ácido láctico en los grupos testigo efecto que no se observa en las ratas intoxicadas con CCL₄.
- 3.- El CCL₄ altera la homeostasis del ácido láctico aún cuando se aplica en una sola dosis.
- 4.- La alteración de la hemoestasis del ácido láctico ocurre antes de la fibrosis hepática.

11.- Resumen

En la fibrosis hepática provocada por CCL₄, se han aislado factores termoestables capaces de estimular la síntesis de colágena en fibroblastos. Se sabe también que el ácido láctico incrementa la síntesis de colágena en miofibroblastos, y en rebanadas de hígado de ratas tratadas con CCL₄.

También se ha encontrado hiperlactemia en pacientes con cirrosis alcohólica, la cual además correlaciona con la concentración de prolina en sangre.

El objetivo del presente trabajo consistió en demostrar si se encuentra alterada la homeostasis del ácido láctico durante la intoxicación aguda de CCL₄ en ratas.

Se utilizaron grupos de 6 ratas macho Sprage-Dawley, a las cuales se les administró por vía intraperitoneal 0.5 ml de CCL₄ en aceite mineral (1:1) de uno a tres días continuos.

Se determinó la concentración de lactato en sangre (obtenida de la vena caudal) mediante un método enzimático espectrofotométrico a los 0, 30 y 60 minutos después de la última aplicación de CCL₄.

A fin de investigar los valores en reposo de ácido láctico se decidió utilizar anestésico (tiopental sódico 10 mg/kg), para mantener a la rata relajada y suprimir el dolor ocasionado por el corte realizado para la obtención de las muestras de sangre.

Para evaluar la oxidación de galactosa los animales experimentales y testigos con administración de tres dosis de CCL₄ y aceite mineral, se sometieron a una prueba oral con galactosa (1 gr/kg de peso corporal).

A estos animales, se les determinó la actividad de alanina

aminotransferasa como marcador de daño hepático.

En los resultados obtenidos se observan claramente diferencias estadísticamente significativas en las ratas que recibieron el tóxico comparadas con los grupos testigo que sólo recibieron el vehículo.

El grupo experimental sin anestésico mostró un incremento cercano al 100% sobre el valor superior normal (30.6 mg/dl) mientras que el grupo testigo (21.9 mg/dl) tuvo un incremento menor al 40%.

Las ratas tratadas con CCL durante tres días mostraron el mismo incremento de ácido láctico⁴ que el grupo sin tiopental sódico y persistió sin cambios a los 30' y 60' después de la última administración de CCL.

Por otra parte el uso del barbitúrico en las ratas testigo evitó que éstas presentaran valores superiores a los normales de ácido láctico.

El efecto de una sola dosis de CCL⁴ y anestésico no mostró cambios en la toma basal de ácido láctico. Sin embargo se encontró un aumento significativo 60' después de administrado el tóxico ($p=0.003$).

En relación al efecto de la galactosa en ratas con tres dosis de CCL⁴ sobre el ácido láctico los resultados mostraron que el valor promedio de ácido láctico fué similar al encontrado en los experimentos en donde se utilizó CCL sólo o con anestésico, sin embargo el análisis individual en algunas ratas mostró incrementos de lactato superiores a los 50 mg/dl. Un aspecto interesante fué que la galactosa disminuyó significativamente la concentración de lactato a los 60' en las ratas testigo.

Las diferencias encontradas en ambos grupos fueron estadísticamente significativas en la toma basal ($p=0.00006$) y a los 60' ($p=0.0009$).

Se concluye que el CCL altera la homeostasis del ácido láctico 30' después de su aplicación⁴ por un mecanismo en el que posiblemente se

encuentre disminuida la oxidación de lactato y la utilización de éste para formar glucosa o glucógeno.

12.- AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Javier Flores Alvarado por la asesoría y dirección para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Genaro Gabriel Ortiz por el apoyo profesional para la realización del trabajo morfológico.

Al Dr. Alfredo Feria Velasco por auxiliarme en la discusión del trabajo morfológico y brindarme todas las facilidades para la realización de esta tesis.

Al M. en C. Adolfo Cárdenas Ortega por su participación en las pruebas enzimáticas.

Al M.V.Z. Pedro Díaz Esquivel por facilitarme los animales de experimentación en óptimas condiciones y permitirme trabajar en el bioterio.

Al Prof. y Lic. Jorge Vásquez Padilla por su amistad y por capturar, corregir e imprimir todo el material de este trabajo.

Al Ing. Rogelio Troyo por la asesoría estadística para la evaluación de los resultados obtenidos.

A mis compañeros y amigos:

Miriam, Sonia, Graciela, Daniel, Gustavo y Araceli.

Por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Así mismo agradezco a todos los profesores de la Facultad de Ciencias, que participaron en mi formación académica y científica.

13.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bowman, W.C., y Rand, M.J.: Farmacología, bases bioquímicas y patológicas, ed. Interamericana (1985).
- 2.- Cerbón-Ambriz, J., Cerbón, J., González, E., y Rojkind, M.: Lactate and pyruvate increase the incorporation of [³H] into collagen ³H hydroxyproline in liver slices of CCL₄ cirrhotic rats. 57(1987)392-396.
- 3.- Cohen, R.D., y Simpson, R.: Lactate metabolism. Anesthesiology 43(1975)661-673.
- 4.- Cohen, R.D., Woods, H.F.: The clinical presentation and classification of lactic acidosis. In clinical and biochemical aspects of lactic acidosis (ed. Cohen, R.D. y Woods, H.F.) Blackwell, Oxford, 1976.
- 5.- Crouch, J.: Anatomía hepática y funcional. C.E.C.S.A. (1983)561-565.
- 6.- Davidsohn, I. y Henry, J.B.: Todd-sanford, Diagnóstico clínico por el laboratorio. Ed. Salvat (1978) Barcelona, España.
- 7.- French, W.S., Benson, C.N., Sun, S.P.: Centrilobular liver necrosis induced by hypoxia in chronic ethanol-fed rats. Hepatology 4(1984)912-917.
- 8.- Gasca-Centeno, E.: Tesis maestría 1988 U. de G.
- 9.- Green, H. y Goldberg, B.: Collagen and cell protein synthesis by an established mammalian fibroblasts line. Nature 204(1964)347-349.
- 10.- Giraudet, P., Pre, J., Bovige, D., y Coudon, B.: Biochimie tissulaire Humaine: Le Foie Ed. Malone Paris (1979).

- 11.- Gutmann, I., y Wahlefeld, A.W.: L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺ in Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic analysis. Academic press Nueva York (1974)1464-1467.
- 12.- Huckabee, W.E.: Abnormal resting blood lactate; Significance of hyperlactatemia in hospitalized patients. American journal of medicine 30(1961)833-839.
- 13.- Ikai, I., Shimahara, Y., Wakashiro, S., Ozaki, N., Tokunaga, Y., Tanaka, A., Morimoto, T., y Ozawa, K.: Influence of Hemorrhagic Shock on hepatic Energy Metabolism in Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhotic Rats. Circulatory Shock 26,(1988) 365-374.
- 14.- Kershenobich, D., Garcia-Tsao, G., Alvarez-Saldana, S., y Rojkind, M.: Relationship between blood lactic acid and serum proline and alcoholic liver cirrhosis. Gastroenterology 80(1981)1012-1015.
- 15.- Kreisberg, R.A.: Lactate Homeostasis and lactic acidosis. Annals of internal medicine 92(1980)227-237.
- 16.- Kovaloff, E.M., Phang, J.M., Granger, A.S., y Downing, S.J.: Regulation of proline oxidase activity by lactate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(1977)5368-5371.
- 17.- Lieber, C.S.: Alcohol, protein metabolism, and liver injury. Gastroenterology 79(1980)373-390.
- 18.- Lumb, W. V. y Jones, E. W.: Anestesia veterinaria Ed. C.E.C.S.A. 1979 Mexico.
- 19.- Parafita, M.A., Pazo, J.A., Alfonso, M., y Beiras, E.: Antigenical alterations of hepatocyte membrane in rats after long-term administration of ethanol and carbon tetrachloride. Drug and Alcohol Dependence 23,(1989) 177-179.

- 20.- Rao, S.B., y Mehendale, H.H.; Protective role of fructose 1,6-bisphosphate during CCL₄ hepatotoxicity in rats. Biochem. J. 262,(1989) 721-725.
- 21.- Robbins, S.L.: Patología estructural y funcional. Nueva Ed. Interamericana (1975).
- 22.- Rojkind, M., y Dunn, E.: Hepatic fibrosis. Gastroenterology 76(1979)849-863.
- 23.- Rojkind, M., Giambrone, M.A. y Biempica, L.: Collagen types in normal and cirrhotic liver. Gastroenterology 76(1979)710-719.
- 24.- Rubin, E. y Lieber, C.S.: Experimental alcoholic hepatitis; A new primate model. Science (1973)712-713.
- 25.- Savolainen, E.R., Leo, M.A., Timpl, R., y Lieber, C.S.: Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured baboon liver myofibroblasts Gastroenterology 87(1984)777-787.
- 26.- Sidney Siegel: Nonparametric Statistics for the behavioral sciences. Ed. Mc GRAW HILL, KOGAKUSHA, LTD (1956).



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente:
Número 1309/89

SRITA. MONICA AYUB AYALA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL ACIDO LACTICO DURANTE LA INTOXICACION AGUDA CON TETRACLORURO DE CARBONO (CCl4)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M.en c. Genaro Gabriel Ortiz.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., Octubre 18 de 1989

EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS



FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El M.en C. Genaro Gabriel Ortiz, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

17 de Noviembre de 1989.

C. Ing. Adolfo espinosa de los Monteros
Director de la Facultad de Ciencias.
Universidad de Guadalajara.

P r e s e n t e .

Estimado Ing. Adolfo Espinosa:

Por medio de la presente comunico a usted que la C. Monica Ayub Ayala, pasante de la licenciatura en Biología con el número de registro 80302568 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL ACIDO LACTICO DURANTE LA INTOXICACION AGUDA CON TETRACLORURO DE CARBONO (CCL₄). Estudio bioquímico e histopatológico efectuado en la Facultad de Medicina, la Facultad de Ciencias y la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente del IMSS.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis, y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M. en C. Genaro Gabriel Ortiz.

Director de tesis