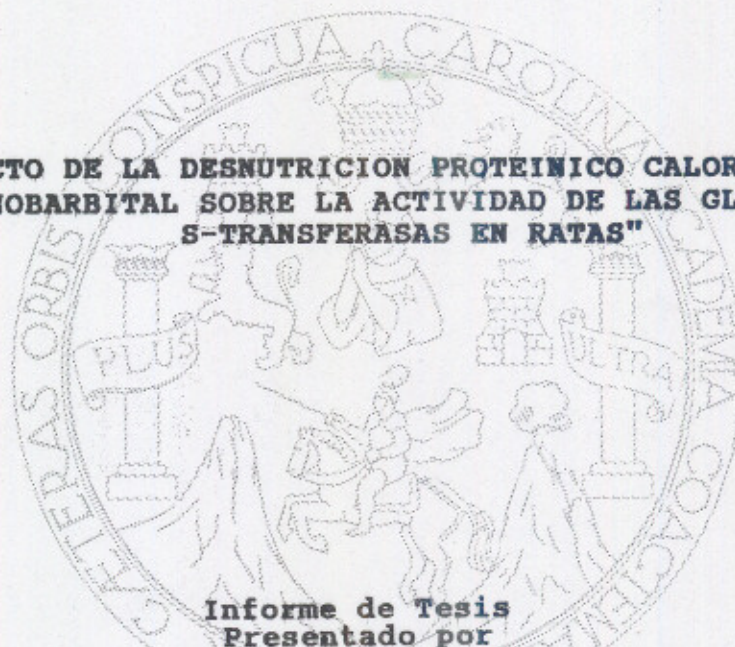


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Centro

"EFECTO DE LA DESNUTRICION PROTEINICO CALORICA Y DEL
FENOBARBITAL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS GLUTATION
S-TRANSFERASAS EN RATAS"



Informe de Tesis
Presentado por
AURA ELENA SUCHINI FARFAN
Para optar el título de
BIOLOGA

Guatemala, enero de 1994.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
06
T(873)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOLCAL I	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
VOCAL II	LICDA. THELMA ESPERANZA ALVARADO DE GALLARDO
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. MARWIN ESTUARDO JIMENEZ BOJORQUEZ
VOCAL V	BR. SERGIO ARTURO ALMENGOR CORZO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

A:

Rúben Amilcar Farfán

Adela Farfán Izquierdo

Aura Elena Farfán

Luis Alberto Velásquez Farfán

Ricardo Santa Cruz Morales

Manuel Antonio Méndoza Farfán

Mario Alfredo Méndoza Farfán

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Sincero Agradecimiento

A la Licda. Conchita del Bosque, del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, por haber proporcionado las ratas y dietas para la realización del estudio.

Al Dr. José Héctor Aguilar, por su apoyo y colaboración a lo largo del estudio.

A los trabajadores del Bioterio del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, por la colaboración prestada durante el trabajo en el mismo.

Al Centro de Datos para la Conservación del Centro de Estudios Conservacionistas por el apoyo logístico brindado.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

INDICE

	PAGINA
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	4
IV. Justificación	14
V. Objetivos	15
VI. Hipótesis	16
VII. Materiales y Métodos	17
VIII. Resultados	27
IX. Discusión de Resultados	31
X. Conclusiones	35
XI. Recomendaciones	36
XII. Bibliografía	37
XIII. Anexo	43

ABREVIATURAS

CAS	Dieta estándar de caseína.
CAS FB	Ratas con dieta estándar de caseína e inyectadas con fenobarbital.
CDNB	1-Cloro-2,4 dinitrobenceno.
DLN	Dieta libre de nitrógeno.
DLN FB	Ratas con dieta libre de nitrógeno e inyectadas con fenobarbital.
DPC	Desnutrición proteínico calórica.
FB	Fenobarbital.
GSH	Glutación.
Ki	Constante de inhibición.
Km	Constante de Michaelis Menten.
mM	Milimolaridad.
M	Molaridad.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

I. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la desnutrición proteínica calórica y del fenobarbital sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de las glutatión S-transferasas (GSH S-transferasas) en ratas. Los niveles de la enzima en el plasma se midieron en Unidades/ml de plasma, mientras que los niveles de la enzima en el hígado se midieron en Unidades/gramo de hígado y en Unidades/mg de proteína; definiéndose a una Unidad, como la cantidad de enzima que produjo un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350 nm, durante 1 minuto, al incubar la mezcla de reacción a 30°C.

Se utilizaron 32 ratas divididas en cuatro grupos: 16 ratas con dieta estándar de caseína y 16 ratas con dieta libre de nitrógeno, de las cuales 8 de cada dieta fueron inyectadas con fenobarbital.

No se observó una diferencia significativa en la actividad enzimática de las GSH S-transferasas en el plasma e hígado entre las ratas con dieta estándar de caseína y las ratas con dieta libre de nitrógeno.

El fenobarbital indujo la actividad enzimática de las GSH S-transferasas en el hígado de las ratas con dieta estándar de caseína y en las ratas con dieta libre de nitrógeno.

A nivel del plasma no hubo diferencia significativa en la actividad enzimática de las Glutatión S-transferasas entre las ratas con dieta estándar de caseína, las ratas con dieta libre de nitrógeno y las ratas con dieta libre de nitrógeno e inyectadas con fenobarbital.

II. INTRODUCCION

Las Glutación S-transferasas (GSH S-transferasas) (EC 2.5.1.18) son un grupo de proteínas multifuncionales involucradas en la detoxificación de un amplio espectro de compuestos xenobióticos (1). Representan uno de los más importantes mecanismos de defensa contra intermediarios electrofílicos generados endógenamente (1). En adición a su función catalítica, en la cual participa el glutati6n reducido (GSH) como un nucle6filo, estas enzimas parecen jugar un papel importante en la uni6n no enzimática y almacenaje de un gran n6mero de compuestos hidrof6bicos como la bilirrubina, carcin6genos de diazonio, etc (2,3).

Un estudio realizado para medir el efecto de una dieta basada unicamente en prote6nas, carbohidratos o grasas sobre el metabolismo de la antipirina y la teofilina en humanos, mostr6 que los individuos que recib6an una dieta alta en prote6nas pose6an un tiempo medio de vida corto para la antipirina y la teofilina respecto al de los que recibieron una dieta alta en carbohidratos y grasas; indicando una metabolizaci6n m6s r6pida de la antipirina y teofilina en los individuos que ingirieron una dieta alta en prote6nas (4).

Por otro lado, se ha demostrado que la desnutrici6n prote6nico cal6rica (DPC) disminuye los niveles de GSH S-transferasa B hepática en ratas (5) y de las GSH S-transferasas s6ricas en humanos (6), lo que evidencia una alteraci6n en la absorci6n, disponibilidad, distribuci6n y excreci6n de f6rmacos y compuestos ex6genos, ya que estas enzimas est6n involucradas en la detoxificaci6n en el organismo de compuestos

farmacológicamente activos, al funcionar como proteínas de unión para aniones orgánicos y su transporte hacia el exterior del hígado por medio de la bilis.

Otros estudios han reportado un incremento en la actividad de las Glutation S-transferasas en ratas como respuesta al tratamiento con fenobarbital (7).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la DPC y del fenobarbital sobre la actividad de las GSH S-transferasas en el plasma e hígado de ratas, para determinar la influencia del estado nutricional sobre los niveles de GSH S-transferasas a nivel hepático y plasmático, además de observar si el estado nutricional modifica el efecto que tiene el fenobarbital sobre estas enzimas.

III. ANTECEDENTES

1. Glutación S-transferasas (GSH S-transferasas).

1.1 Generalidades:

Las Glutación S-transferasas (GSH S-transferasas) (EC 2.5.1.18) están presentes en muchos tejidos. En la rata se han encontrado en el hígado, riñón, corazón, bazo, pulmón, mucosa intestinal y testículos (9,10,11); pero son particularmente predominantes en el hígado en donde pueden constituir más del 10% de la proteína (11).

Las GSH S-transferasas son un grupo de proteínas diméricas multifuncionales que pueden ser inducidas a altos niveles por muchos compuestos xenobióticos, incluyendo el fenobarbital, 3-metil-colantreno, fenilbutazona y 3,4-benzopireno (7,12).

Cada una de las distintas enzimas Glutación S-transferasas de la rata es una proteína básica de 45,000 Da, compuesta de 2 sub-unidades de aproximadamente 25,000 Da cada una (1,13,14,15).

Las Glutación S-transferasas aisladas en la rata comprenden combinaciones binarias de al menos 6 sub-unidades mayores: Y α , Y α , Yb1, Yb2, Yc y Yn que pueden ser separadas por una electroforesis unidimensional en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (16,17,18).

Un análisis estructural de las GSH S-transferasas A, C y D de la rata ha confirmado la existencia de 2 sub-unidades Yb estructuralmente relacionadas, denominadas Yb1 y Yb2 formando los homodímeros GSH S-transferasa A y GSH S-transferasa D respectivamente (18) y el heterodímero Yb1Yb2 ó GSH S-transferasa

C (18,19).

El nombre de ligandina fue originalmente utilizado para describir 3 preparaciones aparentemente homogéneas de proteínas (GSH S-transferasas) las cuales, sobre la base de estudios de peso molecular, composición de aminoácidos y actividad inmunológica fueron considerados como una única proteína. En posteriores preparaciones de esta proteína se encontró que contenía los dímeros YaYa, YaYc o una mezcla de estos, no siendo posible definir la composición de la ligandina (20).

Posteriormente se encontró que la ligandina y la GSH S-transferasa B que se consideraban ser una misma proteína, son proteínas diferentes ya que poseen diferente composición de subunidades y el ácido litocólico inhibe la actividad de la proteína ahora conocida como ligandina (homodímero YaYa) pero no a la GSH S-transferasa B (heterodímero YaYc)(20,21). No está claro aún si las dos proteínas son codificadas por el mismo gen o por diferentes genes (20).

1.2 Mecanismo de acción:

Cada una de las GSH S-transferasas cataliza la reacción del GSH con compuestos con un sitio electrofílico (15). La enzima exhibe un mecanismo cinético complejo. Bajo condiciones normales en el hígado, a una concentración entre 3 y 10 mM de GSH, la actividad de la transferasa A de la rata tiene un valor alto de Km para el GSH, siendo el GSH el primer sustrato que reacciona con la enzima, el producto, S-(2-cloro-4-nitrofenil)GSH es competitivo con el sustrato GSH y no competitivo con el otro

sustrato 1,2-dicloro-4-nitrobenceno. A bajas concentraciones de GSH, el S-(2-cloro-4-nitrofenil)GSH es competitivo con el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno y no competitivo con el GSH; lo que concuerda con el hecho de que el sustrato electrofílico es el primero en unirse a la enzima a bajas concentraciones de GSH.

A altas concentraciones de saturación del glutatión (100 mM o cercana al nivel de K_m , 0.05mM), el ión cloruro no inhibe la actividad de la enzima. El otro producto S-(2-cloro-4-nitrofenil)GSH es un inhibidor competitivo con el glutatión, teniendo una K_i de 5 μ M. La inhibición con el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno es no competitiva. El cloruro de benzil es un inhibidor no competitivo del 1,2-dicloro-4-nitrobenceno y el GSH. El trans-4-fenil-3-buten-2-ona es un inhibidor competitivo con el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno y no competitivo con el GSH (13).

La saturación del glutatión es bifásica con una discontinuidad cercana a una concentración de 0.1 mM de glutatión. A altas concentraciones (0.15 mM) el glutatión muestra una saturación hiperbólica normal, con una K_m aparente de 0.2 mM. A concentraciones menores de 0.1 mM la saturación es lineal con una K_m de 0.01 mM (13).

Las transferasas del ratón, rata y hombre tienen una alta actividad específica (22).

La bilirrubina se une a 2 sitios en la ligandina (dímeros YaYa, YaYc o mezclas), al primario de alta afinidad y a un sitio secundario de menor afinidad. Solamente la unión al sitio secundario influye en la acción catalítica de la enzima (23).

Los ácidos biliares, especialmente el ácido litocólico se unen a la enzima en el sitio de alta afinidad (24).

1.3 Función:

Las siguientes funciones han sido reportadas para una o más isoenzimas de las GSH S-transferasas: catálisis de reacción de conjugación, en la que el GSH sirve como un nucleófilo, como primer paso en la formación del ácido mercaptúrico; actividad GSH peroxidasa hacia hidroperóxidos orgánicos, protegiendo así al hígado del daño oxidativo inducido por hidroperóxidos; actividad isomerasa para α -3-cetosteroides y proteínas de unión para aniones orgánicos como bilirrubina, metabolitos de esteroides y carcinógenos de diazonio (1,2,15,24,25,26).

Las GSH S-transferasas juegan un papel de importancia fisiológica iniciando la detoxificación de agentes potencialmente alquilantes, incluyendo compuestos farmacológicamente activos, como por ejemplo: yodometano, bromoetano, 1-bromopropano, etil metanosulfonato, cloruro de benzil, epóxidos y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (11,15).

La ligandina (dímeros YaYa, YaYc o mezclas) se une no covalentemente a sustancias endógenas pero la afinidad de unión varía. Por ejemplo, los metabolitos de estradiol se unen con igual o mayor afinidad que los metabolitos de corticosteroides, mientras que la bromosulfonftaleína puede ser desplazada por bajas concentraciones de bilirrubina pero no por sales biliares (3).

Existe también una especificidad de unión entre los

carcinógenos. Por ejemplo, mientras los carcinógenos de diazonio (27) y el metilcolantreno se unen a la ligandina, el acetilaminofluoreno, no se une (28). Los carcinógenos se unen no covalentemente y también covalentemente a la enzima (28).

Compuestos que inducen las enzimas del retículo endoplásmico, cuya función es metabolizar las drogas y esteroides, también inducen a la ligandina (dímeros YaYa, YaYc o mezclas) (28).

En experimentos ontogenéticos, filogenéticos, de inducción y competición, se ha visto que existe una relación directa entre la concentración hepática de la ligandina (dímeros YaYa, YaYc o mezclas) y el flujo neto de bilirrubina, bromosulfonftaleína y otros aniones orgánicos entre el plasma y las células del hígado (3). Por ejemplo, la forma primaria de transporte de la bilirrubina en el plasma es por formación de complejos con la albúmina (29). Luego, una porción de la bilirrubina pero no la albúmina es transferida a través de la membrana celular dentro del hepatocito donde se une a proteínas solubles. Intracelularmente, la bilirrubina se une primariamente a la ligandina (GSH S-transferasa B) y se une, en menor cantidad, a otras GSH S-transferasas y a la proteína Z. La bilirrubina dentro de la célula hepática puede ser conjugada y excretada hacia la bilis o retornada al plasma en forma no conjugada (2).

La ligandina (dímeros YaYa, YaYc o mezclas) retiene su capacidad de unirse a la bilirrubina en presencia de componentes del sobrenadante del hígado, pero la albúmina, la cual se une a la bilirrubina en el suero, pierde su capacidad de unión a la

bilirrubina en el sobrenadante del hígado. Esto fue atribuido a la gran especificidad de unión exhibida por la ligandina. En su respectivo medio fisiológico, la albúmina y la ligandina están estructuralmente adaptadas para unirse a los ligandos, la albúmina en el suero y la ligandina en el citosol de las células del hígado (30).

2. Desnutrición proteínica calórica (DPC).

2.1. Generalidades.

La DPC puede ser primaria o secundaria, dependiendo de si es resultado de una deficiencia primaria en la ingesta de alimentos o consecuencia de otras alteraciones que deterioren la ingesta, absorción o utilización de alimentos, o que incrementen la necesidad o pérdida de energía y/o proteína. La DPC primaria resulta de una privación prolongada de aminoácidos esenciales y nitrógeno total y/o de energéticos. El factor limitante nutricional que inicia el proceso hacia la DPC puede ser el nitrógeno proteico (aminoácidos esenciales y nitrógeno no esencial) y/o la energía total (31).

2.2. Efecto de la DPC sobre el metabolismo de los fármacos:

Se ha observado que la DPC puede influir en el metabolismo de los fármacos; así, Narang y colegas reportaron que un grupo de niños con DPC presentaba una disminución en la movilización de la antipirina. Dicha disminución fue corregida en todos los niños luego de la restitución nutricional (32). Observaciones similares sobre el metabolismo de la antipirina fueron hechas por

Homeida y colegas (33). En otros estudios ha sido reportado un metabolismo deteriorado de la antipirina, la isoniazida y la acetanilida en niños con DPC, metabolismo que fue incrementado con el tratamiento de la desnutrición (34).

Existe evidencia de que la pérdida de la proteína puede alterar la conjugación del cloranfenicol en el hígado de las ratas. En niños que padecen kwashiorkor, resulta disminuída la capacidad del suero de unirse a las drogas; además la oxidación, conjugación y unión a proteínas de las drogas están deterioradas (4). Así la eliminación del salicilato libre es mucho más baja en niños desnutridos que en los normales (35). El cloranfenicol es removido más lentamente en niños desnutridos, debido a una conjugación deteriorada del antibiótico en el hígado (36).

2.3. La DPC y su relación con las GSH S-transferasas.

Lizama R. en 1981, encontró que en ratas sometidas a una dieta adecuada, los machos poseen niveles mayores de ligandina que las hembras, diferencia que no pudo encontrar en los animales con DPC. Además reportó que la DPC disminuye los niveles de ligandina (glutación transferasa B) hepática, afectando de esta manera el transporte de aniones orgánicos del plasma hacia el hígado. Esta disminución se suma al efecto directo que tiene la DPC sobre los sistemas enzimáticos, contribuyendo de ésta manera a la disminución en el metabolismo de ciertos fármacos (5).

Velasquez R. en 1987, reportó que las concentraciones séricas de GSH S-transferasa se encuentran disminuídas en niños que sufren DPC, aparentemente con valores progresivamente menores

a medida que se incrementa el grado de desnutrición. Esta disminución sugiere una reducción significativa en las concentraciones de estas enzimas en el hígado (6).

3. Influencia del fenobarbital en la actividad de las GSH S-transferasas:

La actividad de las enzimas que metabolizan las drogas en el hígado de ratas (37,38), conejos (12), rumiantes, cerdos, vacas, cabras y terneros es inducida por la administración de fenobarbital (37).

En ratas macho y hembra se observó un incremento en la actividad de cuatro GSH S-transferasas en respuesta al tratamiento con fenobarbital. El incremento en la actividad enzimática en las hembras fue similar al efecto en los machos (7).

El fenobarbital induce la actividad catalítica de las GSH S-transferasas hacia el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno en el hígado de ratas en todos los estados de desarrollo post-natal. El incremento absoluto en la actividad catalítica de las GSH S-transferasas después de la inducción por fenobarbital es una función de la actividad basal presente en el estado de desarrollo, así la actividad hacia el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno se incrementó en un 70, 81, 80, 96, 92 y 67% a edades de 5, 10, 20, 30, 50 y 70 días respectivamente, después del tratamiento con fenobarbital (8).

El fenobarbital aumenta la concentración de ligandina (GSH S-transferasa B), proporcionando mayor número de sitios de unión

para la bilirrubina. Como la concentración de ligandina aumenta, la proporción de bilirrubina libre disminuye y el flujo de bilirrubina de la célula al plasma es reducido. El efecto se percibe como una reducción del flujo y un incremento en el volumen relativo intracelular de distribución de la bilirrubina (2).

Los niveles de ARN mensajero que codifican las GSH S-transferasas son regulados por una variedad de compuestos xenobióticos (16). Así, Pickett y colaboradores, encontraron que la administración de fenobarbital a ratas daba como resultado un incremento en el ARN mensajero específico para la GSH S-transferasa B en el hígado, obteniéndose una inducción máxima 16 a 24 horas después de inyectado. Esta inducción se debía a la inducción del ARN mensajero que codifica la sub-unidad Ya; además observaron un pequeño aumento en el ARN mensajero específico para la sub-unidad Yc a las 16 horas (39).

Por aparte Kalinyak y Taylor encontraron que la administración de fenobarbital a ratas daba como resultado un incremento selectivo en la concentración del ARN mensajero correspondiente a la sub-unidad Ya de las GSH S-transferasas, y que los niveles de ARN mensajero correspondientes a la sub-unidad Yc parecían no ser afectados, lo que indicaba que la expresión de la ligandina (YaYa) es inducida por el tratamiento con drogas y que la expresión de la GSH S-transferasa B (YaYc) no se ve afectada o se ve muy poco afectada por dicho tratamiento (21).

Ding y colaboradores observaron que solamente los RNAs mensajeros de las sub-unidades Ya, Yb1 y Yb2 eran incrementados

significativamente por la administración de fenobarbital, incremento que es debido en parte a la activación transcripcional de los genes Ya y Yb (17).

Posteriormente otros investigadores encontraron que la administración de fenobarbital incrementa significativamente los niveles del ARN mensajero que dirige la síntesis de las subunidades Ya, Yb y Yc de las GSH S-transferasas en el hígado de la rata (16,40).

Por aparte Sheehan y colaboradores, encontraron que al administrar fenobarbital a ratas la actividad del homodímero Yb₂Yb₂ en el testículo sufría un incremento, incremento que no afectaba la actividad de las GSH S-transferasas A y C (19).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

IV. JUSTIFICACION:

Varios estudios han mostrado que la DPC disminuye el metabolismo de fármacos como la antipirina y los salicilatos en los niños que la padecen; efecto que puede eliminarse al proporcionar una dieta rica en proteínas.

Debido a que la DPC provoca una mayor susceptibilidad a diversas enfermedades, los niños que la padecen son tratados con una gran variedad de fármacos, pero por tener afectados sus sistemas de detoxificación estos niños están más expuestos a los riesgos de sobredosis e intensificación de efectos secundarios provocados por dichos fármacos. Por esto se justifica la necesidad de investigar más la relación entre la desnutrición proteínico calórica y los sistemas enzimáticos de detoxificación (en este caso las GSH S-transferasas).

Estudios previos han mostrado la influencia que tiene la DPC sobre los niveles séricos de estas enzimas en niños y los niveles hepáticos en ratas, pero aún no se conoce el efecto de la DPC sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de estas enzimas en un mismo organismo. Tampoco se conoce el efecto del fenobarbital sobre estas enzimas en condiciones de DPC.

Todo lo anterior hace necesario investigar la relación que existe entre la DPC y los niveles plasmáticos y hepáticos de las GSH S-transferasas y la influencia del fenobarbital sobre la actividad de estas enzimas en condiciones de DPC.

V. OBJETIVOS:

1. Determinar el efecto de la DPC sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de las GSH S-transferasas en ratas.
2. Investigar el efecto del fenobarbital sobre los niveles de las GSH S-transferasas en plasma e hígado de ratas con dietas normales y carentes de proteínas.

VI. HIPOTESIS:

La desnutrición proteínico calórica y el fenobarbital afectan la actividad de las GSH S-transferasas a nivel hepático y plasmático.

1. Universo de Trabajo:

Se utilizaron 32 ratas (16 con dieta estándar de caseína y 16 con dieta libre de nitrógeno) suministradas por la Sección de Tecnología Nutricional, División de Ciencias Agrícolas y Alimentos del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), las cuales se dividieron en 4 grupos de 8 ratas cada uno, identificados de la siguiente manera:

CAS CONT: Ratas alimentadas durante 15 días con una dieta estándar de caseína.

DLN CONT: Ratas alimentadas durante 15 días con una dieta libre de nitrógeno.

CAS FB: Ratas alimentadas durante 18 días con una dieta estándar de caseína, siendo inyectadas diariamente con fenobarbital (60 mg/Kg de peso) los últimos 3 días.

DLN FB: Ratas alimentadas durante 18 días con una dieta libre de nitrógeno, siendo inyectadas diariamente con fenobarbital (60 mg/Kg de peso) los últimos 3 días.

Las determinaciones bioquímicas se realizaron en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. Medios:

2.1. Recursos Humanos:

El estudio lo realizó la estudiante de la carrera de Biología Aura Elena Suchini Farfán, con la asesoría del Dr. José Héctor Aguilar.

2.2. Recursos Materiales:

2.2.1. Reactivos:

- Glutación (GSH) (Merck, grado analítico)
- 1-cloro-2,4 dinitrobenzenceno (CDNB) grado analítico.
- Fenobarbital sódico grado analítico.
- Pentobarbital sódico. (Pentovet, solución al 6.4%).
- Solución tampón de fosfatos, 0.1 M, pH 6.5.
- Solución tampón de fosfatos, 0.01 M, pH 7.4.
- Heparina, solución 750 IU/ml.
- Etanol al 70%, 95% y absoluto.
- Cloruro de sodio al 0.9%.
- Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N (Reactivo A)
- Sulfato de cobre penta-hidratado al 0.5% en una solución de tartrato de potasio o sodio al 1%. (Reactivo B).
- Reactivo C: 50 ml del reactivo A mezclados con 1 ml del reactivo B.
- Reactivo de Folín diluido. (Reactivo E). Preparado de acuerdo a lo señalado por Lowry y col. (41).

2.2.2. Equipo:

- Espectrofotómetro Bausch & Lomb, Spectronic 2000
- Potenciómetro Fisher Modelo Accumet
- Centrífuga refrigerada IEC modelo CR-6000
- Balanza analítica Mettler modelo H35 AR
- Pipeteadores automáticos de 100, 200 y 500 µl.
- Licuadora
- Homogenizador tipo Potter-Eveljem.

2.2.3. Materiales

- Matraces aforados
- Vasos de precipitar y Erlenmeyers de 50, 100, 250 y 500 ml.
- Tubos de ensayo
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Jeringas, algodón.
- Parafilm.
- Tapones de hule.
- Gradillas.
- Embudo y papel filtro.
- Termómetro
- Cápsula de porcelana.

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Producción de DPC en ratas:

Las 32 ratas fueron divididas en 4 grupos de 8 ratas cada uno. Dos de los grupos (CAS CONT y CAS FB) fueron alimentados con una dieta estándar de caseína y los otros dos grupos (DLN CONT y DLN FB) fueron alimentados con una dieta libre de nitrógeno durante 15 días a partir del destete. Durante ese período las ratas fueron pesadas cada semana, y se determinó el alimento ingerido por cada rata, para observar su crecimiento y la relación entre el aumento de peso y el alimento consumido en todos los grupos.

Dieta Estándar de Caseína (CAS)

Caseína	10 gramos
Almidón de Maíz	80 gramos
Mezcla de Minerales	4 gramos
Aceite de Bacalao *	1 ml
Aceite de Algodón	5 ml.
Solución de Vitaminas del complejo B	5 ml

Dieta Libre de Nitrógeno (DLN)

Almidón de Maíz	90 gramos
Mezcla de Minerales	4 gramos
Aceite de Algodón	5 ml
Aceite de Bacalao *	1 ml
Solución de Vitaminas del complejo B.	5 ml

* El aceite de bacalao contiene 1,000 unidades USP de vitamina A y 100 unidades USP de vitamina D.

Mezcla de Minerales (para 100 gramos):

Minerales	gramos
Carbonato de calcio	29.9740
Fosfato de potasio	32.2220
Fosfato monocálcico	7.4930
Sulfato de magnesio	10.1910
Cloruro de sodio	16.7350
Citrato férrico	2.7470
Ioduro de potasio	0.0799
Sulfato manganoso	0.4990
Sulfato de cobre	0.0299
Cloruro de zinc	0.0249

De esta mezcla se tomaron 4 gramos para preparar los 100 gramos de dieta.

Solución de Vitaminas (para 980.30 gramos):

Vitaminas	gramos
Tiamina	30.000
Riboflavina	30.000
Piridoxina	30.000
Pantotenato cálcico	100.000
Niacina/Acido nicotínico	50.000
Biotina	0.100
Acido fólico	0.200
Inositol	400.000
Acido para-amino benzoico	300.000
Vitamina K o menadiona	10.000
Vitamina B-12	30.000

De esta mezcla se tomaron 196.4 gramos y se mezclaron con 300 gramos de cloruro de colina y se disolvieron en 5 litros de alcohol etílico al 95% y 5 litros de agua destilada hasta llevar a un volumen final de 10 litros. De esta solución se tomaron 5 mililitros para preparar los 100 gramos de dieta, teniendo al final una cantidad de 0.248 g de vitaminas.

Posteriormente, el día 16 fueron sacrificadas las ratas de los grupos CAS CONT y DLN CONT, para llevar a cabo las determinaciones bioquímicas.

Las otras 16 ratas de los grupos CAS FB y DLN FB fueron inyectadas intraperitonealmente con fenobarbital (60 mg/Kg de peso), diariamente, por tres días, a partir del día 16. Durante

este período las ratas se mantuvieron con sus respectivas dietas. Transcurridos los tres días se sacrificaron para llevar a cabo las determinaciones bioquímicas.

3.2. Preparación de homogeneizados de Hígado:

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso). Posteriormente, los hígados de las ratas fueron perfundidos in situ con una solución de cloruro de sodio al 0.9% fría, a través de una cánula introducida en la vena cava, con el objeto de eliminar el resto de sangre presente en los órganos. Se eliminó la solución de cloruro de sodio, haciendo pasar aire a través de los hígados, se extrayeron los órganos y se pesaron. Se homogeneizaron los hígados en una solución buffer de fosfato de sodio 0.01 M pH 7.4; obteniendo al final un homogeneizado al 15%. La homogeneización se hizo en un homogeneizador, enfriando previamente el recipiente. Se centrifugaron los homogeneizados a 500 rpm, durante 20 minutos, a una temperatura de 5°C. Los sobrenadantes se decantaron y se guardaron en un congelador a -20°C, hasta la determinación de la actividad enzimática y del contenido de proteínas.

3.3. Obtención de las muestras de plasma:

Luego de anestesiar a las ratas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso), se obtuvieron las muestras de sangre por punción cardíaca, utilizando jeringas con 2 gotas de heparina. La sangre se trasladó lentamente a tubos de ensayo que se mantuvieron en hielo. Se centrifugaron los tubos a 5,000 rpm, durante 5 minutos, a una temperatura de 5°C. El plasma se

decantó y se guardó en un congelador a -20°C , hasta la determinación de la actividad enzimática.

3.4. Determinación de proteínas en hígado de ratas:

La concentración de proteínas en el hígado de las ratas se determinó por el método de Lowry y col. (41).

Se prepararon diluciones 1:100, 1:175 y 1:200 en solución de buffer de fosfato de sodio 0.01 M pH 7.4 de las muestras de homogeneizado de hígado de rata. A 0.6 ml de cada dilución (0.6 ml de agua destilada en el caso del blanco) se le agregó 3 ml del reactivo C, luego se mezcló y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 0.3 ml del reactivo diluido de Folin y se dejó reposar por 30 minutos. Los tubos se leyeron en un espectrofotómetro a 700 nm. La cantidad de proteína presente en cada muestra se obtuvo utilizando una curva estándar (con concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 125 μg de proteína/ml de solución), preparada a partir de una solución patrón al 30 % de plasma humano.

3.5. Determinación de la actividad enzimática de las GSH S-transferasas en plasma e hígado de ratas.

La actividad enzimática de las GSH S-transferasas se determinó por el método de formación de tioéter de Habig y Jakoby (42), basándose dicho método en la medición de los cambios de absorbancia producidos por la enzima al conjugar el GSH con un sustrato específico (1-cloro-2,4-dinitrobenzono -CDNB-).

3.5.1. Determinación de la actividad enzimática en plasma.

Se agregó a cada tubo de ensayo 0.5 ml de una solución tampón de fosfatos 0.1 M pH 6.5 conteniendo CDNB (2.4 mM). Se añadieron 0.5 ml de una solución tampón de fosfatos 0.1 M pH 6.5 conteniendo GSH (2.4 mM) y 0.2 ml de la muestra de plasma, se mezcló por inversión. Se aspiró la mezcla de reacción hacia la celda de lectura del espectrofotómetro, la cuál se mantuvo a una temperatura constante de 30°C. Veinte segundos después de llenar la celda de lectura se registró la absorbancia (lectura cero), a 350 nm. Se hicieron 3 lecturas sucesivas adicionales, con intervalos de un minuto. Antes de cada determinación, se analizó un blanco de reacción compuesto únicamente por agua destilada.

La actividad enzimática se expresó en Unidades/ml de plasma, definiéndose a una Unidad como la cantidad de enzima que produjo un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350nm, durante 1 minuto, al incubar la mezcla de reacción a 30°C.

3.5.2. Determinación de la actividad enzimática en hígado.

Los homogeneizados de hígado se diluyeron 1:10 y 1:15 en una solución tampón de fosfatos 0.01 M pH 7.4. Se agregó a cada tubo de ensayo 0.8 ml de una solución tampón de fosfatos 0.1 M pH 6.5 conteniendo CDNB (1.25 mM). Se añadió 0.1 ml de una solución tampón de fosfatos 0.1 M pH 6.5 conteniendo GSH (10 mM) y 0.1 ml de las diluciones de los homogeneizados de hígado; se mezcló por inversión. Se aspiró la mezcla de reacción hacia la celda de lectura del espectrofotómetro, la cuál se mantuvo a una temperatura constante de 30°C, veinte segundos después de llenar la celda de lectura se registró la absorbancia (lectura cero), a

350 nm. Se hicieron 3 lecturas sucesivas adicionales, a intervalos de un minuto. Antes de cada determinación se analizó un blanco de reacción compuesto únicamente de agua destilada.

La actividad enzimática se expresó en Unidades/gramo de hígado y en Unidades/mg de proteína, definiéndose a una Unidad como la cantidad de enzima que produjo un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350nm, durante 1 minuto, al incubar la mezcla de reacción a 30°C.

3.6. Determinación del efecto del fenobarbital sobre la actividad de las GSH S-transferasas:

Para determinar el efecto del fenobarbital sobre la actividad de las GSH S-transferasas se administró fenobarbital sódico (60 mg/Kg de peso) intraperitonealmente a ratas con una dieta estándar de caseína y a ratas con una dieta libre de nitrógeno durante tres días consecutivos (39,43,44), luego de los cuales se procedió a obtener las muestras de plasma e hígado y a determinar la actividad enzimática en las mismas según la forma descrita anteriormente.

3.7. Análisis estadístico:

Para la medición del efecto de la Desnutrición proteínico calórica y del Fenobarbital sobre la actividad enzimática de las GSH S-transferasas se realizó un Análisis Múltiple de Varianza.

Siendo la hipótesis nula la no existencia de diferencia significativa entre las medias de los grupos en ambos casos, así:

$$H_0: \text{CAS CONT} = \text{CAS FB} = \text{DLN CONT} = \text{DLN FB.}$$

Teniendo como variables las siguientes:

Variable Dependiente: La actividad enzimática de las Glutación S-transferasas.

Variable Independiente: El tratamiento que se le dió a cada grupo, siendo estos, los siguientes:

Grupo CAS CONT = ratas con dieta estándar de caseína.

Grupo CAS FB = ratas con dieta estándar de caseína e inyectadas con fenobarbital.

Grupo DLN CONT = ratas con dieta libre de nitrógeno.

Grupo DLN FB = ratas con dieta libre de nitrógeno e inyectadas con fenobarbital.

Para establecer comparaciones entre los 4 tratamientos se hicieron los siguientes contrastes ortogonales (45).

$$C1 = T1 + T2 - T3 - T4$$

$$C2 = T1 - T2 + T3 - T4$$

$$EC = 1 - 1 - 1 + 1 = 0$$

Donde:

T1 = Tratamiento del grupo CAS CONT.

T2 = Tratamiento del grupo CAS FB.

T3 = Tratamiento del grupo DLN CONT.

T4 = Tratamiento del grupo DLN FB.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

VIII. RESULTADOS

1. PESO DE RATAS.

La tabla No. 1 muestra el peso de las ratas con dieta libre de nitrógeno (DLN) durante las 2 semanas que duró la dieta, así como el alimento ingerido durante ese tiempo.

Las ratas con DLN disminuyeron un promedio de 5 gramos de su peso inicial la primera semana y 6 gramos la segunda, a pesar de ingerir como promedio 38 y 31 gramos de alimento la primera y segunda semana respectivamente. Mientras que las ratas con dieta estándar de caseína aumentaron un promedio de 26 gramos en su peso cada semana consumiendo como promedio 94 y 100 gramos de alimento la primera y segunda semana respectivamente (tabla No. 2).

2. CONTENIDO DE PROTEINA EN EL HIGADO DE LAS RATAS.

En la tabla No. 3 aparecen los mg de proteína/g de hígado de las ratas de los 4 grupos trabajados: CAS CONT, CAS FB, DLN CONT y DLN FB.

No se observó ninguna diferencia significativa a este nivel en los cuatro grupos estudiados, según los resultados del análisis de varianza múltiple ($F= 1.92$, $p > 0.1498$).

3. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL HIGADO DE LAS RATAS (UNIDADES / GRAMO DE HIGADO).

La actividad enzimática en el homogeneizado de hígado, expresada en Unidades/g de hígado, en los 4 grupos estudiados

se presenta en la tabla No. 4.

La actividad enzimática se midió en Unidades, habiéndose definido la Unidad como la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350 nm, de una mezcla de reacción que posea CDNB 1.25 mM y GSH 10 mM, durante 1 minuto, al incubar la mezcla a 30 °C.

Para establecer si existía alguna diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos estudiados se realizó un análisis de varianza múltiple, cuyos resultados muestran que existe una diferencia significativa entre los cuatro grupos de ratas estudiados ($F= 9.02$, $p > 0.0003$). El contraste ortogonal realizado posteriormente muestra que las ratas inyectadas con fenobarbital tuvieron mayor actividad que las ratas no inyectadas, no observándose una mayor actividad en las ratas con dieta de caseína respecto de las ratas con dieta libre de nitrógeno.

4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL HIGADO DE LAS RATAS (UNIDADES / MILIGRAMO DE PROTEÍNA).

La actividad enzimática en el homogeneizado de hígado, expresada en Unidades/mg de proteína, en los 4 grupos estudiados aparece en la tabla No. 5.

La actividad enzimática se midió en Unidades, habiéndose definido la Unidad como la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350 nm, de una mezcla de reacción que posea CDNB 1.25 mM y GSH 10 mM, durante 1 minuto,

al incubar la mezcla a 30 °C.

Para establecer si existía alguna diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos estudiados se realizó un análisis de varianza múltiple, cuyos resultados muestran que existe diferencia significativa entre las ratas CAS CONT, CAS FB, DLN CONT y DLN FB ($F= 21.53$, $p > 0.000$). El contraste ortogonal mostró que las ratas inyectadas con fenobarbital tuvieron mayor actividad que las ratas no inyectadas. No se observó una mayor actividad en las ratas con dieta estándar de caseína respecto de las ratas con dieta libre de nitrógeno.

5. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL PLASMA DE LAS RATAS (UNIDADES / MILILITRO DE PLASMA).

La tabla No. 6 muestra los resultados obtenidos al medir la actividad enzimática en plasma de ratas pertenecientes a 3 de los grupos estudiados, la cuál se expresa en Unidades/ml de plasma; habiéndose definido la Unidad como la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350 nm, de una mezcla de reacción que posea CDNB 2.4 mM y GSH 2.4 mM, durante 1 minuto, al incubar la mezcla a 30 °C.

La actividad enzimática de las ratas pertenecientes al grupo CAS FB no se incluye debido a que fue casi cero.

Para establecer si existía alguna diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grupos estudiados se realizó un análisis de varianza múltiple, cuyos resultados

muestran que no existe una diferencia significativa entre las ratas CAS CONT, DLN CONT y DLN FB ($F= 3.04$, $p> 0.0706$).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

1. PESO DE RATAS.

Las ratas fueron mantenidas durante 15 días luego del destete con su respectiva dieta: dieta estándar de caseína o dieta libre de nitrógeno. Durante dicho tiempo las ratas fueron pesadas cada semana para conocer la variación que sufrían en su peso, también el alimento proporcionado y el sobrante fueron pesados para determinar que cantidad habían ingerido.

La única diferencia entre las dietas dadas a las ratas la constituye la caseína que poseía la dieta estándar de caseína mientras que la dieta libre de nitrógeno no la poseía.

Se observa que las ratas con una dieta estándar de caseína consumieron mayor cantidad de alimento cada semana, aumentando de peso también cada semana; mientras que las ratas que se alimentaron con una dieta libre de nitrógeno ingirieron una cantidad menor de alimento y disminuyeron de peso cada semana, produciéndose en ellas desnutrición proteínico calórica.

2. CONTENIDO DE PROTEINA EN EL HIGADO DE LAS RATAS (MG DE PROTEINA / G DE HIGADO).

Los valores de miligramos de proteína por gramo de hígado en los 4 grupos estudiados no mostraron una diferencia significativa según el análisis múltiple de varianza, observándose que la dieta libre de nitrógeno no influyó en la

concentración de proteína/g de hígado en las ratas que recibieron dicha dieta, puesto que no se observó una diferencia significativa entre estas ratas y las ratas que recibieron una dieta estándar de caseína. Tampoco hubo una diferencia significativa entre las ratas que fueron inyectadas con fenobarbital y las que no fueron inyectadas.

Lizama en 1981 (5), reporta que la dieta deficiente en proteínas afectó solamente la concentración de proteínas en el hígado de las hembras, provocando una disminución en las mismas; no así en los machos con la misma dieta, cuya disminución no era significativa.

3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL HIGADO DE LAS RATAS (UNIDADES / GRAMO DE HIGADO).

Aunque existe una diferencia significativa entre los 4 grupos estudiados, se observó según el contraste ortogonal una mayor actividad enzimática en las ratas con dieta estándar de caseína y dieta libre de nitrógeno inyectadas con fenobarbital respecto de las ratas con dieta estándar de caseína y dieta libre de nitrógeno no inyectadas; siendo mayor la actividad enzimática en las inyectadas.

No se observó una actividad enzimática mayor en las ratas CAS CONT, respecto de las ratas DLN CONT. Lizama en 1981 (5), reportó una disminución en la actividad enzimática de las ratas con dieta deficiente en proteínas respecto de las ratas con dieta adecuada en proteína. Ella utilizó ratas

alimentadas por 21 días con purina conejina antes de iniciar el estudio y las dividió en grupos de ratas con dieta deficiente en proteína y en grupos de ratas con dieta adecuada de proteína; la dieta deficiente en proteína poseía 5 g de caseína suplementada con 0.3 g de DL-Metionina, y la dieta adecuada en proteína poseía 20 g de caseína suplementada con 0.3 g de DL-Metionina.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden deberse a que se utilizaron ratas recién destetadas y a que las ratas DLN CONT no poseían caseína en su dieta mientras que las ratas CAS CONT poseían 10 gramos de caseína; a diferencia del estudio realizado por Lizama.

4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL HIGADO DE LAS RATAS (UNIDADES / MILIGRAMO DE PROTEÍNA).

El análisis múltiple de varianza indica que existe una diferencia significativa entre los 4 grupos estudiados, observándose según el contraste ortogonal, una mayor actividad en las ratas CAS FB y DLN FB respecto de las ratas CAS CONT y DLN CONT, siendo mayor la actividad en las ratas CAS FB.

No se observó una mayor actividad en las ratas CAS CONT respecto de las ratas DLN CONT.

La similitud obtenida en los resultados de la actividad enzimática de las Glutación S-transferasas en el hígado de las ratas medidas en Unidades/mg de proteína y en Unidades/g de hígado podría explicarse, por los resultados obtenidos al

medir el contenido de proteína en el hígado (mg de proteína/g de hígado) de los 4 grupos estudiados pues, según el análisis múltiple de varianza no existe entre ellos una diferencia significativa.

5. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL PLASMA DE LAS RATAS (UNIDADES / MILILITRO DE PLASMA).

Los valores de actividad enzimática encontrados en el plasma de las ratas de los grupos trabajados fueron menores que los encontrados en los homogeneizados de hígado, no existiendo una diferencia significativa entre las ratas CAS CONT, DLN CONT Y DLN FB, según el análisis múltiple de varianza.

Se observó que en el plasma el fenobarbital no produjo un aumento en la actividad enzimática de las Glutación S-transferasas en las ratas inyectadas.

X. CONCLUSIONES

1. Existe una diferencia significativa en la actividad enzimática de las Glutation-S transferasas en el hígado entre los cuatro grupos de ratas estudiados (CAS CONT, CAS FB, DLN CONT y DLN FB), según el análisis múltiple de varianza.

2. En el plasma los grupos de ratas CAS CONT, DLN CONT y DLN FB no mostraron una diferencia significativa en la actividad enzimática de las Glutación-S transferasas según el análisis múltiple de varianza.

3. No hubo una disminución de la actividad enzimática de las GSH-S transferasas en el hígado y plasma de las ratas DLN CONT respecto de las ratas CAS CONT.

4. El FB indujo la actividad enzimática de las GSH-S transferasas en el hígado de las ratas con dieta estándar de caseína y en las ratas con dieta libre de nitrógeno inyectadas, respecto de las ratas de la misma dieta no inyectadas.

5. En el plasma el FB no indujo la actividad enzimática de las GSH-S transferasas en las ratas con dieta estándar de caseína y en las ratas con dieta libre de nitrógeno inyectadas.

XI. RECOMENDACIONES

1. Investigar el efecto de la desnutrición proteínica calórica sobre la actividad de las Glutation S-transferasas en ratas de diferentes edades, para observar que relación tiene la edad con el efecto que pueda causar la desnutrición proteínico calórica sobre la actividad de estas enzimas.
2. Determinar la relación de la edad con la actividad enzimática de las Glutation S-transferasas en el hígado y plasma de los mismos animales.
3. Establecer si el fenobarbital a nivel del hígado induce una mayor producción de la enzima Glutación S-transferasa o induce su mayor actividad.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Reddy Channa, et al. Purification and characterization of the individual Glutathione S-Transferases from sheep liver. Archives. Biochem. Biophys. 1983; 224:87-101.
2. Wolkoff A, et al. Role of ligandin in transfer of bilirubin from plasma into liver. Am. Physiol. Soc. 1979; 236:E638-E648.
3. Levi A. J., Z. Gatmaitan and I. M. Arias. Two hepatic cytoplasmic protein fractions Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. J. Clin. Invest. 1969; 48:2156-2167.
4. Anderson Karl, Allan Conney and Attallah Kappas. Nutritional influences on chemical biotransformations in humans. Nutrition Rev. 1982; 40:161-171.
5. Lizama Ruth. Efecto de la desnutrición proteínico-calórica sobre la concentración de Ligandina (Glutathión transferasa B) en el hígado de rata. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 44 pp.
6. Velásquez Rubén. Efecto de la desnutrición proteínico-calórica sobre la actividad sérica de las Glutathión S-transferasas. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 66 pp.
7. Kaplowitz Neil, John Kuhlenkamp and Gil Clifton. Drug induction of hepatic Glutathione S-Transferases in male and

female rats. *Biochem. J.* 1975; 146:351-356.

8. Hales Barbara and Allen Neims. Developmental aspects of Glutathione S-Transferase B (ligandin) in rat liver. *Biochem. J.* 1976; 160:231-236.

9. Tu Chen-Pei, et al. Tissue-specific expression of the rat Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:4659-4662.

10. Scully Noirin and Timothy Mantle. Tissue distribution and subunit structures of the multiple forms of Glutathione S-Transferase in the rat. *Biochem. J.* 1981; 193:367-370.

11. Booth J., E. Boyland and P. Sims. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with Glutathione. *Biochem. J.* 1961; 79:516-524.

12. Remmer H. and H. J. Merker. Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum: association with drug-metabolizing enzymes. *Science.* 1963; 142:1657-1658.

13. Pabst M, William Habig and William Jakoby. Glutathione S-Transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:7140-7150.

14. Hayes John. Rat liver Glutathione S-Transferases. A study of the structure of the basic YbYb containing enzymes. *Biochem. J.* 1983; 213:625-633.

15. Habig William, Michael Pabst and William Jakoby. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:7130-

7139.

16. Pickett Cecil, et al. Rat liver Glutathione S-Transferases. Complete nucleotide sequence of a Glutathione S-Transferase mRNA and the regulation of the Ya, Yb and Yc mRNAs by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. J. Biol. Chem. 1984; 259:5182-5188.

17. Ding Gloria, et al. Rat liver Glutathione S-Transferases. DNA sequence analysis of a Yb2 cDNA clone and regulation of the Yb1 and Yb2 mRNAs by phenobarbital. J. Biol. Chem. 1986; 261:7952-7957.

18. Hayes John. Purification and characterization of Glutathione S-Transferase P, S and N. Biochem. J. 1984; 224:839-852.

19. Sheehan David, Catherine Ryle and Timothy Mantle. Selective induction of Glutathione S-Transferase D in rat testis by phenobarbital. Biochem. J. 1984; 219:687-688.

20. Hayes John, Richard Strange and W. Percy-Robb. Identification of two lithocholic acid binding proteins. Separation of Ligandin from Glutathione S-Transferase B. Biochem. J. 1979; 181:699-708.

21. Kalinyak Judith and John Taylor. Rat Glutathione S-Transferases. Cloning of double-stranded cDNA and induction of its mRNA. J. Biol. Chem. 1982; 257:523-530.

22. Lee Chi-Yu, et al. Mouse liver Glutathione S-Transferases. Biochemical and immunological characterization. J. Biol. Chem. 1981; 256:8110-8116.

23. Bhargava M, Irwing Listowsky and Irwin Arias. Ligandin. Bilirubin binding and Glutathione S-Transferase activity are independent processes. *J. Biol. Chem.* 1977; 253:4112-4115.
24. Sugiyama Yuichi, Tadataka Yamada and Neil Kaplowitz. Evidence for a common high affinity binding site on Glutathione S-Transferase B for lithocholic acid and bilirubin. *J. Lip. Res.* 1984; 25:1177-1183.
25. Benson Ann, et al. Relationship between the soluble Glutathione-dependent 3-ketosteroid isomerase and the Glutathione S-Transferases on the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74:158-162.
26. Sugiyama Yuichi, Tadataka Yamada and Neil Kaplowitz. Glutathione S-Transferases in elasmobranch liver. *Biochem. J.* 1981; 199:749-756.
27. Ketterer B., Patricia Ross-Mansell and J. K. Whitehead. The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rats given 4-dimethylaminoazobenzene. *Biochem. J.* 1967; 103:316-324.
28. Litwack G, Brian Ketterer and Irwin Arias. Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature.* 1971; 234:466-467.
29. Simons P, et al. Bilirubin binding to Human liver ligandin (Glutathion S-Transferase). *J. Biol. Chem.* 1979; 255:4740-4744.
30. Listowsky I, Zenaida Gatmaiton and Irwin Arias. Ligandin

retains and albumin loses bilirubin binding capacity in liver citosol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978; 75:1213-1216.

31. Viteri Fernando. Manual of clinical nutrition. Protein-energy malnutrition. Pleasantville, N. Y.: Nutrition Publications, Inc.

32. Narang Capinter, Saroj Mehta and Vijay S. Mathur. Pharmacokinetic study of antipyrine in malnourished children. Am. J. Clin. Nutr. 1977; 30:1979-1982.

33. Homeida M., Z. A. Karrar and C. J. C. Roberts. Drug metabolism in malnourished children: a study with antipyrine. Archives of Disease in Childhood. 1979; 59:299-302.

34. Buchanan N., C. Eyberg and M. D. Davis. Antipyrine pharmacokinetics and D-glucaric excretion in Kwashiorkor. Am. J. Clin. Nutr. 1979; 32:2439-2442.

35. Hathcock J. N. and J. Coon. Nutrition and drug interrelations. New York: Academic Press, 1978.

36. Mehta S., et al. Chloramphenicol metabolism in children with protein-calorie malnutrition. Am. J. Clin. Nutr. 1975; 28:977-981.

37. Cook Robert and K. A. Wilson. Metabolism of xenobiotics in ruminants. Phenobarbital induction of liver microsomal Nitrogen Demethylase. J. Agr. Food. Chem. 1970; 18:441-442.

38. Conney A. H. and A. Klutch. Increased activity of Androgen Hydroxylases in liver microsomes of rats pretreated with phenobarbital and other drugs. J. Biol. Chem. 1963; 238:1611-1617.

39. Pickett Cecil, et al. Rat liver Glutathione S-Transferase B; the functional mRNAs specific for the YaYc subunits are induced differentially by phenobarbital. Archives. Biochem. Biophys. 1982; 215:539-543.
40. Ding Victor and Cecil Pickett. Transcriptional regulation of rat liver Glutathione S-Transferases genes by Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene. Archives. Biochem. Biophys. 1985; 240:553-559.
41. Lowry O. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193:265-275.
42. Habig W. H. and Jakoby W. B. Assays for differentiation of Glutathione S-Transferases. Methods Enzymol. 1981; 77:398-405.
43. Thomas D. L., et al. Effects of plane of nutrition and phenobarbital during the pre-mating period on reproduction in ewes fed differentially during the summer and mated in the fall. J. Anim. Sci. 1987; 64:1144-1152.
44. Frey Alan, David Waxman and Gert Kreibich. The structure of phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4. J. Biol. Chem. 1985; 260:15253-15265.
45. Hicks, Charles. Fundamental concepts in the designs of experiments. 3a. ed. College Publishing. New York. pp 47-51.

XIII. ANEXO

TABLA No. 1
PESO CORPORAL Y ALIMENTO INGERIDO EN LAS RATAS
CON DIETA LIBRE DE NITROGENO *

Rata No.	Peso inicial (gr).	Peso la. semana (gr).	Peso 2da. semana. (gr).	Alimento ingerido la. semana. (gr).	Alimento ingerido 2da. semana. (gr).
1	48	44	36	47	42
2	46	41	36	37	33
3	46	41	35	37	30
4	46	42	35	41	37
5	48	40	33	32	22
6	46	39	33	36	29
7	46	40	33	40	22
8	44	38	31	35	24
9	48	42	38	41	32
10	46	43	37	38	29
11	46	42	36	36	44
12	46	42	35	41	51
13	48	40	34	36	23
14	46	39	32	38	25
15	46	45	38	38	28
16	44	40	34	37	26
Media	46.25	41.13	34.75	38.13	31.06

* Datos proporcionados por el INCAP.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca

TABLA No. 2.
PESO CORPORAL Y ALIMENTO INGERIDO EN LAS RATAS
CON DIETA DE CASEINA *

Rata No.	Peso inicial (gr).	Peso la. semana (gr).	Peso 2da. semana (gr).	Alimento ingerido la. semana (gr).	Alimento ingerido 2da. semana (gr).
1	56	83	109	93	98
2	56	82	111	100	103
3	56	81	103	90	90
4	56	80	106	93	96
5	56	82	108	100	102
6	56	86	113	98	109
7	56	75	96	81	89
8	56	83	108	92	106
9	56	85	115	96	109
10	56	81	104	94	102
11	56	84	108	95	110
12	56	78	102	90	99
13	56	88	107	99	111
14	56	72	104	88	97
15	56	87	112	100	82
16	56	86	114	100	98
Media	56	82.06	107.50	94.31	100.06

* Datos proporcionados por el INCAP.

TABLA No. 3
CONTENIDO DE PROTEINA EN EL HIGADO DE LAS RATAS *

No. RATA	CAS CONT	CAS FB	DLN CONT	DLN FB
1	39.49	74.95	69.11	37.52
2	85.38	82.65	73.76	74.50
3	102.89	72.31	73.85	95.51
4	101.26	68.95	66.39	-
5	89.06	52.95	56.84	68.56
6	105.17	92.75	83.26	75.64
7	96.65	66.64	74.86	82.58
8	84.43	71.97	79.22	79.70
TOTAL	704.33	583.17	577.29	514.01
MEDIA	88.04	72.90	72.16	73.43

* Resultados expresados en mg de proteína/g de hígado.
 CAS CONT = Grupo de ratas con dieta estándar de caseína.
 CAS FB = Grupo de ratas con dieta estándar de caseína e
 inyectadas con fenobarbital.
 DLN CONT = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno.
 DLN FB = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno e
 inyectadas con fenobarbital.

TABLA No. 4
ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA
EN EL HIGADO DE LAS RATAS (UNIDADES*/G DE HIGADO)

No.	RATA	CAS CONT	CAS FB	DLN CONT	DLN FB
1		26400.00	65600.00	58064.52	31617.65
2		48900.00	97066.67	54586.47	61470.59
3		69300.00	89650.00	75897.44	74198.47
4		63800.00	83733.33	67716.54	- **
5		55000.00	95066.67	59047.62	86488.55
6		60633.33	127600.00	81739.13	81481.48
7		56000.00	84266.67	69672.13	81551.72
8		60066.67	106133.33	68878.51	76800.00
Total		440100.00	749116.67	535602.36	493608.46

MEDIA	55012.50	93639.58	66950.30	70515.49
--------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

* Unidad es la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350 nm, de una mezcla de reacción que posea CDNB 1.25 mM y GSH 10 mM, durante 1 minuto, al incubar la mezcla a 30 °C.

** murió con la tercera dosis de fenobarbital.

CAS CONT = Grupo de ratas con dieta estándar de caseína.

CAS FB = Grupo de ratas con dieta estándar de caseína e inyectadas con fenobarbital.

DLN CONT = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno.

DLN FB = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno e inyectadas con fenobarbital.

TABLA No. 5
 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA
 EN EL HIGADO DE LAS RATAS (UNIDADES*/MG DE PROTEINA)

No. RATA	CAS CONT	CAS FB	DLN CONT	DLN FB
1	668.52	875.25	840.18	842.69
2	572.73	1174.43	740.06	825.11
3	673.53	1239.80	1027.72	776.87
4	630.06	1214.41	1019.98	-
5	617.56	1795.40	1038.84	1261.50
6	576.53	1375.74	981.73	1077.23
7	579.41	1264.51	930.70	987.55
8	711.44	1474.69	869.46	963.61
TOTAL	5029.78	10414.23	7448.67	6734.56
MEDIA	628.72	1301.78	931.08	962.08

* Unidad es la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350 nm, de una mezcla de reacción que posea CDNB 1.25 mM y GSH 10 mM, durante 1 minuto, al incubar la mezcla a 30 °C.

CAS CONT = Grupo de ratas con dieta estándar de caseína.

CAS FB = Grupo de ratas con dieta estándar de caseína e inyectadas con fenobarbital.

DLN CONT = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno.

DLN FB = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno e inyectadas con fenobarbital.

TABLA No. 6
ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTATION S-TRANSFERASA EN
EL PLASMA DE LAS RATAS (UNIDADES*/ML DE PLASMA).

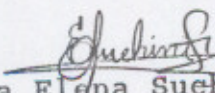
No. RATA	CAS CONT	DLN CONT	DLN FB
1	755	1300	550
2	725	1500	600
3	825	1025	550
4	850	575	-
5	725	825	600
6	850	450	550
7	750	475	600
8	675	875	650
TOTAL	6155	7025	4100
MEDIA	769.38	878.13	585.71

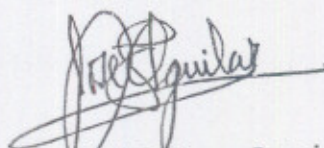
* Unidad es la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.001 en la absorbancia, a 350 nm, de una mezcla de reacción que posea CDNB 2.4 mM y GSH 2.4 mM, durante 1 minuto, al incubar la mezcla a 30 °C.

CAS CONT = Grupo de ratas con dieta estándar de caseína.

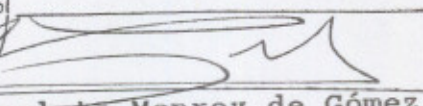
DLN CONT = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno.

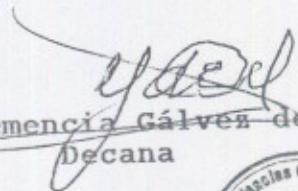
DLN FB = Grupo de ratas con dieta libre de nitrógeno e inyectadas con fenobarbital.


Aura Elena Sueñini Farfán
Autora


Dr. José Héctor Aguilar
Asesor




M^{ra} Dr. Carlota Monroy de Gómez
Directora Escuela de Biología


Licda. Clemencia Gálvez de Avila
Decana

