



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



EFFECTO DEL ETILPIRUVATO EN EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO MEDIANTE  
LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE  $\text{CCl}_4$  EN LA RATA

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO FARMACÉUTICO**

PRESENTA:  
LESLIE OYUKI CISNEROS GIL

Director de proyecto externo: Dr. Pablo Muriel de la Torre

Director de proyecto interno: M.C. Yolanda Gómez y Gómez

MAYO 2007

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>El hígado</b>	<b>5</b>
Funciones del hígado	8
Enfermedades del hígado	9
Esteatosis	10
Hepatitis alcohólica	10
Cirrosis	10
Causas	11
Síntomas	12
Complicaciones de la cirrosis	13
<b>El tetracloruro de carbono</b>	<b>14</b>
<b>El factor de transcripción NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>15</b>
<b>El Etilpiruvato</b>	<b>17</b>
Antecedentes	17
Posible mecanismo de acción	18
<b>Marcadores de daño hepático</b>	<b>19</b>
Alanino aminotransferasa	19
Fosfatasa alcalina	19
$\gamma$ -glutamil transpeptidasa	20
Glucógeno	20
Peroxidación lipídica	20
Glutación reducido y oxidado	21
Colágena	21
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>22</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL</b>	<b>24</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>24</b>
<b>Marcadores de Daño Hepático</b>	<b>26</b>
Actividad enzimática de la ALT	26
Actividad enzimática de la FA	28
Actividad enzimática de la $\gamma$ -GTP	29
Determinación del contenido de colágena (hidroxiprolina)	30
Determinación del grado de peroxidación lipídica	34
Determinación de proteínas (método de Bradford)	35
Determinación de GSH y GSSG en hígado	36
Determinación del contenido de glucógeno	38
<b>Actividad enzimática de la ALT</b>	<b>39</b>
<b>Actividad enzimática de la FA</b>	<b>40</b>
<b>Actividad enzimática de la <math>\gamma</math>-GTP</b>	<b>41</b>



---

Grado de peroxidación lipídica _____	42
GSH y GSSG en hígado _____	43
Contenido de colágena _____	45
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> _____	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES</b> _____	<b>49</b>
<b>RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS</b> _____	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS</b> _____	<b>51</b>

---

## RESUMEN

El etilpiruvato en previos experimentos ha demostrado tener propiedades anti-inflamatorias inhibiendo al NF- $\kappa$ B. Por lo que el objetivo del presente trabajo es la evaluación del efecto del etilpiruvato en ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> durante 8 semanas mediante los diferentes marcadores de daño hepático realizados durante el proyecto.

La administración de aceite mineral para nuestro grupo control se realizó tres veces por semana intraperitonealmente, al igual que la administración de CCl<sub>4</sub> para nuestro grupo de daño, y de prueba, es decir el grupo al cual se le administro CCl<sub>4</sub> más etilpiruvato. El etilpiruvato se administró vía oral y diariamente durante las 8 semanas, cabe mencionar que al último grupo, él de etilpiruvato, también se le administró aceite mineral por la misma vía que el grupo control.

En hígado se determinó la presencia de glutatión oxidado y reducido, que nos indican si hay o no estrés oxidativo citosólico, también se comprobó el grado de peroxidación lipídica que demuestra estrés oxidativo a nivel membranal, así como las concentraciones de glucógeno que revela una insuficiencia hepática, y la de colágena las cual nos dice si hay fibrosis presente en el hígado. En suero se determino la actividad enzimática de la alanino amino tranferasa presente principalmente en el citosol de las membranas y la cual nos indica si se produjo necrosis. La presencia de fosfatasa alcalina y de gamma-glutamil transpeptidasa, son marcadores de colestasis, ya que están ubicadas en la pared membranal del canalículo biliar.

El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStar® versión 2.1 y para corroborar las diferencias significativas entre las pruebas se hizo una prueba de Tukey.

Los resultados muestran que efectivamente se produjo fibrosis en el grupo tratado con CCl<sub>4</sub>. Así mismo, se observa una ligera insuficiencia hepática en los mismos grupos, aunque no se presentaron diferencias significativas. La necrosis hepática aumenta tras la administración de etilpiruvato, ya que se observó una diferencia significativa en ese grupo con respecto al grupo control.

En la prueba de fosfatasa alcalina se observó que con ayuda del etilpiruvato, la colestasis presente en el grupo de daño disminuye significativamente. Al medir el grado de peroxidaciól lipídica en los cuatro grupos, no se presentaron diferencias significativas entre ellos.

En la prueba de glutatión en hígado tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos, solo una ligera tendencia a disminuir el glutatión reducido con la presencia de etilpiruvato, esta tendencia nos lleva a pensar que el etilpiruvato está funcionando como antioxidante ya que no permite que el glutatión oxidado aumente, es decir, está previniendo que se oxide el glutatión reducido.

Por otro lado el etilpiruvato no tuvo la capacidad para prevenir la fibrosis, ni la necrosis presentes en los hígados de las ratas administradas con  $\text{CCl}_4$ , ya que aunque hubo diferencias entre los grupos, estas no fueron significativas.

---

## INTRODUCCIÓN

### El hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo, y también se considera la glándula mayor del organismo, en un adulto pesa aproximadamente 1.5kg (1). Se sitúa debajo de las costillas bajo el pulmón derecho y el diafragma. Está formado por dos lóbulos que los divide el ligamento falciforme en derecho e izquierdo, este último mucho menor (una sexta parte) que el primero. El lóbulo derecho a su vez se divide en: lóbulo cuadrado situado en la superficie inferior, y el lóbulo caudado, que se aprecia en la superficie posterior. El hígado es irrigado por dos sistemas vasculares: el de la arteria hepática, que transporta sangre oxigenada que viene del tronco celíaco, y el de la vena porta, que conduce sangre desoxigenada procedente del tubo digestivo, páncreas y del bazo, la cual contiene nutrientes, toxinas, bacterias y en ocasiones fármacos. El flujo sanguíneo en el hígado es aproximadamente de 1500ml de sangre por minuto (2).

La arquitectura hepática, desde el punto de vista microscópico, está formada por un sistema de lobulillos piramidales en cuyo centro se encuentra una vena central, tributaria de las venas hepáticas, y en cuya periferia se localizan varias tríadas portales constituidas por una rama de la vena porta, una de las arterias hepáticas y un conductillo biliar (3). Entre las venas centrales y las tríadas portales se encuentran las células hepáticas, organizadas en columnas o placas y bañadas parcialmente por la sangre de los sinusoides hepáticos.

La función digestiva del hígado consiste en producir bilis, una secreción verde amarillenta, al duodeno. La bilis se fabrica en el hígado y se deposita en la vesícula biliar, que la libera cuando penetra grasa en el duodeno. La bilis emulsiona las grasas y la distribuye por el intestino distal para su digestión y absorción posteriores (1).

El hígado presenta cinco diferentes componentes celulares, los cuales abarcan el 80% de su volumen aproximadamente, ya que el 20% restante es ocupado por los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular. Los hepatocitos (células parenquimatosas) son las células de más importancia por su tamaño y volumen ocupado, casi las dos terceras partes del hígado, y estos llevan a cabo las funciones metabólicas que realiza el hígado.

Cuando se observa a través del microscopio electrónico, se aprecian con claridad, las microvellosidades que perfilan la membrana a nivel de las superficies sinusoidal y

---

canalicular; los desmosomas que unen un hepatocito con otro; el núcleo; numerosas mitocondrias, que son sitios de realización de procesos energéticos, el retículo endoplásmico liso, constituido por túmulos y vesículas, y sitio de conjugación de la bilirrubina, de síntesis de esteroides y de desintoxicación de innumerables fármacos y compuestos endógenos y exógenos; los lisosomas, organillos densos pericaniculares que contienen enzimas hidrolíticas y son sitios de depósito de ferritina, lipofucsina, pigmento biliar y cobre, el aparato de Golgi, entre otros. (4)

Los otros cuatro tipos celulares se denominan sinusoidales o no parenquimatosas, y éstas son: las células de Kupffer, de Pit, de Ito (estelares, estrelladas o almacenadoras de grasa) y las endoteliales (Fig. 1).

La principal función de las células de Kupffer, es de fagocitar eritrocitos envejecidos y otros antígenos como: toxinas, fármacos o microorganismos que puedan destruir al hepatocito, se adhieren fuertemente a las células endoteliales. Cuando fagocitan estas secretan prostaglandinas y citocinas presentes en los procesos inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ), entre otras. Las células de Pit, llamadas "*natural killer*", que son las únicas células asesinas en el hígado, se encuentran adheridas al sinusoides.

Las células estelares se localizan en el sinusoides, fungen como lipocitos y reservorios de vitamina A. Cuando se presenta un daño tisular en el hígado, estas células sufren un cambio morfológico y empiezan a sintetizar colágena, si no se detiene esta síntesis se presenta fibrogénesis (Fig. 2).

Las células endoteliales tienen una función de filtración, se encuentran en la membrana de los sinusoides, alineadas entre si y separadas; estos espacios entre célula y célula, son llamados fenestraciones que miden aproximadamente 100nm, por lo cual no permiten el paso de macromoléculas, o de proteínas desnaturalizadas o dañadas que atenten contra el hepatocito. El diámetro de las fenestraciones se ve influenciado por la presión sanguínea luminal, la presencia de sustancias vasoactivas, fármacos y toxinas.

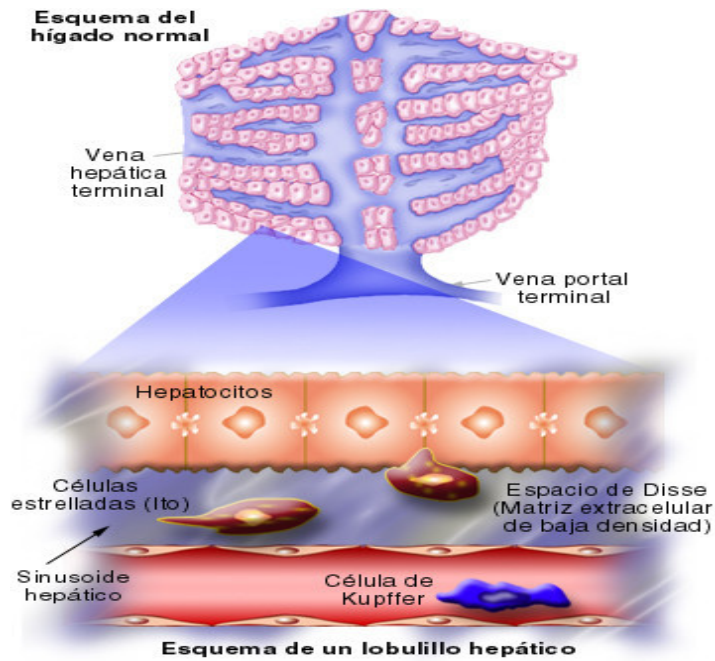


Figura 1. Componentes celulares hepáticos.

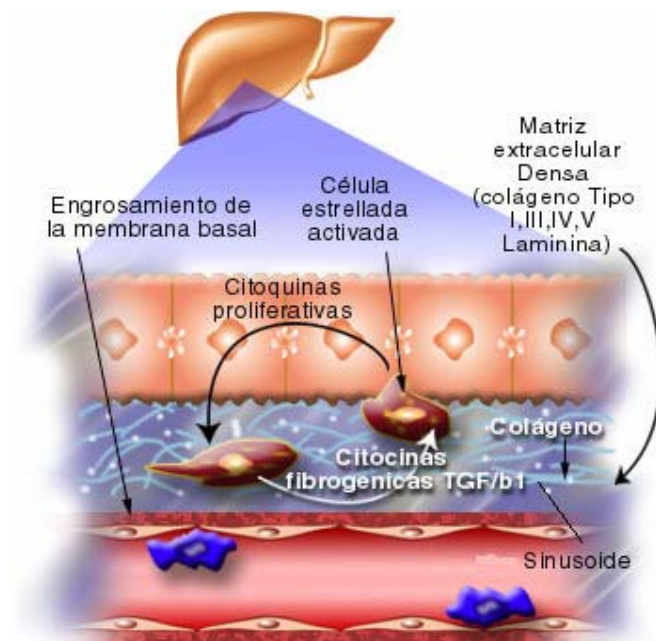


Figura 2. Componentes celulares hepáticos cuando hay daño tisular.





---

## Funciones del hígado

El hígado interviene en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo (cuadro 1), es quien recibe los productos finales de la absorción de carbohidratos, proteínas y grasas, para transformarlas en sustancias más complejas que han de servir en el funcionamiento normal del organismo. Controla la producción y secreción de bilis, regula concentraciones plasmáticas de moléculas que son parte fundamental del metabolismo del cuerpo, fagocita sustancias del torrente sanguíneo, y es el principal sitio de transformación de los fármacos (5).

Cuadro 1. Principales funciones metabólicas del hígado.

---

### Anabolismo

- a. Conservación de la glucosa sanguínea
  1. Glucógenolisis
  2. Gluconeogénesis
- b. Síntesis de proteínas
  1. Albúmina
  2. Proteínas de la coagulación
  3. Fibrogéno, haptoglobina, ceruloplasmina, etc.
- c. Metabolismo de los lípidos
  1. Captación de los ácidos grasos libres del plasma y su conversión a triglicéridos
  2. Síntesis y liberación de lipoproteínas
  3. Síntesis de colesterol y producción de acil transferasa de la lecitina del colesterol
  4. Síntesis de las sales biliares.

### Catabolismo

- a. Conjugación, solubilización y desaminación de fármacos y drogas.
- b. Conjugación de la bilirrubina
- c. Conversión del amoniaco en urea
- d. Catabolismo de los esteroides

### Almacenamiento

- a. Vitaminas A, D, K y B<sub>12</sub>
- b. Metales: hierro y cobre

---

Fuente: Academia nacional de medicina. *Tratado de medicina interna* (1993), 2ed, Vol. 1

Las funciones del hígado caen generalmente dentro de alguna de las siguientes categorías:



- 
- a) Almacenamiento. Como en el caso de la grasa, algunas vitaminas como la A, la B<sub>12</sub>, algunos minerales como el fierro y carbohidratos en forma de glucógeno; cuando todas estas sustancias se encuentran en exceso, el hígado, es capaz de almacenarlas y regresarlas a la circulación cuando disminuyen o son requeridas por otro tejido.
  - b) Transformaciones y conjugaciones. Las sustancias que deben llegar a nuestras células deben a su vez ser las más adecuadas para su buen funcionamiento, así pues el hígado es responsable de eliminar o transformar dichas sustancias manteniendo una composición adecuada de la sangre: por ejemplo, metaboliza el amoníaco que es muy tóxico en urea, la cual es eliminada a su vez por los riñones, transforma carbohidratos en aminoácidos y viceversa; por medio de la bilis, transforma los quilomicrones provenientes del intestino en los distintos componentes de las grasas; degrada y excreta algunas hormonas como los esteroides, así como numerosos fármacos y drogas. Cabe resaltar que la hemoglobina liberada por la destrucción de los glóbulos rojos viejos es transformada en bilis y otros pigmentos que son excretados en la orina los cuales le dan su color característico.
  - c) Síntesis. El hígado produce numerosas proteínas de la sangre cuya función puede ser muy variada: fibrinógeno y protrombina para la coagulación, albúmina para el mantenimiento de la presión oncótica de la sangre, etcétera (6).

## **Enfermedades del hígado**

### **Hepatitis viral**

La inflamación hepática (hepatitis) puede ser causada por agentes virales o sustancias tóxicas. Se han identificado cinco virus que se multiplican en las células hepáticas que varían en cuanto a las vías de transmisión y los efectos a largo plazo que causan.

En el caso de la hepatitis A, el virus que la causa se encuentra en las heces de personas infectadas. Generalmente se transmite al comer alimentos que han sido contaminados con excrementos de personas infectadas. Se dice que este tipo de hepatitis es benigno, pues no causa enfermedad crónica. La mejor forma de prevenirla es mediante la vacuna contra la hepatitis A.

---

Los virus de la hepatitis B y C son los causantes de más del 80 por ciento de casos de cáncer hepático. Entre 55 % y 85% de personas con hepatitis C desarrollan infección crónica, mientras 6% de los infectados después de los 5 años padecen de efectos a largo plazo. Ambos virus se transmiten a través de sangre contaminada, sin embargo el virus de la hepatitis B también se encuentra en el semen y fluidos vaginales. Para la hepatitis B existe una vacuna muy eficaz que la previene, pero no hay vacuna disponible para prevenir la hepatitis C.

La hepatitis D solamente la pueden adquirir aquellas personas infectadas con hepatitis B, ya que el virus que causa la hepatitis D necesita del virus de la hepatitis B para multiplicarse. Por lo tanto, la única manera efectiva de prevenirla es vacunándose contra la hepatitis B.

Al igual que el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis D no causa efectos a largo plazo. Se transmite al consumir agua o comida contaminada con heces de personas infectadas con hepatitis D (7).

### **Hepatitis alcohólica**

La enfermedad hepática alcohólica puede clasificarse histológicamente en tres formas(8):

#### **Esteatosis**

Se observa acumulación de grasa macro o microvesicular en el citoplasma de los hepatocitos. Pueden observarse además, megamitocondrias, que reflejan el daño mitocondrial que produce el etanol.

#### **Hepatitis alcohólica**

La hepatitis alcohólica produce un cuadro histológico indistinguible de la esteatohepatitis no alcohólica. Además de la esteatosis, se observa balonamiento y necrosis de hepatocitos, infiltración por neutrófilos en el lobulillo, cuerpos de Mallory e inflamación perivenular central, con grados variables de fibrosis en esta zona del lobulillo.

#### **Cirrosis**

La cirrosis, con formación de nódulos de regeneración delimitados por bandas de tejido colágeno, es progresión de la fibrosis que se inicia en la zona perivenular central. Una vez constituida, su apariencia histológica es similar a la de la cirrosis, sin embargo, la presencia de esteatosis o cuerpos de Mallory pueden sugerir fuertemente la etiología.

---

## Cirrosis Hepática

La cirrosis suele desarrollarse muy lentamente y no producir síntomas hasta etapas muy avanzadas. Aunque este padecimiento se asocia con el consumo excesivo de alcohol, cada vez son menos frecuentes las cirrosis alcohólicas y se han incrementado los casos debidos a infecciones virales -hepatitis-, enfermedades autoinmunes, deficiencias metabólicas o exposición prolongada a drogas o fármacos hepatotóxicos.

La cirrosis se ubica entre las principales causas de muerte en el país. Sin embargo, esto se debe principalmente a la reducción de la mortalidad por infecciones agudas, ya que la tendencia de las muertes por cirrosis es claramente descendente con una reducción dos veces más intensa en los hombres (9). En la cirrosis del hígado, el tejido normal y sano es reemplazado por un tejido cicatrizal que bloquea el flujo de sangre a través del órgano e impide que trabaje como debería.

### Causas

Son diferentes y varias las causas de una cirrosis hepática (10):

**Enfermedad del hígado por alcoholismo.** Para muchas personas, la cirrosis del hígado es sinónimo de alcoholismo crónico, pero en realidad, el alcoholismo es sólo una de las causas. La cirrosis alcohólica generalmente se desarrolla después de más de una década de beber en exceso. La cantidad de alcohol que puede dañar el hígado varía mucho de una persona a otra. En las mujeres, tan sólo dos o tres vasos de bebida al día han sido asociados con daños al hígado, y en los hombres, sólo tres a cuatro tragos al día. El alcohol parece lesionar el hígado al bloquear el metabolismo normal de las proteínas, las grasas y los carbohidratos.

**Hepatitis C crónica.** El virus de la hepatitis C es, junto con el alcohol, una de las principales causas de enfermedad hepática crónica y cirrosis en la actualidad. La infección con este virus causa inflamación del hígado y lo daña levemente, lo que al pasar varias décadas puede derivar en cirrosis.

**Hepatitis B y D crónica.** El virus de la hepatitis B probablemente sea la causa más común de cirrosis al nivel mundial. La hepatitis B, como la hepatitis C, causa inflamación y daños al hígado que tras varias décadas pueden derivar en cirrosis. El virus de la hepatitis D es otro virus que infecta al hígado, pero sólo a personas que ya tienen hepatitis B.

**Hepatitis autoinmune.** Este tipo de hepatitis parece ser causado cuando el sistema inmunitario ataca al hígado causando inflamación, daño y eventualmente cicatrizaciones y cirrosis.

---

**Enfermedades hereditarias.** La deficiencia de alfa-1 antitripsina, la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, la galactosemia y las enfermedades por almacenamiento de glucógeno son algunas de las enfermedades que interfieren con la manera en que el hígado produce, procesa y almacena enzimas, proteínas, metales y otras sustancias que el organismo necesita para funcionar bien.

**Esteatohepatitis no alcohólica.** (NASH, por sus siglas en inglés). En esta enfermedad, se acumula grasa en el hígado que con el tiempo produce tejido cicatrizal. Este tipo de hepatitis parece estar asociado con la diabetes, la malnutrición por falta de proteínas, la obesidad, la enfermedad de las arterias coronarias y el tratamiento con medicamentos corticoesteroides.

**Conductos biliares taponados.** Cuando se taponan los conductos que llevan la bilis del hígado, la bilis se acumula y causa daños al tejido del hígado. En los bebés, los conductos biliares taponados muchas veces se deben a la atresia biliar, una enfermedad en la que los conductos biliares están ausentes o lesionados. En los adultos, la causa más común es la cirrosis biliar primaria, una enfermedad en la cual los conductos se inflaman, taponan y llenan de cicatrices. La cirrosis biliar secundaria puede ocurrir después de una operación de vesícula, si los conductos se cierran o lesionan accidentalmente.

**Medicamentos, toxinas e infecciones.** Algunas reacciones graves a los medicamentos recetados, una exposición prolongada a toxinas ambientales, la infección de parásitos llamada esquistosomiasis y repetidos ataques de insuficiencia cardíaca con congestión hepática pueden todas llevar a la cirrosis.

### **Síntomas**

El principio de la cirrosis es por lo general silencioso siendo muy pocos los síntomas específicos. A medida que se acumula el daño en el hígado, pueden aparecer los siguientes síntomas (11):

- Pérdida de apetito.
- Malestar general.
- Náusea y vómitos.
- Pérdida de peso.
- Hepatomegalía: agrandamiento del hígado.
- Encefalopatía o cambios del estado de conciencia, los que pueden ser sutiles (confusión) o profundos (coma).

---

## Complicaciones de la cirrosis

Cuando se presenta cirrosis, esto lleva consigo las siguientes complicaciones (10):

**Edema y ascitis.** Cuando el hígado pierde la capacidad de fabricar la proteína albúmina, se acumula agua en las piernas (edema) y en el abdomen (ascitis).

**Moretones y sangrado.** Cuando el hígado hace más lenta o detiene la producción de las proteínas necesarias para que la sangre coagule, la persona puede tener moretones o sangrar con facilidad. Las palmas de las manos pueden estar enrojecidas y moteadas con eritema palmar.

**Ictericia.** La ictericia es una coloración amarillenta de la piel y los ojos que ocurre cuando el hígado enfermo no absorbe suficiente bilirrubina.

**Picazón.** Los productos de la bilis depositados en la piel pueden ocasionar una picazón intensa.

**Cálculos biliares.** Si la cirrosis impide que la bilis llegue a la vesícula, la persona puede desarrollar cálculos biliares.

**Toxinas en la sangre o en el cerebro.** Un hígado dañado no puede eliminar las toxinas de la sangre, lo que hace que se acumulen en la sangre y con el tiempo en el cerebro. Allí, las toxinas pueden entorpecer el funcionamiento mental y producir cambios en la personalidad, coma y hasta la muerte. Algunos signos de la acumulación de toxinas en el cerebro son: descuido del aspecto personal, indiferencia, falta de memoria, dificultad para concentrarse y cambios en los hábitos de sueño.

**Sensibilidad a la medicación.** La cirrosis hace más lenta la capacidad del hígado de filtrar los medicamentos de la sangre. Debido a que el hígado no elimina los medicamentos de la sangre con la misma rapidez, éstos actúan por más tiempo y se acumulan en el cuerpo. Esto hace que la persona sea más sensible a los medicamentos y sus efectos secundarios.

**Hipertensión portal.** Normalmente, la sangre de los intestinos y del bazo es transportada al hígado por la vena porta. Pero la cirrosis hace que la sangre fluya más lentamente por la vena porta, lo que aumenta la presión dentro de esta vena. Esta afección se conoce como hipertensión portal.

**Várices.** Cuando el flujo de sangre por la vena porta se hace más lento, la sangre de los intestinos y del bazo se acumula en los vasos del estómago y del esófago. Estos vasos sanguíneos se agrandan porque no están preparados para llevar tanta sangre. Los vasos

---

sanguíneos agrandados, llamados várices, tienen paredes delgadas y la presión dentro de ellos es mayor, y por lo tanto son más propensos a reventar.

**Cáncer del hígado.** El carcinoma hepatocelular, un tipo de cáncer del hígado causado por la cirrosis, comienza en los mismos tejidos del hígado. Tiene un alto índice de mortalidad.

**Problemas en otros órganos.** La cirrosis puede hacer que el sistema inmunitario no funcione bien, lo que puede llevar a infecciones. La ascitis (líquido) en el abdomen puede infectarse con bacterias que se encuentran normalmente en el intestino. La cirrosis también puede causar impotencia, que los riñones no funcionen bien y fallen, y la osteoporosis (10).

### **El tetracloruro de carbono**

El uso de algunos alcanos halogenados, como el tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) o yodoformo ( $\text{CHI}_3$ ), ha sido prohibido y severamente restringido por su toxicidad. El  $\text{CCl}_4$ , en estos días, todavía continúa proporcionando un papel importante como modelo para elucidar el mecanismo de acción de efectos hepatotóxicos tales como esteatosis, fibrosis, muerte hepatocelular, y cáncer hepático. Dependiendo de la dosis, el tiempo de exposición y la edad del organismo afectado, se puede llevar a cabo la regeneración hepática y a la recuperación total del hígado. El  $\text{CCl}_4$  es activado por el citocromo (CYP) 2E1, CYP2B1 o CYP2B2 y posiblemente CYP3A, para formar el radical triclorometilo  $\text{CCl}_3$ . Este radical se puede unir a moléculas celulares (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos), afectando crucialmente a procesos celulares, como el metabolismo de lípidos, con el resultado potencial de degeneración lipídica (esteatosis). Además se piensa que la unión de  $\text{CCl}_3^*$  en el ADN funciona como iniciador del cáncer hepático. Este radical también puede reaccionar con el oxígeno para formar el radical peróxido de triclorometilo  $\text{CCl}_3\text{OO}^*$ , un compuesto altamente reactivo (12).

El  $\text{CCl}_3\text{OO}^*$  inicia la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, la cual ataca y destruye a ácidos grasos poliinsaturados, particularmente a los asociados con los fosfolípidos. Éste afecta la permeabilidad de mitocondrias, del retículo endoplasmático, y las membranas plasmáticas, dando como resultado la pérdida de calcio celular y de homeostasis, lo cual subsecuentemente contribuye al daño celular. Entre los productos de degradación de los ácidos grasos, se encuentran los aldehídos reactivos como el 4-hidroxinonenal, el cual se une fácilmente a los grupos funcionales de las proteínas e inhibe importantes actividades enzimáticas. La intoxicación con  $\text{CCl}_4$  también conduce a la

---

hipermetilación de componentes celulares; en el caso de ARN se piensa que el resultado se debe a la inhibición de la síntesis proteica, en los fosfolípidos juega un papel importante en la inhibición de secreción de lipoproteínas. Ninguno de estos procesos *per se* es considerado la última causa de muerte celular inducida por  $\text{CCl}_4$ ; más bien es por la combinación de estos procesos que se logra un resultado fatal, ya sea con una sola dosis alta, o dosis bajas por largos períodos de tiempo (12).

A nivel molecular, el  $\text{CCl}_4$  activa el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , el óxido nítrico (NO), el factor transformado de crecimiento (TGF)- $\alpha$  y  $-\beta$ , estos en los procesos celulares parecen dirigir a la célula primordialmente hacia la propia destrucción o fibrosis. El TNF- $\alpha$  provoca apoptosis, mientras que los TGFs parecen causar fibrosis, ya que son factores profibrogénicos. La interleucina (IL)-6, aunque es inducida por el TNF- $\alpha$ , tiene claramente un efecto antiapoptótico, junto con IL-10 contrarrestan la acción del TNF- $\alpha$ . Además ambas interleucinas tienen el potencial para iniciar la recuperación del daño hepático causado por el  $\text{CCl}_4$ . Varios de los procesos tóxicos antes mencionados pueden ser específicamente bloqueados con el uso de antioxidantes los cuales restauraran la metilación celular, y previniendo la pérdida de calcio. (12)

### **El factor de transcripción NF- $\kappa$ B**

El NF- $\kappa$ B es un grupo de proteínas que regulan los genes latentes que participan en la mayoría de las respuestas inflamatorias. Estas respuestas ocurren como reacción a una infección o un daño tisular y ayudan a proteger las células afectadas cuando esta respuesta se torna excesiva o inapropiada; sin embargo, las respuestas inflamatorias pueden también dañar al tejido. Hay dos citocinas especialmente importantes para inducir respuestas inflamatorias: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), y la interleucina 1 (IL-1). Ambas son producidas por el sistema inmune innato, tales como las células de Kupffer, en respuesta a un daño tisular. Estas citocinas proinflamatorias se unen a receptores situados en la superficie celular y activan al NF- $\kappa$ B, el cual se encuentra secuestrado en forma inactiva en el citoplasma de casi todas nuestras células. Una vez activado, el NF- $\kappa$ B inicia la transcripción de más de sesenta genes conocidos que participan en respuestas inflamatorias. Por esta razón, la inhibición farmacológica del NF- $\kappa$ B abre un mundo de posibilidades terapéuticas en enfermedades como la artritis y en particular la cirrosis en las cuales la inflamación es un proceso predominante.



También hay que tener en cuenta al factor transformado de crecimiento beta TGF- $\beta$ , este factor profibrogénico, es regulado positivamente por el NF- $\kappa$ B (13).

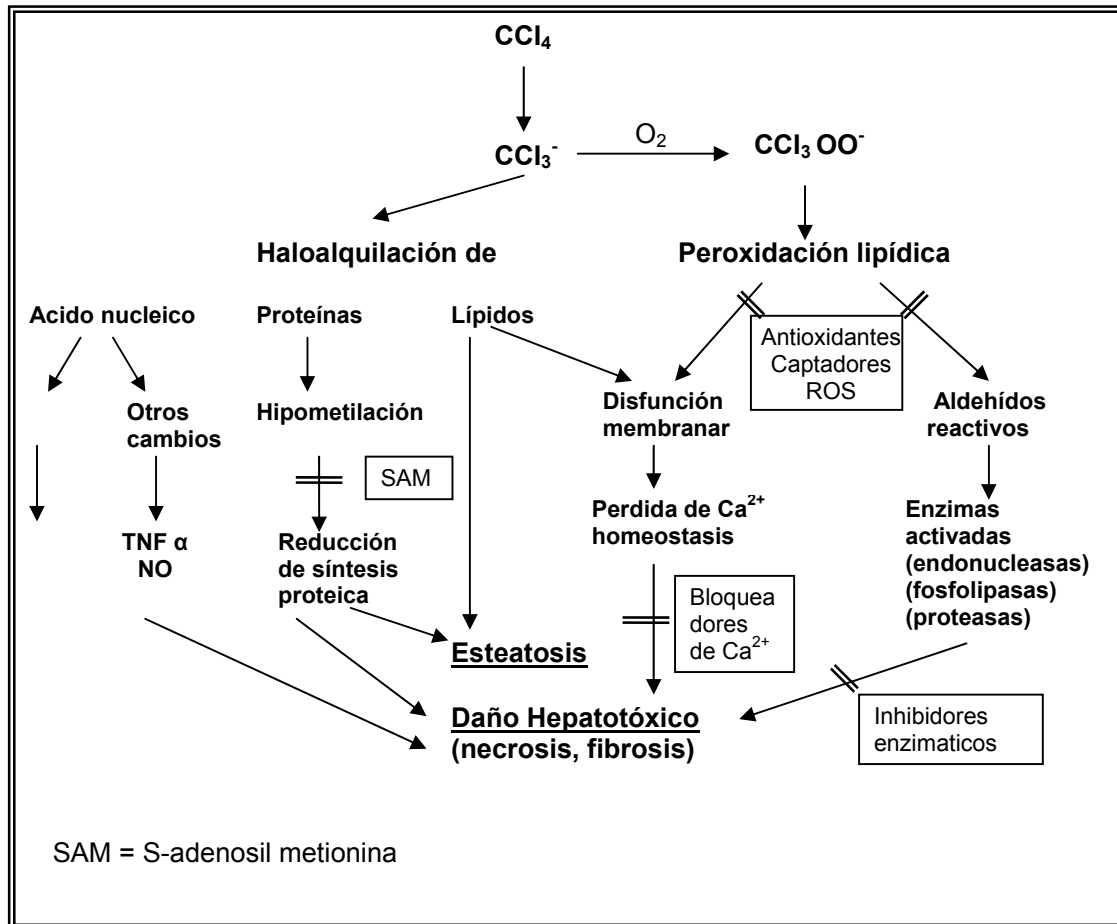


Figura 3. Mecanismo de acción del tetracloruro de carbono inducido en el daño hepático.

---

## El Etilpiruvato

El etilpiruvato es un éster alifático simple derivado del metabolito endógeno del ácido pirúvico (fig. 4).

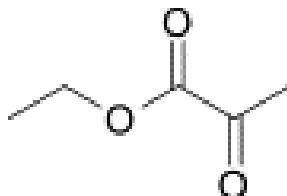


Figura 4. Molécula química del etilpiruvato.

### Antecedentes

La administración de piruvato, un efectivo captador de moléculas reactivas de oxígeno (14), ha demostrado ser beneficioso en numerosos modelos de tejido mediado por óxido-reducción o lesión de órganos. Sin embargo el piruvato es inestable en solución (15), y por lo tanto no es atractivo para ser usado como agente terapéutico. Ahora, el etilpiruvato (EP), se piensa que es más estable que el piruvato, por lo que en estudios previos se ha administrado, formulado previamente con solución salina balanceada con calcio y potasio, llamada “solución ringer de etilpiruvato” (REPS) y ha demostrado que modula la expresión de genes inflamatorios en ratones con choque hemorrágico y resucitación (14). En este experimento también demostró que los niveles de la enzima alanina-aminotransferasa son significativamente bajos con REPS que con una solución ringer de lactato (RLS).

El EP ha demostrado disminuir el daño hepático, renal o intestinal cuando es usado como un agente terapéutico en roedores sujetos a isquemia mesentérica y reperfusión (16,17), y choque hemorrágico (14,18). Además el etilpiruvato ha demostrado tener propiedades anti-inflamatorias en numerosos cultivos celulares y en estudios con animales, inhibiendo significativamente al NF-κB (19).

### Posible mecanismo de acción

Por la estructura química del EP, se piensa que puede actuar como un antioxidante o como un captador de especies reactivas de oxígeno (ROS) (14). Como ya se mencionó anteriormente el EP puede ser capaz de inhibir al NF- $\kappa$ B, por lo tanto disminuye la inflamación, esta a su vez la fibrogénesis y por último a la cirrosis hepática (Fig.5).

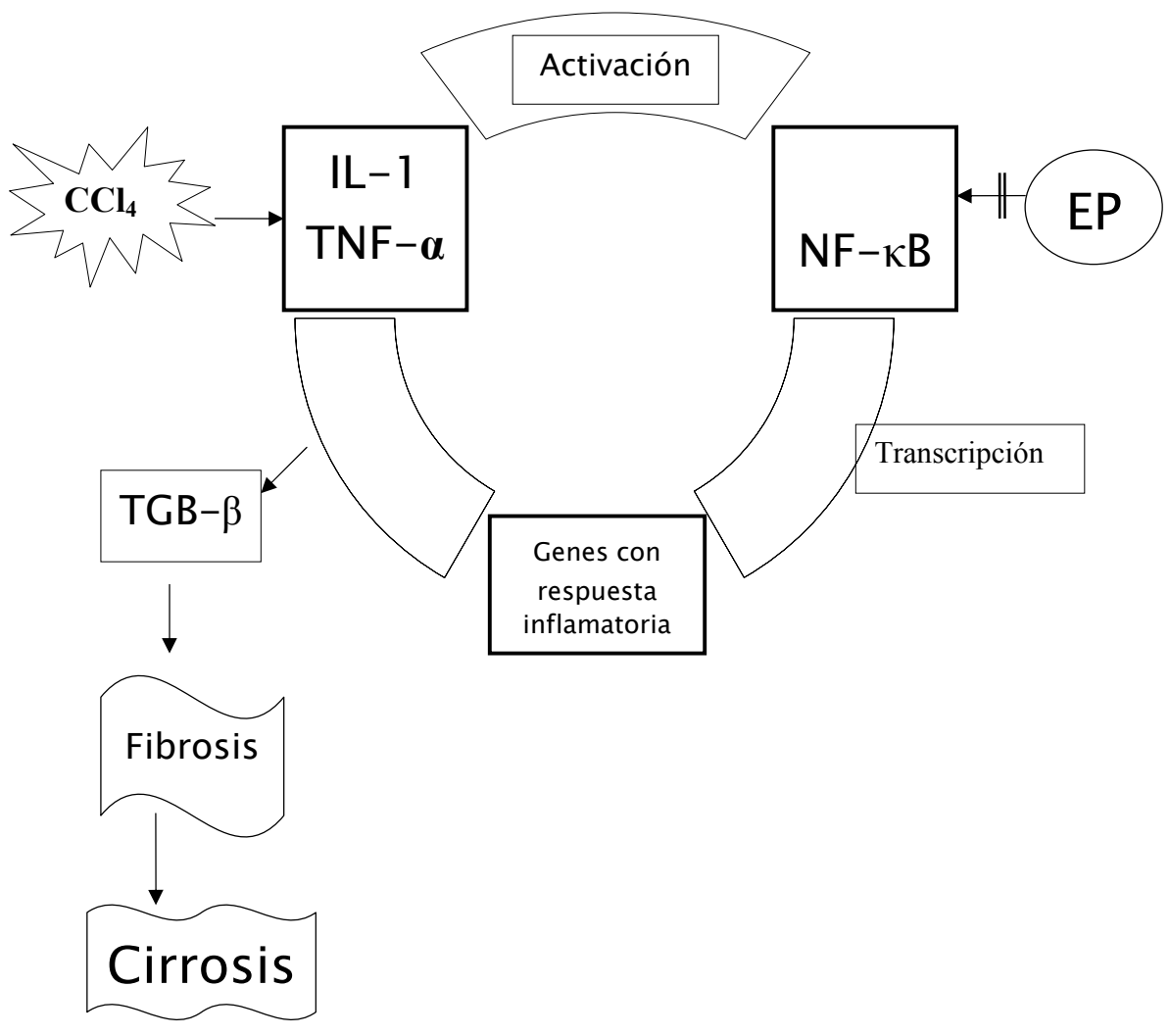


Figura 5. Posible mecanismo de acción del etilpiruvato.

---

## **Marcadores de daño hepático**

Hay una amplia variedad de pruebas de laboratorio disponibles para evaluar el daño y la funcionalidad hepática. Ninguna prueba es contundente para visualizar el daño, por ello es necesario evaluar diversos parámetros y realizar varias pruebas que detecten cambios fisiológicos en los niveles de actividad enzimática, metabolismo hepático o síntesis de algún componente celular.

### **Alanino aminotransferasa**

Las aminotransferasas séricas son indicadores sensibles del daño hepático y pueden reconocer padecimientos hepáticos agudos como la hepatitis. La alanino aminotransferasa (ALT, también llamada transaminasa glutámico pirúvica o TGP) es de las más utilizadas, puesto que fue de las primeras enzimas que se establecieron como marcadores de diagnóstico en el hombre y animales (20). La ALT cataliza la transferencia de grupos de  $\alpha$ -amino del aminoácido alanina y del ácido aspártico. La ALT está presente en varios tejidos pero se halla en altas concentraciones en hepatocitos. Esta enzima se localiza en la mitocondria y predominantemente en el citosol. Su concentración dentro de la célula es aproximadamente 10,000 veces mayor que en el plasma. Si se presenta un daño hepático por  $\text{CCl}_4$  hepático, la ALT citosólica migra al plasma una vez que la membrana ha sufrido daño y/o necrosis e incrementa su actividad dado el aumento de permeabilidad en la membrana celular (21).

### **Fosfatasa alcalina**

Dentro de las enzimas que detectan colestasis encontramos a las fosfatasas alcalinas (FA), que es el nombre dado a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de un largo número de ésteres de fosfato orgánicos a un pH óptimo alcalino. Una fuente importante de fosfatasas alcalinas es el hígado, en donde se halla en las membranas canaliculares de los hepatocitos. La prueba más común para determinar su actividad es realizando una reacción colorida que utiliza al p-nitrofenilfosfato como sustrato. La actividad de las FA se halla muy incrementada en pacientes con colestasis, obstrucción biliar y daño por  $\text{CCl}_4$ , por lo tanto, es la más usada para determinar tales padecimientos en la química clínica humana y animales (20, 21, 22).

---

### **$\gamma$ -glutamil transpeptidasa**

La  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GTP) es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo  $\gamma$ -glutamilo a otros péptidos y L-aminoácidos. La  $\gamma$ -L-glutamil-p-nitroanilida es la sustancia más comúnmente usada como sustrato para este ensayo con glicil-glicina como aceptor del grupo, dando una reacción colorida. La  $\gamma$ -GTP está presente en las membranas celulares de muchos tejidos, incluidos el hígado. Gran parte de la actividad plasmática normal de la  $\gamma$ -GTP se origina en el hígado. Esta enzima se encuentra en mayor abundancia en el dominio canalicular de la membrana plasmática del hepatocito; se produce a lo largo del tracto biliar íntegro, desde el canalículo biliar hasta el conducto biliar común (23,24). La  $\gamma$ -GTP se eleva cuando existen desórdenes hepáticos biliares, induciéndose su síntesis y es un indicador de colestasis (20,21).

### **Glucógeno**

El hígado actúa como el mayor almacén de carbohidratos en forma de glucógeno y juega un papel importante en el mantenimiento de la concentración de glucosa en sangre por medio de la gluconeogénesis y la glucogenólisis (20). El glucógeno hepático es cuantificado en muestras de hígado por medio de la técnica de la antrona, con la que reacciona en un medio ácido y desarrolla una reacción colorida. Durante el daño hepático la disfuncionalidad del órgano para sintetizar glucógeno es evidente y en pocas horas la cantidad de glucógeno hepático disminuye severamente.

### **Peroxidación lipídica**

El grado de peroxidación lipídica indica el daño ocasionado a las membranas celulares por la acción de los radicales libres y de la actividad detergente de los ácidos biliares en la colestasis (25). La peroxidación lipídica se determina cuantificando el malondialdehído (MDA) formado con el método del ácido tiobarbitúrico en homogenados de hígado.

---

## Glutati3n reducido y oxidado

El glutati3n es el principal tiol no prote3nico de las c3lulas en los mam3feros, est3 implicado en muchas funciones celulares. Este trip3ptido ( $\gamma$ -glutamil-L-cistenil-glicina) juega un papel central en la protecci3n de las c3lulas frente a los radicales libres e intermediarios reactivos de ox3geno. Existen dos formas qu3micas de glutati3n reducido (GSH) y glutati3n oxidado (GSSG). Presentar adecuadas concentraciones de glutati3n en el organismo nos ayuda a mantener, principalmente, un equilibrio 3ptimo en la eliminaci3n de radicales libres (efecto antioxidante), as3 como auxiliar para la desintoxicaci3n de las c3lulas del h3gado debido a que 3sta prote3na tiene una excelente capacidad de reaccionar con sustancias t3xicas (acetaminof3n, cobre, cadmio y paracetamol) y favorecer su eliminaci3n.

Las alteraciones en los niveles de GSH refleja una reducida defensa celular y sirve como marcador de estr3s oxidativo. La determinaci3n de los niveles de GSH y GSSG en h3gado y en sangre nos permite conocer el estado 3xido-reducci3n tanto a nivel sist3mico como en las c3lulas hep3ticas.

## Col3gena

La fibrosis es un proceso desencadenado por la fase aguda en un da3o hep3tico, la liberaci3n de citocinas induce la s3ntesis de matriz extracelular y un desbalance en la s3ntesis y degradaci3n de los componentes conduce finalmente a una excesiva deposici3n de col3gena en la cicatriz formada por el da3o. La col3gena contiene fibras polipept3dicas que se componen de diversos amino3cidos unidos, entre los que se encuentra la prolina e hidroxiprolina. La cuantificaci3n de hidroxiprolina por medio de una reacci3n con cloramina T y seguida de una reacci3n colorida con el reactivo de Erlich, habla de la cantidad de hidroxiprolina presente y proporcionalmente de la presencia de col3gena en la fibrosis desencadenada por el da3o hep3tico. Tambi3n la col3gena puede ser visible por m3todos convencionales de inclusi3n en parafina y posteriormente ser te3idos con la t3cnica tricr3mica correspondiente para su observaci3n al microsc3pio 3ptico.

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del etilpiruvato en la cirrosis hepática producida por la administración crónica de CCl<sub>4</sub> en la rata.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar la capacidad del etilpiruvato para prevenir la elevación de los marcadores de necrosis, colestasis y estrés oxidativo producida por la administración crónica de CCl<sub>4</sub>.

Determinar el efecto del etilpiruvato para prevenir la fibrosis hepática (determinada por la cuantificación de colágena) causada por la administración crónica de CCl<sub>4</sub>.

## **JUSTIFICACIÓN**

La cirrosis hepática es una de las diez causas de muerte más frecuentes en México. Este padecimiento es una enfermedad progresiva y fatal que se debe a la fibrosis del hígado, lo que conduce a graves alteraciones de su función metabólica y de su circulación sanguínea. Actualmente no se dispone de ningún método terapéutico eficaz para prevenir y menos para revertir este proceso.

El EP surge como una alternativa para prevenir este padecimiento, gracias a sus propiedades antioxidantes, y por su capacidad de inhibir al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual es responsable de la transcripción de más de 60 genes conocidos que participan en respuestas antiinflamatorias, uno de los productos de esta transcripción es el TGB- $\beta$ , principal causante del proceso fibrogénico lo que conlleva a desarrollar una cirrosis hepática.



## MATERIAL

1) Animales de experimentación:

- 50 ratas Wistar macho. Peso inicial: 100 g aprox.

2) Reactivos:

- Aceite mineral.
- Tetracloruro de Carbono
- EP
- Agua

## METODOLOGÍA

Se trabajó con los siguientes grupos durante 8 semanas:

Tabla 1. Grupos de animales de experimentación.

Grupo	N	Características.
1 Control	10	0.25 ml de Aceite mineral. Via intraperitoneal
2 Daño	15	CCl <sub>4</sub> (0.4g/kg). 3 veces por semana. Via intraperitoneal.
3 CCl <sub>4</sub> +EP	15	CCl <sub>4</sub> (0.4g/kg). 3 veces por semana. + EP (150mg/kg/día). Via Oral.
4 EP	10	EP (150mg/kg/día) Via Oral.

La proporción de  $\text{CCl}_4$  y aceite mineral fue la siguiente:

1ª semana 1:7 (1 parte de  $\text{CCl}_4$  por 7 partes de petrolato)

2ª semana 1:6 (1 parte de  $\text{CCl}_4$  por 6 partes de petrolato)

3ª semana 1:5 (1 parte de  $\text{CCl}_4$  por 5 partes de petrolato)

4ª semana 1:4 (1 parte de  $\text{CCl}_4$  por 4 partes de petrolato)

5ª semana 1:3 (1 parte de  $\text{CCl}_4$  por 3 partes de petrolato)

La proporción 1:3 se administró hasta completar las 8 semanas de tratamiento.

Una vez transcurridas las ocho semanas se sacrifican 6 ratas y se procede a la realización de las pruebas indicadoras de daño hepático, las cuales se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2. Marcadores de daño hepático y lo que detectan.

<b>Marcadores de daño hepático</b>	
<b>En hígado:</b>	<b>En suero:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Glutación oxidado (estrés oxidativo)</li><li>- Glutación reducido (estrés oxidativo citosólico)</li><li>- Peroxidación lipídica (estrés oxidativo membranal).</li><li>- Glucógeno (insuficiencia hepática)</li><li>- Colágena (fibrosis)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- ALT (necrosis).</li><li>- <math>\gamma</math>-GTP (colestasis)</li><li>- FA (colestasis).</li></ul>

## Marcadores de Daño Hepático

### Actividad enzimática de la ALT

Se siguió la técnica que a continuación se describe (26):

Se rotularon los tubos blancos y problema para cada muestra.

	BLANCO (mL)	PROBLEMA (mL)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Suero Problema	---	0.05
3.- Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37°C durante 60 min.		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Suero problema.	0.050	---
6.- Incubar a 37°C durante 15 minutos.		
7.- NaOH 0.4N	2.5	2.5
8.- Leer los tubos a 515nm.		

Tabla 3. Curva estándar para la ALT.

SOLUCIÓN	TUBO NÚMERO						
	1	2	3	4	5	6	7
Sustrato (μL)	250	225	200	75	150	125	100
Estándar de Piruvato (μL)	---	25	50	75	100	125	150
Amortiguadora de Fosfatos (μL)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μL)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4N (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
μmol de piruvato	---	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150



---

Reactivos.

Amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4. Mezclar 840mL de solución 0.1M de fosfato disódico con 160mL de solución 0.1M de fosfato monopotásico.

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

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

La solución que se prepara es 1mM.

Solución estándar de piruvato (1  $\mu\text{mol/mL}$ ): Disolver 11mg de piruvato sódico en 100mL de solución amortiguadora.

Se prepara el mismo día que se utiliza.

---

### Actividad enzimática de la FA

Se utilizó la siguiente técnica (27):

Se rotula un tubo blanco y los tubos problema.

En los tubos de ensayo la mezcla de reacción se compone de:

- 1.- 0.25mL amortiguadora de glicina 0.1M y  $MgCl_2$  1mM, pH 10.5
- 2.- 0.25mL de sustrato p-nitrofenilfosfato.
- 3.- Colocar en baño maría a 37°C por 5 minutos.
- 4.- Añadir 50 $\mu$ L de la muestra, mezclar suavemente.
- 5.- Incubar 30 minutos a 37°C.
- 6.- Parar la reacción con 5mL de NaOH 0.02N, agitar por inversión.
- 7.- Leer absorbancia a 410nm.

NOTA: El blanco es idéntico pero colocando 50 $\mu$ L de agua en lugar de muestra.

Preparación del sustrato:

100mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25mL de agua.

La actividad enzimática se determinó al interpolar los valores en una curva estándar de para-nitrofenol y se reporta en mol de sustrato hidrolizado por litro por minuto.

Tabla 4. Curva estándar de la FA

Tubo Número	Sol. 2 (mL)	Sol. 3 (mL)	$\mu$ mol de sustrato hidrolizado
1	0.5	5.0	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	2.0	3.5	0.100
4	3.0	2.5	0.150
5	4.0	1.5	0.200
6	5.0	1.0	0.250

Los tubos se leen a 410nm.

---

Soluciones:

1. p-nitrofenol solución estándar de 10 $\mu$ moles/mL.
2. 0.5mL de sol. (1) st. de p-nitrofenol llevado a 100mL con NaOH 0.02N.
3. NaOH 0.02N.

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

### **Actividad enzimática de la $\gamma$ -GTP**

De las dos mezclas de reacción que describen los autores (28), se utilizó la actividad estimulada con glicil-glicina, con un volumen total de reacción de 1ml.

En cada tubo poner :

400  $\mu$ l de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2

100  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 200 mM

100 $\mu$ l Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2

200  $\mu$ l Gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10 mM.

- Previa incubación por 10 minutos a 37°C, se inicia la reacción con 200  $\mu$ l de suero.
- Incubar a 37°C por 30 min. y se detiene la reacción con 2 ml de ácido acético 1.5 M.
- Se lee a 410 nm se cuantifica la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- Hacer un blanco sustituyendo los 200  $\mu$ l de suero por agua.

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

---

### **Determinación del contenido de colágena (hidroxiprolina)**

Se utilizó la siguiente técnica (29):

1. Se pesa 0.1g de hígado de rata previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
2. Se agregan 2mL de HCl 6N y se sellan con el mechero ó soplete, para posteriormente colocarlas a 100°C en el horno durante 24h.
3. Una vez hidrolizada la muestra, se rompe la ampolleta y se coloca nuevamente al horno a temperatura de 60-80°C aproximadamente 24h o hasta que seque.
4. La muestra ya seca se resuspende con 2mL de solución amortiguadora (Sol. I); se agita vigorosamente en el vórtex y se vacía en un tubo de ensaye, lavar la ampolleta con la adición de 1mL de la misma solución. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
5. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto, centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos, si se observa que el sobrenadante no queda claro repetir nuevamente este paso.
6. Se toma 1mL de este sobrenadante más 1mL de H<sub>2</sub>O y 1mL de cloramina T (Sol. 2). Se deja reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente. Hacer un blanco de reactivos.
7. Transcurridos los 20 min, adicionar 0.5mL de tiosulfato de sodio 2M, 1mL de NaOH 1N y aproximadamente 2g de NaCl. Agitar inmediatamente para detener la reacción.
8. Agregar 6mL de tolueno y agitar 1 minuto.
9. Se extrae la capa de tolueno y se desecha. La porción acuosa se cubre y se coloca a un baño hirviendo durante 20 minutos.
10. Los tubos se enfrían 15 minutos preferentemente en refrigerador. Ya fríos se les

---

adiciona 6mL de tolueno y se agitan durante 1 minuto.

11. De la fase de tolueno se toman alícuotas por duplicado de 1mL y se les agrega 4mL del reactivo de Ehrlich, agitar fuertemente.
12. Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, leer a 560nm.

Reactivos:

Solución 1. Buffer acetato de sodio - ácido cítrico, pH = 6.

Solución amortiguadora (Relación para un litro de amortiguador).

50g de ácido cítrico.

120g de acetato de sodio (3H<sub>2</sub>O).

34g de hidróxido de sodio.

15mL de ácido acético glacial.

El amortiguador se mantiene a 4°C y es estable por meses.

Solución 2. Solución de cloramina T (Cloramine T). Relación para 10 mL.

Se pesan 0.141g de cloramina T, se mezclan con 2mL de agua destilada, 3mL de etilenglicol y 5mL de solución amortiguadora. Esta solución debe prepararse en el momento de ser usada.

Solución 3. Reactivo de Ehrlich.

a) Se toman 27.4mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se agregan lentamente a 200mL de alcohol absoluto en un vaso sobre hielo.

b). Se pesan 120g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disuelven en 200mL de alcohol absoluto.

\*La mezcla ácido-etanol (a) se agrega lentamente y con agitación a la solución (b) en hielo, el recipiente debe estar cubierto con papel aluminio. Agitar durante 15 minutos y sacar del hielo, seguir agitando hasta que se disuelva.

\*La solución puede almacenarse a 4°C por varias semanas.

\*Los cristales que precipitan por el enfriamiento se disuelven calentando en baño



maría la solución y agitándola.

Solución 4. Solución de ninhidrina:

Pesar 2.50g de ninhidrina, disolverlos en 60mL de ácido acético glacial y 40mL de ácido fosfórico 6N.

Para realizar la curva de calibración de hidroxiprolina se prepara la siguiente solución y se sigue la tabla 7.

10mg (76.26 $\mu$ mol) de hidroxiprolina (HP) se llevan a un volumen de 76.26mL, lo que nos da una solución cuya concentración es de 1 $\mu$ mol/mL = 1nmol/ $\mu$ L.

Tabla 5. Curva estándar de hidroxiprolina.

TUBO	HP $\mu$ L	H <sub>2</sub> O ML	HP NMOLES
1	10	1.99	10
2	20	1.98	20
3	50	1.95	50
4	70	1.93	70
5	100	1.90	100
6	150	1.85	150
7	200	1.80	200
8	300	1.70	300
9	400	1.60	400
10	500	1.50	500
B	--	2.00	--

1. Se colocan en un tubo con rosca y tapón, se les adiciona 1mL de cloramina T. Se dejan reposar 20 minutos a temperatura ambiente.
2. Pasados los 20 minutos se detiene la reacción por la adición de 500  $\mu$ L de tiosulfato de sodio 2M, con 1mL de NaOH 1N y con aproximadamente 2g de NaCl. Agitar inmediatamente (de esto depende que se detenga la reacción).
3. Agregar 6mL de tolueno a cada muestra y agitar durante 1 minuto.
4. Se extrae la capa de tolueno, se desecha y el contenido acuoso se cubre con su respectivo tapón y se coloca en un baño hirviendo durante 20 minutos.



- 
5. Se enfrían los tubos y nuevamente se les agregan 6mL de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
  
  6. Tomar por duplicado una alícuota de 1mL de la fase de tolueno y mezclar con 4mL de reactivo de Ehrlich y agitar vigorosamente.
  
  7. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos para que desarrolle color. Leer en espectrofotómetro a 560nm

---

## Determinación del grado de peroxidación lipídica

Esta técnica se basa en el método del ácido tiobarbitúrico (30).

Reactivos:

- Tris HCl 150mM pH=7.4
- Ácido Tricloroacético (TCA) al 15%
- Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (Se prepara en el momento la cantidad necesaria)

Procedimiento:

- Pesar 0.5g de hígado.
- Homogenizar en 5mL de agua.
- Tomar 300µL del homogenado al 10% y agregar 700µL de Tris-HCl 150mM para completar 1mL.
- Incubar a 37°C por 30 minutos.
- Agregar 2mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15%.
- Poner a ebullición por 45 minutos.
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos y leer el sobrenadante a 532nm.

Cálculos:

$$C = \frac{A}{\xi I}$$

Donde:

A Es la absorbancia de la muestra

I Es la longitud de la celda (1cm para el Shimadzu UV-1203)

$\xi$  Es el coeficiente de extinción del Malondialdehído (MDA)= $1.56 \times 10^5 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ .

- Hacer una dilución 1:10 del homogenado y tomar 20µL para determinar proteínas.

- Expresar como nmoles de MDA/mg proteína.

---

## Determinación de proteínas (método de Bradford)

### Reactivos:

- Acido fosfórico al 85%      100mL
- Alcohol etílico              50mL
- Azul de coomasie G-250    100mg
- Aforar a un litro con agua.

### Técnica:

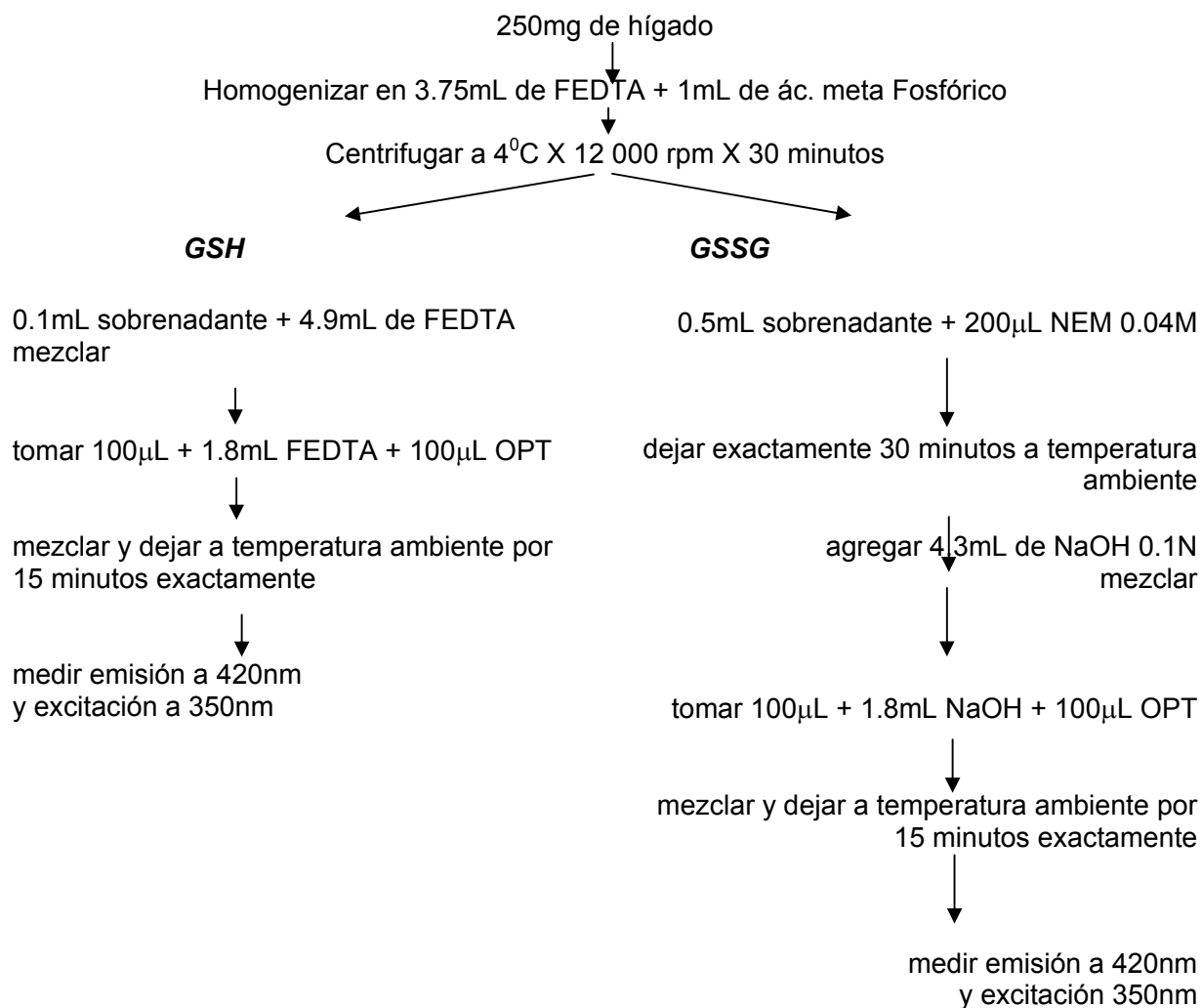
- 1) Se toman 100 $\mu$ L del homogenado y se lleva a 1000 $\mu$ L el agua tridestilada.
- 2) Tomar alícuotas para proteínas y llevarlas a 100 $\mu$ L con agua (20 $\mu$ L de la dilución anterior + 80 $\mu$ L de agua tridestilada).
- 3) El blanco se prepara poniendo 100 $\mu$ L de agua.
- 4) Añadir 2.4mL del reactivo.
- 5) Leer absorbancia a 595nm.
- 6) Se prepara una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1mg/mL).

Poniendo 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 $\mu$ L.

- 7) Completar con agua a 100 $\mu$ L.

## Determinación de GSH y GSSG en hígado

Se llevó a cabo la siguiente técnica (31):



Reactivos:

- a) Amortiguador de fosfatos-EDTA (FEDTA).- fosfato de sodio monobásico 0.1M + EDTA 0.005M. Ajustar el pH=8.
- b) GSH 20μg/mL en FEDTA
- c) GSSG 20μg/mL en NaOH 0.1N
- d) o-ftaraldehído (OPT) 1mg/ml, pesar solamente la cantidad necesaria y disolver en metanol absoluto. Se prepara en el momento.
- e) Acido fosfórico 25%

f) N-etilmaleimida 0.04M en agua.

g) NaOH 0.1N

Para realizar las curvas estándar de GSH y GSSG se siguen las siguientes tablas:

Técnica GSH

Tabla 6. Curva estándar de GSH.

<b>TUBO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
GSH (µg)	0	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5
GSH (µL)	0	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25
FEDTA (mL)	1.90	1.895	1.8925	1.890	1.8875	1.885	1.8825	1.88	1.8775	1.875
OPT (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezclar bien y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos										
Obtener la intensidad de fluorescencia a 350nm de excitación y 420nm de emisión										

Técnica **GSSG**

Tabla 7. Curva estándar GSSG.

<b>TUBO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
GSSG (µg)	0	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.1
GSSG (µL)	0	5	10	20	25	30	35	40	45	55
NaOH (mL)	1.90	1.895	1.890	1.880	1.875	1.870	1.865	1.860	1.855	1.845
OPT (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezclar bien y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos										
Obtener la intensidad de fluorescencia a 350nm de excitación y 420nm de emisión										



---

### Determinación del contenido de glucógeno

Se cuantifico por la siguiente técnica (32):

- 1) Pesar 0.5g de hígado en tubos de tapón esmerilado, adicionarles 1.5mL de KOH al 30%, taparlos y hervir en baño de agua durante 30 minutos.
- 2) Después de enfriar pasar a un matraz volumétrico de 25mL, aforar con agua agitando muy bien.
- 3) Del matraz anterior tomar de 40 a 160 $\mu$ L con pipeta volumétrica, llevar a 1mL en tubos de 13x100 esmerilados por duplicado, preparar además un tubo blanco que contenga 1mL de H<sub>2</sub>O y otros 2 estándares con 20 $\mu$ L de una solución de glucosa estándar (1mg/mL) y llevar a 1mL con agua.
- 5) Preparar solución de antrona 0.2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Añadir 2mL a cada tubo agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y enfriando sobre hielo.
- 6) Tapar los tubos fríos y ponerlos en un baño de agua hirviendo por 15 minutos.
- 7) Enfriar de inmediato sobre agua con hielo. Leer a 620nm.

### CÁLCULOS

$$\frac{20 \times A(\text{mtra})}{1.11 \times A(\text{std})} = \mu\text{g de glucógeno en la alícuota}$$

A(mtra) = Absorbancia de la muestra.

A(std) = Absorbancia del estándar.

Expresar los resultados como gramos de glucógeno por 100g de hígado.

## RESULTADOS

### Actividad enzimática de la ALT

La actividad enzimática de la ALT (figura 7), que nos indica si se produjo o no necrosis, muestra que en la administración de  $\text{CCl}_4$  por 8 semanas hay una tendencia a incrementar respecto al control, pero también se muestra que el EP aumenta el daño, ya que hay una diferencia significativa en ese grupo con respecto al grupo control.

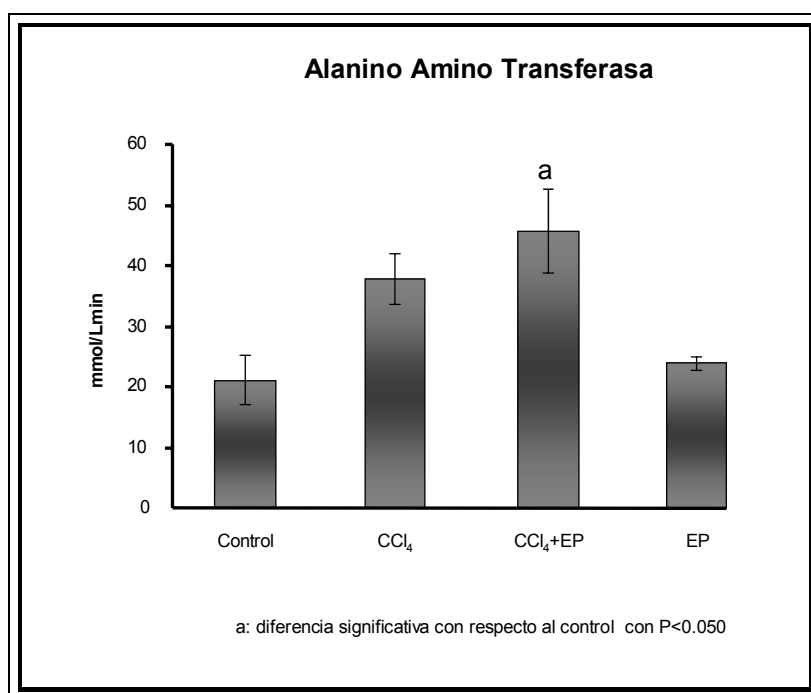


Figura 6. Actividad enzimática de la ALT.

Cada barra representa el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar.

EP: etilpituvato



## Actividad enzimática de la FA

La figura 6 muestra la actividad enzimática de la FA en la cual hay un incremento significativo en el grupo de  $\text{CCl}_4$  comparado con el grupo control; por otro lado, el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$  más EP muestra una disminución de este enzima, ya que hay diferencia significativa con respecto al grupo de  $\text{CCl}_4$ .

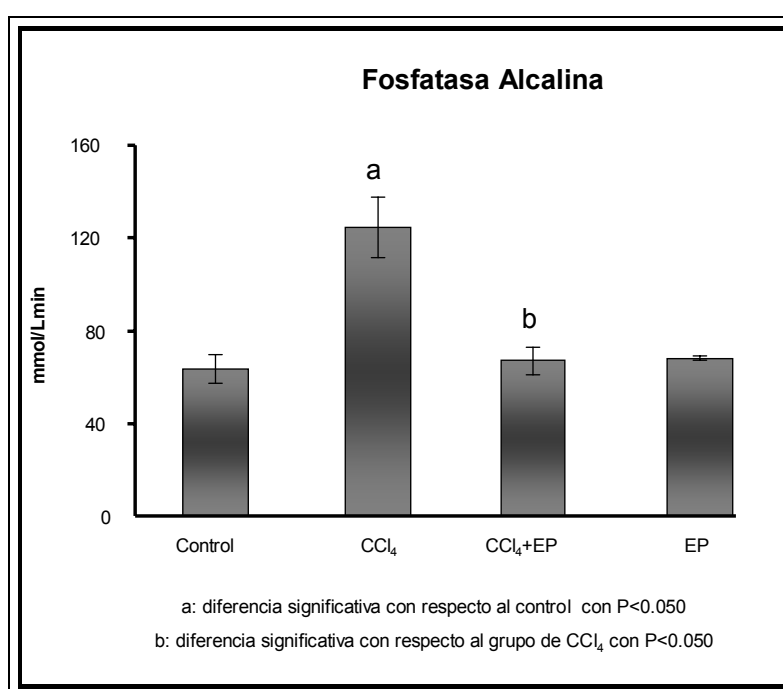


Figura 7. Actividad enzimática de la FA.

Cada barra representa el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar.

EP: etilpituvato

## Actividad enzimática de la $\gamma$ -GTP

En la actividad enzimática de la  $\gamma$ -GTP no se observa ninguna diferencia significativa en ninguno de los grupos experimentales (figura 8), sin embargo si existe una tendencia al incrementarse esta actividad en el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$ , así como en el grupo de EP.

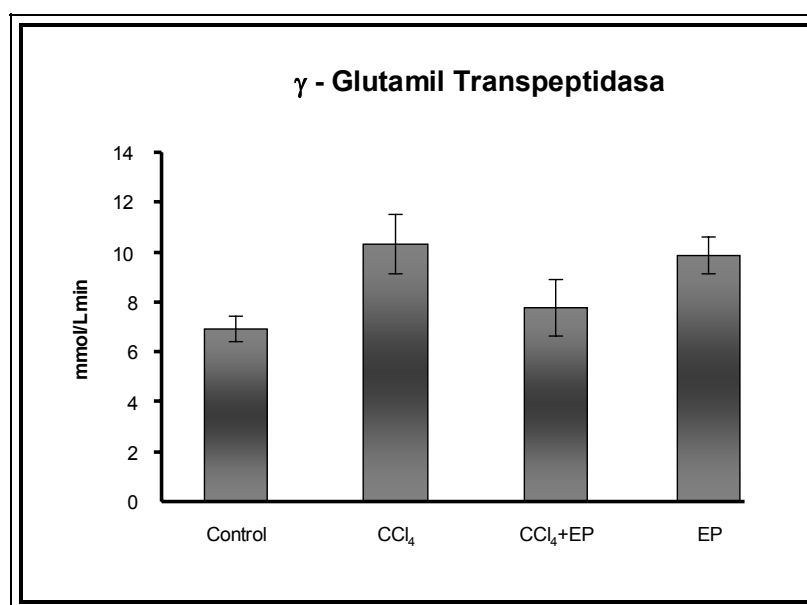


Figura 8. Actividad enzimática de la  $\gamma$ -GTP.

Cada barra representa el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar.

EP: etilpituvato

## Grado de peroxidación lipídica

En la peroxidación lipídica, marcador de estrés oxidativo a nivel membranar, no se observa ninguna diferencia significativa en ninguno de los grupos experimentales (figura 9). Sólo se puede apreciar una ligera tendencia a incrementar los niveles de MDA, uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, en el grupo tratados con  $\text{CCl}_4$ . El EP previno ligeramente este incremento aunque la diferencia no fue significativa.

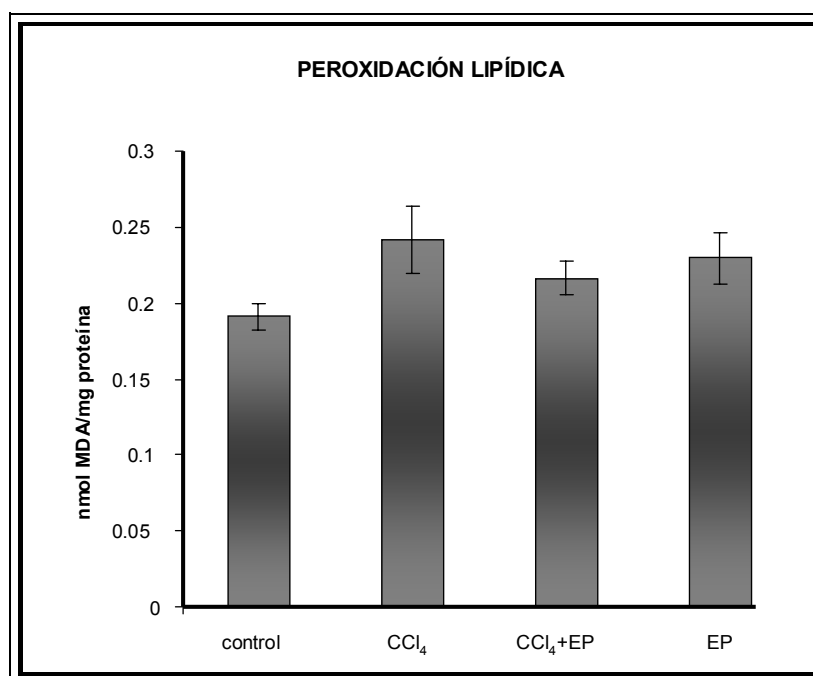


Figura 9. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Cada barra representa el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar.  $P < 0.05$ .

EP: etilpituvato

### GSH y GSSG en hígado

Los niveles de GSH y GSSG en hígado se muestran en la figura 10. No se observa diferencia significativa en el contenido de GSH entre los grupos experimentales, sin embargo cuando se administra  $\text{CCl}_4$ , hay un ligero incremento en los niveles de GSSG. El grupo de  $\text{CCl}_4$  más EP muestra que el compuesto de interés tiende a prevenir el incremento del GSSG. Así mismo se observa que la relación de GSH/GSSG tiene una tendencia a disminuir en el grupo de  $\text{CCl}_4$  cuando se compara con los demás grupos; el EP por otra parte muestra un aumento de esta relación, por lo que tuvo la capacidad de prevenir esta reducción, lo mismo ocurrió en el grupo de  $\text{CCl}_4$  más EP. Por otro lado no se estimuló la síntesis de novo de glutatión pues no hay diferencia significativa entre los grupos en el contenido de glutatión total (GSH + GSSG).

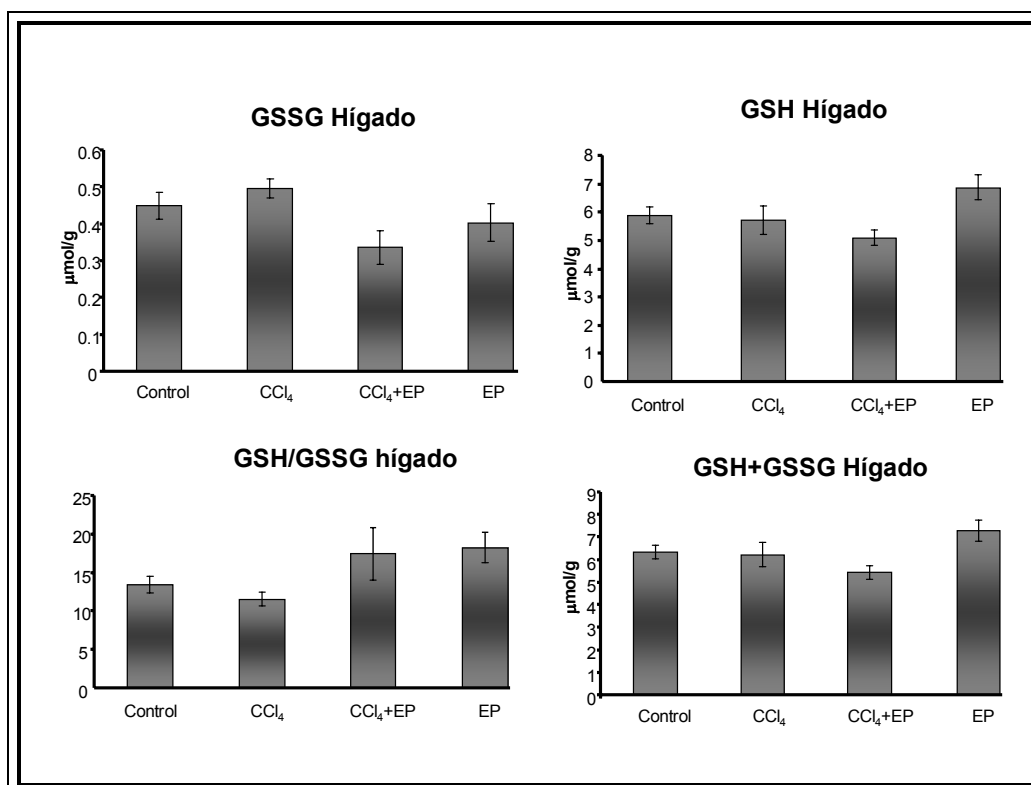


Figura 10. Determinación en hígado de los niveles de (izquierda a derecha): GSSG, GSH, GSH/GSSG y GSH + GSSG. Cada barra representa el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar.  $P < 0.05$ . EP: etilpituvato.

## Contenido de glucógeno

El  $\text{CCl}_4$  disminuye la capacidad del hígado para almacenar glucógeno (figura 11); el grupo de  $\text{CCl}_4$  más EP tiende a prevenir parcialmente la reducción del contenido de glucógeno.

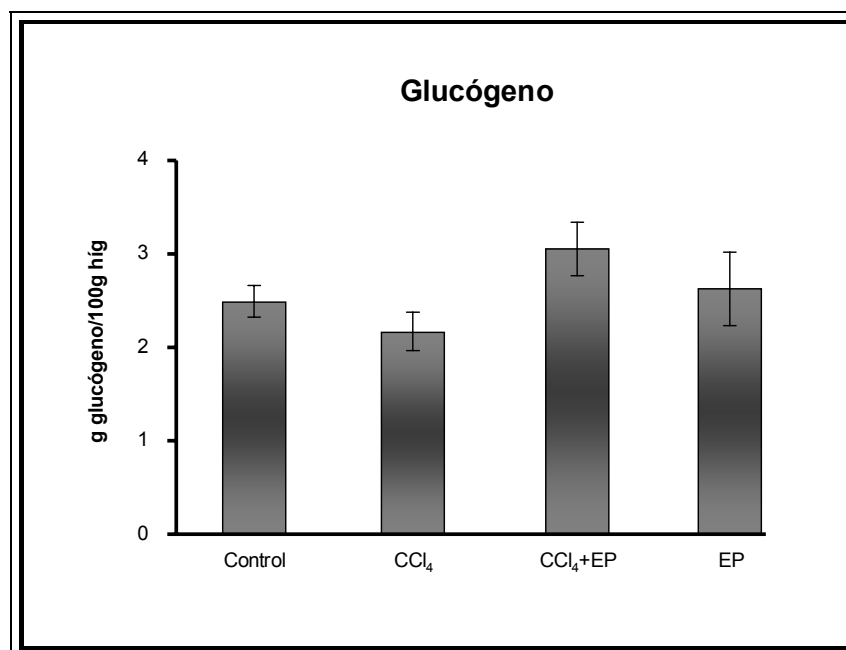


Figura 11. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Cada barra representa el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar.  $P < 0.05$ .

EP: etilpituvato

## Contenido de colágena

La administración de  $\text{CCl}_4$  durante 8 semanas establece una fibrosis indicada por un incremento de aproximadamente 6 veces en el contenido de colágena (figura 12) con respecto al grupo control. Así mismo el grupo de  $\text{CCl}_4$  más EP muestra una diferencia significativa respecto al grupo control, lo cual nos indica que el EP no muestra una actividad antifibrótica ya que no previene la acumulación de colágena en el hígado.

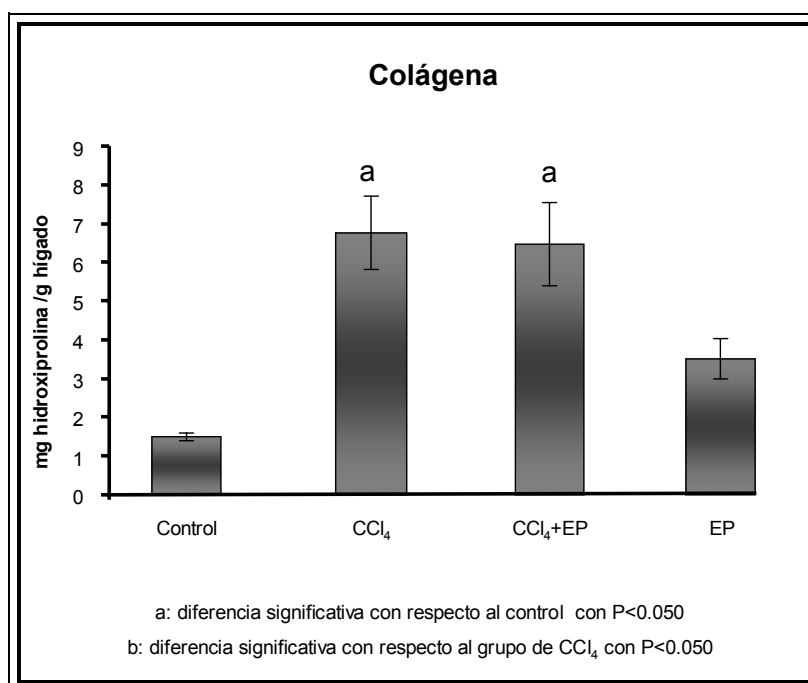


Figura 12. Determinación de los niveles de colágena.

Cada barra representa el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar.

EP: etilpiruvato.

---

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo podemos observar que el tratamiento crónico con  $\text{CCl}_4$  es un buen modelo de daño hepático que produce necrosis, colestasis y una fibrosis importante. El EP, por otro lado, no fue capaz de interferir significativamente en la progresión de la enfermedad.

Como ya se ha mencionado la ALT, un indicador de necrosis, es una de las enzimas que más se utiliza para detectar un daño hepatocelular. En presencia de un daño a los hepatocitos, el cambio en la permeabilidad de la membrana celular, ocasiona la salida de la ALT de la célula hacia la circulación general (33). Si se observa en la gráfica 6, la actividad de la ALT, tiene una tendencia a aumentar con la administración crónica de  $\text{CCl}_4$ , sin embargo en el grupo  $\text{CCl}_4$  más EP no se refleja una disminución de esta presencia, al contrario la aumenta significativamente respecto al grupo control, y se observa una ligera tendencia que aumenta el grado de necrosis si se compara con el grupo de  $\text{CCl}_4$ .

De acuerdo a los resultados de las pruebas para detectar colestasis (FA,  $\gamma$ -GTP), se observa claramente que la actividad enzimática de la FA se incrementa el doble con la administración crónica de  $\text{CCl}_4$ , mientras que en los grupo de  $\text{CCl}_4$  más EP, y aceite mineral más etilpiruvato existe una diferencia significativa comparada con el grupo control, esto nos dice que el EP tiene la capacidad de prevenir colestasis en un daño prolongado con  $\text{CCl}_4$ . Sin embargo en la actividad enzimática de la  $\gamma$ -GTP no se presentan diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos, pero si se observa una tendencia al incrementar esta actividad con la administración sola de EP.

Existen radicales libres capaces de reaccionar con lípidos y proteínas, alterando así las funciones membranales y llegando a provocar necrosis. En las membranas, tanto plasmáticas, como las del retículo endoplásmico y las de la mitocondria, hay una gran cantidad de lípidos poli-insaturados. La cuantificación de MDA es una medida proporcional del grado de peroxidación lipídica que sufren los hepatocitos. De acuerdo a los resultados no se presenta ninguna diferencia significativa entre los grupos tratados, sólo una muy ligera tendencia a aumentar en el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$ . Estos resultados talvez sugieren que el  $\text{CCl}_4$  no induce peroxidación lipídica; sin embargo, en la teoría se dice que el principal mecanismo por el cual el  $\text{CCl}_4$  produce daño es a través de la generación de radicales libres (34). Una posible explicación es la siguiente: el sacrificio de las ratas se realizó 72 horas después de la última administración de  $\text{CCl}_4$ , posiblemente en ese lapso,

---

el MDA producido por la peroxidación lipídica fue depurado evitando así la detección de niveles altos en el grupo de CCl<sub>4</sub>, por lo que este resultado no nos indica con veracidad los efectos reales del EP en el estrés oxidativo a nivel membranar.

El glutatión provee de un equilibrio de óxido-reducción, por lo que representa una defensa de las células en contra del estrés oxidativo a través de radicales libres, en este caso el radical triclorometilo, cuando este radical se encuentra en una concentración alta, el GSSG tiende a aumentar, y el GSH a disminuir. Respecto a los resultados de esta prueba, para el GSH no existen diferencias significativas entre los grupos, pero cabe destacar un pequeño acrecentamiento en el grupo de etilpiruvato, esto posiblemente se deba a la estructura química del etilpiruvato que pudiese fungir como un oxidante si es administrado a un grupo al cual no se le está produciendo estrés oxidativo. Por otro lado, en las pruebas para identificar la presencia de GSSG indican que la administración de EP en un grupo que ha sido administrado con CCl<sub>4</sub> durante 8 semanas tiende a disminuir sutilmente la presencia de GSSG en el hígado respecto al grupo que sólo se le administró CCl<sub>4</sub>. Esto nos indica que el etilpiruvato tiene un papel antioxidante al no permitir que el GSSG aumente respecto a los demás grupos, sino que previene la oxidación del GSH. En la relación GSH/GSSG no existen diferencias significativas, no obstante en los grupos de CCl<sub>4</sub> más EP y EP se presenta un ligero aumento en esta relación. En el glutatión total aunque no hay diferencias significativas entre los grupos, hay una tenue tendencia a disminuir en el grupo CCl<sub>4</sub> más EP, comparada con los otros grupos.

El hígado tiene la capacidad de convertir el glucógeno almacenado en glucosa, cuando el organismo así lo requiera. Cuando se presenta un daño hepático las concentraciones de glucógeno disminuyen ya que el hígado se ve afectado a nivel membranar y por lo cual ya no es capaz de almacenar glucógeno. En los resultados obtenidos no se observó ninguna diferencia significativa entre grupos, solo una leve disminución de concentración de glucógeno en el grupo de CCl<sub>4</sub> y un insignificante aumento en el grupo de CCl<sub>4</sub> más EP, lo que indica que previene muy sutilmente una alteración de la membrana.

El aumento de colágena en el hígado es señal de una fibrosis, está a su vez es responsable de muchas alteraciones ya antes mencionadas que el hígado puede presentar. La administración de CCl<sub>4</sub> durante 8 semanas incrementa notablemente la producción de colágena, más o menos de 6 veces respecto al grupo control. Tanto en el



---

grupo de CCl<sub>4</sub> cómo en el grupo de CCl<sub>4</sub> más EP se presentó una diferencia significativa comparada con el grupo control, lo cual nos dice que el EP no funge como una molécula antifibrótica. Por otro lado la administración de solamente etilpiruvato muestra una diferencia significativa respecto al grupo de CCl<sub>4</sub>.

El EP ha demostrado disminuir el daño hepático, renal o intestinal cuando es usado como un agente terapéutico en roedores sujetos a isquemia mesentérica y reperfusión (16,17), y choque hemorrágico (14,18), es por lo que el objetivo de este proyecto fue probar el efecto del EP en un modelo de administración crónica de CCl<sub>4</sub> antes no probado, sin embargo no obtuvimos efectos benéficos.

También se ha reportado que el EP es capaz de inhibir significativamente al NF-κB en cultivos celulares y en estudios con animales (19) y con ello una serie de citocinas y factores profibróticos. Es por ello que se esperaba que el EP previniera el daño crónico producido con CCl<sub>4</sub>. Las razones por las cuales esto no ocurrió pueden ser varias, una de ellas es la dosis y la frecuencia que se utilizó en la administración de EP, éste no fue capaz de inhibir al NF-κB. Otra posibilidad es que el solvente que se utilizó para la administración de EP fue agua, y no una solución ringer de etilpiruvato (RESP) (14), ya que en experimentos anteriores, en los cuales el EP ha sido administrado como RESP, se notó una disminución de la activación del NF-κB (14). Una tercera posibilidad es que el EP una vez administrado en el organismo puede sufrir una descarboxilización, gracias a una estereasa presente en el hígado, o a nivel del duodeno, transformándose así en piruvato y etanol, ahora bien el etanol es un agente hepatotóxico, por lo que la administración de EP en un período de 8 semanas, como se hizo en este proyecto, puede aumentar nuestros marcadores hepáticos. Por ejemplo, en la determinación del contenido de colágena se observa una ligera tendencia a aumentar con respecto al control en el grupo al que sólo se le administró aceite mineral más EP. Esta posible toxicidad que se genera, puede aumentar el grado de necrosis, colestasis y fibrosis en el hígado de las ratas a las que se les administró EP. Y una última posibilidad puede ser que la inhibición del NF-κB conduce a su vez a la inhibición de productos nocivos para el organismo pero también inhibe compuestos benéficos como las interleucinas antinecróticas IL-10 y 13, óxido nítrico y factores que intervienen en la regeneración hepática (35), el hígado tiene la capacidad de regenerarse por sí solo, gracias a estos compuestos benéficos, pero al inhibirlos se ve afectada la regeneración del hígado, lo que con lleva a una acumulación de colágena, y esta a su vez, a una cirrosis hepática.

## CONCLUSIONES

El modelo experimental de administración de  $\text{CCl}_4$  intraperitoneal durante 8 semanas en la rata, es un buen modelo en el cual se nota que efectivamente se produce un daño hepático, donde se observa colestasis, necrosis y fibrosis, estas indicadas con los diferentes marcadores de daño hepático que incrementaron significativamente.

El EP aumenta parcial y significativamente la actividad de la ALT, produce un mayor grado de necrosis si se administra conjuntamente con  $\text{CCl}_4$  durante 8 semanas, pero mantiene parcialmente los niveles plasmáticos normales de la FA.

El EP puede disminuir pobremente el estrés oxidativo de acuerdo a las pruebas de glutatión en hígado realizadas, es decir, que tiene un sutil papel como antioxidante.

El EP, a la frecuencia y dosis que utilizamos, no previene la producción de colágena, ni tiene ningún efecto benéfico contra la fibrosis.

## RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Ya que con la dosis utilizada de EP (150mg/kg/día) en este proyecto no conseguimos obtener resultados para la prevención de la cirrosis, se podría administrar dosis más altas, y hasta de 2 veces al día, una dosis unos minutos u horas antes de la administración de CCl<sub>4</sub> y otra dosis horas después de ya haber sido administradas las ratas con CCl<sub>4</sub>. Esto con la finalidad de prevenir el daño parcial que se pudiera ocasionar con la administración de CCl<sub>4</sub>, sería como prevenir desde un principio cualquier daño agudo para no dejar que se produzca cirrosis.

---

## REFERENCIAS

- 1) Dalley, A. Moore, K. (1999). Anatomía con orientación clínica. (4ª ed.). México: Ed. Editorial medica panamericana.
- 2) Ganong, W. (1976). Manual de fisiología Médica. México: Ed. El manual moderno.
- 3) Vega, G. (1980). Manual de Histología esquemática. México: Ed. Pueblo y Educación.
- 4) Rivero, S. O. (1993). Tratado de medicina interna. Academia nacional de medicina. Vol. 1. México: Ed. El manual moderno.
- 5) Bowman, M. (1994). Anatomía y fisiología del cuerpo humano. México.
- 6) Higashida, B. (200). Ciencias de la salud. (3ª ed.). México: Ed. Mc Graw- Hill.
- 7) Medicina preventiva. (2006, octubre 29). Hepatitis de la A a la E.
- 8) <http://www.hepatitis.cl/oh.html>
- 9) <http://www.medlineplus.com.mx>
- 10) <http://digestive.niddk.nih.gov/spanish/pubs/cirrhosis/index.html>
- 11) <http://fundacionmexicanaparalasesfermedadeshepaticas.org.mx/enfermedades.html>
- 12) Lutz WD, Meirand B, Stampfl A.(2003) Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: *Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. Critical Reviews in Toxicology*, 33(2); 105-136.
- 13) Border, W. A. Noble, N. A. (1994) *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. N Engl J Med; 331:1286-92.
- 14) Yang R, Gallo DJ, Baust JJ, Uchiyama T, Watkins SK, Delude RL, and Fink MP. (2002). *Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 283: G212-G221.
- 15) Von Korff, R. W.(1964) *Pyruvate-C<sup>14</sup>, purity and stability*. Anal. Biochem. 8:171-178.
- 16) Sims C. A, Wattanasisichaigoon S, Meconi MJ, Ajami AM, and Fink MP (2001). *Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats*. Crit Care Med. 29: 1513-1518.
- 17) Uchiyama T, Delude RL, and Fink MP. (2003). *Dose-dependent effects of ethylpyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion*. Intensive Care Med. 29: 2050-2058.

- 
- 18) Tawadrous ZS, Delude RL, and Fink MP. (2002). *Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hypermeability in rats. Shock.* 17: 473-477.
  - 19) Yusheng H., Joshua A., Englerts A, Yang R, Russel L, Delude L and Fink MP. (2005). *Ethyl pyruvate inhibits Nuclear Factor- $\kappa$ B-Dependent signaling byv Directly Targeting P65.*
  - 20) Woodman D. (1985) *Assessment of hepatic function and damage in animal species: a review of the current approach of the academic, governmental and industrial institutions represented by the animal clinical chemistry association.* J. Appl. Tox. 8:249-254
  - 21) Kaplan, M. (1986) *Serum alkaline phosphatase-another piece is added to the puzzle.* Hepatology 6:526-528.
  - 22) Broe, E., Roels, F., Nouwen, J., Claeys, L., Wieme, J. (1985) *Liver plasma membrane: the source of high molecular weight alkaline phosphatases in human serum.* Hepatology 5:118-28.
  - 23) Szewczuc A. (1966) *A soluble form of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in human tissues.* Clin. Chim. Acta 14:608-614.
  - 24) Bulle, F., Mavier, P., Zafrani, E., Preaux, A., Lescs, M., Siegrist, S., Dhumeaux, D., Guellaën, G. (1990) *Mechanism of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: a histochemical, biochemical and molecular approach.* Hepatology 11: 545-50.
  - 25) Muriel P. (1997) *Peroxidation of lipids and liver damage. In oxidants, antioxidants and free radicals.* Ed. Taylor and Francis, Washington, USA.
  - 26) Reitman, S., Frankl, S.A. (1957) *A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases.* Am. J. Clin. Pathol. 28:56-63.
  - 27) Berger, L. y Rudolph, G.N. *Alkaline phosphatase.- Standars method of Clinical Chemistry.* Vol. 5, Ed. Meites Academic Press, New York, USA.
  - 28) Glossmann, M. y Neville, D. M. (1972) *Gamma-glutamyltransferase in kidney brush border membranes.* FEBS Lett 19(4), 340-344.
  - 29) Rojkind M. y Gonzáles, E. (1974) *An improved method for determining special radioactivities of proline and hidroxyproline.* Analytical Biochemistry, 57, 1-7.
  - 30) Buege, J. A. y Austin, S. D. (1978) *Methods in Enzimology.*
-

- 
- 31) Hissin, P. J. y Hilf, R. (1976) *A fluometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Anal Biochem, 74, 214-226.
  - 32) Seifter, S., Dayton, S., Novic, B. y Muntwyler, E. (1950) *The estimation of glucogen with the anthrone reagent*. Arch Biochem, 25, 191-200.
  - 33) Nishimura D, Imoto M, Satake T, Sugiyama S, Ozawa T. (1985) *Mechanism of liver mitochondrial dysfunction associated with bile duct obstruction*. Arzneim-Forsch/Drug Res; 35:1427-30.
  - 34) Forni, L., Packer, E., Slater, T., Willson, R. (1983) *Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: a pulse radiolysis study*. Chem. Biol. Interact.
  - 35) Sappington L. P. et al. (2005) *The ethyl pyruvate analogues, diethyl oxalopropionate, 2-acetamidoacrylate, and methyl-2-acetamudacrylate, exhibit anti-inflammatory properties in vivo and/or in vitro*. Biochem. Pharm. 70:1579-1592.