



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO CUANTITATIVO DEL CONTENIDO
HEPATICO DE VITAMINA A EN LA RATA ALBINA
A DIFERENTES EDADES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
MARIA ELENA JAIME FLORES

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	pag.
Introducción	1
PRIMERA PARTE	
REVISIÓN DE LA LITERATURA	
A. Aspectos generales sobre nutrición de animales de laboratorio	3
B. Vitamina A:	
1.- QUÍMICA	12
2.- FUENTES	14
3.- BIOQUÍMICA:	
a) Absorción	14
b) Transporte por quilomícrones	15
c) Almacenamiento	16
d) Transporte ligado a RBP	20
e) Excreción	22
4.- FISIOLÓGICA	24
5.- HIPOVITAMINOSIS A	30
6.- HIPERVITAMINOSIS A	32
7.- REQUERIMIENTOS DE VITAMINA A EN LA RATA:	35
a) Efecto del ciclo de vida	36
b) Efecto de los factores nutricionales	37
c) Efecto de la forma de presentación en la dieta	38
d) Requerimientos en la rata adulta	39

SEGUNDA PARTE

SECCION EXPERIMENTAL

A. OBJETIVO	40
B. MATERIAL Y METODOS:	41
1.- Primer experimento	42
2.- Segundo experimento	43
C. RESULTADOS:	47
1.- Primer experimento	47
2.- Segundo experimento	53
D. DISCUSION	62
E. CONCLUSIONES	68

TERCERA PARTE

RESUMEN GENERAL Y BIBLIOGRAFIA

A. RESUMEN GENERAL	69
B. BIBLIOGRAFIA	72

I N T R O D U C C I O N

El presente estudio aporta un avance en el conocimiento de un aspecto importante de la bioquímica del animal de laboratorio más utilizado, la rata albina (Rattus norvegicus albinus). Este trabajo surgió como un proyecto colateral del programa que sobre colelitiasis experimental en el jámster se viene desarrollando desde hace ya un buen número de años en este Laboratorio, en donde se ha encontrado que la vitamina A per se produce cálculos biliares pigmentados en el jámster dorado. Durante el curso de las investigaciones sobre colelitiasis en este animal se observó que mientras mayor era la edad de los animales utilizados en el experimento, más elevados eran los valores de vitamina A hepática en los grupos que recibían sólo la dieta de mantenimiento (controles), lo cual podía estar asociado con la observación hecha por Dam¹⁰⁰ de que los cálculos biliares pigmentarios algunas veces se presentan de manera espontánea en jámsteres seniles. De ahí el interés por establecer los niveles hepáticos de vitamina A en jámsteres y ratas de diferentes edades, alimentados sólo con dieta de mantenimiento.

La primera parte de este trabajo contiene una amplia revisión de la literatura sobre nutrición de animales de laboratorio, y sobre la bioquímica y fisiología de la vitamina A, lo cual nos ha dado bases sólidas para el análisis y evaluación de los resultados de este estudio.

Esta investigación la realizamos en el Laboratorio de Biología Animal Experimental de esta Facultad, en calidad de Asistente de Investigación, bajo la dirección del Dr. René Cárdenas Vázquez, responsable de la sección de Bioquímica, y con la asesoría del Dr. Humberto Granados Espitia, jefe del Laboratorio.

A. ASPECTOS GENERALES SOBRE NUTRICION DE ANIMALES DE LABORATORIO.

De manera, general los requerimientos nutricionales de los animales son similares aunque la fuente de obtención de nutrientes puede ser muy diferente; algunos se alimentan exclusivamente de plantas, otros sólo de animales, y aún otros de ambos, pero todos son heterótrofos, y presentan una gran diversidad de adaptaciones a su dieta.

En condiciones de laboratorio los animales son alimentados con dietas elaboradas teniendo en cuenta la composición de su dieta natural, cuando ésta es conocida. La calidad de una dieta se puede evaluar monitoreando el estado de salud de la especie, el cual se evalúa principalmente considerando su crecimiento, récord reproductor, actividad espontánea y longevidad.

Una dieta, ya sea de origen natural o preparada artificialmente, debe llenar todas las necesidades nutricionales del animal, es decir, debe ser una dieta balanceada, incluyendo alimentos que proporcionen proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra, en cantidades adecuadas, que satisfagan los requerimientos energéticos y permitan llevar a cabo el crecimiento y la reproducción del animal¹.

Los organismos requieren energía para realizar sus diferentes funciones; esta energía es obtenida principalmente de las grasas y carbohidratos, aunque también las proteínas suministran cantidades considerables de los requerimientos energéticos diarios. Los lípidos

al constituir el nutriente más energético por unidad de peso es una de las formas de almacenamiento de energía en el cuerpo de los animales.

Las grasas son un elemento esencial en la dieta, y su ausencia produce síntomas específicos de deficiencia, tales como crecimiento retardado, dermatitis, piel descamada y alteraciones de la reproducción y del balance del hídrico. Experimentos con ratas en los cuales se utilizan dietas completamente sin grasas, han demostrado que los ácidos grasos de la familia del ácido linoleico $\omega 6$ (18:2 $\omega 6$; 18:3 $\omega 6$; 18:4 $\omega 6$; 20:2 $\omega 6$; 20:3 $\omega 6$ y 20:4 $\omega 6$)² son capaces de curar los síntomas de deficiencia de lípidos, es decir, son ácidos grasos esenciales.

Los carbohidratos, además de proporcionar energía, puesto que son capaces de almacenarla, se requieren de manera estructural para constituir las glicoproteínas y los glicolípidos. En las dietas de mantenimiento de animales de laboratorio, los carbohidratos son suministrados principalmente por cereales tales como el centeno, el trigo, el maíz y la avena, principalmente en forma de almidón.

Las proteínas dietéticas se hidrolizan a aminoácidos o pequeños péptidos, siendo de esta manera absorbidos. Estos aminoácidos se utilizan para formar nuevas cadenas de proteínas según los requerimientos del organismo. De los 20 aminoácidos que constituyen las proteínas, algunos pueden ser sintetizados a partir de otros grupos químicos, siendo éstos los denominados aminoácidos no esenciales; por otra parte, existen otros que son necesarios

suministrarlos en la dieta, los llamados aminoácidos esenciales, los cuales son: la treonina, lisina, metionina, valina, isoleucina, leucina, arginina, histidina, fenilalanina y triptofano. Las fuentes de proteína de origen animal, tales como la harina de pescado y de carne y la leche, contienen aminoácidos en una proporción muy cercana a la requerida por el animal, y se consideran como fuentes dietéticas de proteína de "buena calidad". Algunas proteínas de origen vegetal tales como la soya, contienen niveles aceptables de aminoácidos, pero otras, como las de los cereales, son a menudo deficientes en uno o más aminoácidos, generalmente lisina, metionina y/o cisteína, requiriendo por lo tanto suplementos de éstos en la dieta.

Las vitaminas comprenden un grupo de nutrientes esenciales para los animales, y debido a que generalmente actúan como cofactores enzimáticos, sus requerimientos son muy pequeños. Se agrupan comúnmente en dos clases principales: las hidrosolubles y las liposolubles. Como regla general, las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) se almacenan en el organismo considerablemente, a diferencia de las hidrosolubles, tales como son las del complejo B y la C, las cuales son eliminadas más rápidamente. Debido a que el contenido de vitaminas en los nutrimentos naturales varía notablemente, aún en el caso de aquellas que son químicamente estables, generalmente se agregan ciertas cantidades de vitaminas sintéticas a las dietas balanceadas comerciales de animales de laboratorio, para asegurar así los niveles adecuados de éstas en las dietas.

Los elementos inorgánicos tienen una amplia variedad de funciones importantes en el cuerpo: algunos actúan en una forma similar a las vitaminas, como cofactores enzimáticos, mientras que otros en adición a esta actividad en ocasiones tienen acciones principalmente estructurales o físicas. Los minerales esenciales pueden dividirse en dos grupos: aquellos que el organismo necesita comparativamente en grandes cantidades, tales como el calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro y azufre, y aquellos que se requieren en cantidades muy pequeñas, tales como el cobre, zinc, cobalto, selenio, hierro, manganeso, yodo o molibdeno.

Los ingredientes dietéticos de origen vegetal, tales como la capa externa de los cereales, contienen algunas sustancias que el animal monogástrico es incapaz de digerir, y son llamados genericamente fibra dietética. Esta es importante en la digestión y metabolismo del animal, ya que facilita el peristaltismo en el tracto digestivo, retiene agua y facilita la digestión y absorción de los nutrientes. Sin embargo, a la fibra dietética pueden ligarse algunos minerales y ciertas moléculas orgánicas, tales como las sales biliares, lo cual impide su absorción.

El agua frecuentemente tiende a ser excluida como nutriente, pero es uno de los factores más importantes de la dieta: funciona como vehículo para transporte de nutrientes y productos de desecho, participa en las reacciones químicas, e interviene en el control de la temperatura corporal. Los animales de laboratorio deben tener siempre acceso al agua para remplazar la que pierden en la orina y

por evaporación a través de la piel y de las mucosas. Los animales pueden obtenerla directamente bebiéndola, o indirectamente a través de los alimentos; la cantidad de agua que beben dependerá de la humedad y composición de su dieta, del estado fisiológico del animal, de la temperatura ambiental y de la especie.

- Disponibilidad de los nutrientes en la dieta:

La cantidad de nutrientes de cualquier alimento se determina generalmente a través de análisis químicos; aunque éste proporciona una información útil, no presenta un cuadro completo de los nutrientes de que dispone el animal a través de la dieta. La disponibilidad de los nutrientes varía dependiendo de sus fuentes dietéticas; así, las dietas ricas en fibra contienen una mayor proporción de energía en forma indigerible, y de la que no puede disponer el animal monogástrico. También los aminoácidos pueden encontrarse en forma de péptidos indigeribles y en uniones péptido-carbohidratos que no pueden ser liberados por las enzimas digestivas. La disponibilidad de los minerales en la dieta puede reducirse debido a su estado químico y a la presencia de otros minerales o de materias orgánicas con las cuales pueden formar complejos de donde no pueden ser absorbidos; por ejemplo, el hierro sólo puede ser absorbido en forma ferrosa y no férrica. Asimismo, la disponibilidad del zinc se reduce marcadamente en presencia de fosfatos, los cuales se encuentran naturalmente en los nutrimentos que contienen fósforo orgánico.

-Factores que afectan los requerimientos nutritivos de los animales:

Los nutrientes son empleados por el organismo para producir energía, nuevas células y mantener los procesos metabólicos. Los requerimientos nutritivos de los animales de laboratorio son afectados por factores genéticos y ambientales.

Se han identificado diferencias intraespecíficas en los requerimientos nutritivos de los animales; en muchos casos las diferencias reportadas en la literatura son tan pequeñas que resultan insignificantes comparadas con las variaciones de los requerimientos de nutrientes durante todo el ciclo de vida normal del animal. Algunas especies presentan peculiaridades en cuanto a sus requerimientos de vitaminas: por ejemplo, el gato tiene un alto requerimiento de vitamina A y es incapaz de utilizar carotenos como fuente de ésta; los primates del nuevo mundo, tales como los tities, no pueden utilizar vitamina D₂ dietética, mientras que los cobayos y los primates requieren de vitamina C en la dieta, pues no la pueden sintetizar. También han sido reportadas diferencias en los requerimientos nutritivos en varias cepas de ratones, pues se ha demostrado que el récord reproductor de diferentes cepas varía según la dieta.

Existen variaciones en los requerimientos de nutrientes durante el ciclo de vida normal de los animales: se necesita una mayor cantidad de nutrientes durante el crecimiento, la reproducción y la lactancia. Así, para un animal en crecimiento activo el

requerimiento de nutrientes por unidad de peso corpóreo es mucho mayor que cuando el animal se acerca a la madurez, disminuyendo en este caso su velocidad de crecimiento; por ejemplo, el calcio y el fósforo son requeridos en mayores cantidades durante la etapa de crecimiento que en la edad adulta. Por otra parte, la "cantidad absoluta" de energía requerida por un animal joven en rápido crecimiento es similar a la requerida por un adulto maduro. Para un mamífero durante la gestación el requerimiento de nutrientes aumenta por la demanda del feto, y por lo tanto es mayor durante el último tercio de la gestación. Después del parto los requerimientos permanecen altos y aún pueden aumentar, para suministrar los nutrientes necesarios durante la lactancia.

-Consumo de alimentos y aceptabilidad de la dieta:

Muchos de los animales de laboratorio comen las dietas de mantenimiento ad libitum; sin embargo, hay una tendencia a comer más de lo que se necesita, aunque el animal no esté creciendo o reproduciéndose; esto lo vuelve más o menos obeso y más propenso a adquirir enfermedades asociadas a la obesidad, tales como la insuficiencia renal, necrosis hepática y arteriosclerosis. Esta tendencia a comer más de lo necesario puede prevenirse controlando físicamente el consumo del alimento, o diseñando dietas con una menor densidad de los nutrientes, de tal manera que aunque el animal coma hasta la saciedad, ingiera menos nutrientes. El control del consumo de alimentos se usa principalmente en carnívoros y primates.

Por otro lado, el suministro de excesivas cantidades de

alimento dejan residuos en los comederos que son un riesgo para la salud, por descomposición de ellos o por contaminación con las heces, lo cual puede evitarse suministrando cantidades medidas de alimento.

Los animales de laboratorio deben alimentarse con una ración debidamente balanceada, que suministre sus requerimientos diarios de manera completa. Debido a que los intentos para proveer los requerimientos mínimos de un animal en una dieta son hasta hoy insatisfactorios, se hace necesario el suministro de suplementos alimenticios tales como frutas, vegetales y semillas. Sin embargo, estos suplementos, que raramente son balanceados, si pueden reemplazar perjudicialmente el consumo de los alimentos principales, hasta el punto de inducir enfermedades por carencia; esta es la causa del "síndrome del desperdicio" en los tities. Si por alguna razón se hace necesario suministrar suplementos alimenticios, la cantidad de éstos no debe ser grande ni diaria para que no afecte el consumo del alimento balanceado.

Otro aspecto de gran importancia es la aceptabilidad de la dieta por los animales. Las materias primas se deben seleccionar para que las dietas con que se elaboran tengan un sabor y una textura atractivos para el animal; esto es especialmente necesario en la elaboración de dietas para gatos, perros y primates.

En los roedores la forma física de una dieta puede influir sobre la cantidad de alimento ingerido; se ha observado que estos animales aceptan menos una dieta pulverizada que la misma dieta en

forma sólida (comprimida o peletizada). Las dietas comprimidas no deben ser demasiado duras, ya que esto puede causar una disminución en la ingestión del alimento, especialmente en los animales. Por el contrario, una dieta comprimida demasiado blanda resulta en una pérdida excesiva de alimento, especialmente si el animal está alojado en una jaula con piso de malla metálica.

- Estabilidad de los nutrientes en la dieta:

La mayoría de los elementos nutritivos son bastante estables a todos los procesos corrientes de tratamiento y cocción, así como al almacenamiento; los dos únicos que sufren daños de importancia son la vitamina C y, en menor grado, la vitamina B1.

La elaboración de las dietas implica tratamientos tales como el calentamiento, desecación, enlatado y adobado, que pueden surtir efectos deletéreos para la vitamina C, y efectos menores en las proteínas. Generalmente los carbohidratos y grasas, así como las sales minerales, no sufren daño alguno.

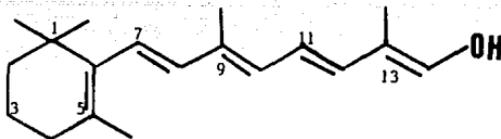
En general, si el alimento está almacenado en condiciones suficientemente buenas como para que siga siendo comestible, es decir, protegido contra la humedad, el aire y los ataques por microbios, es muy poca la pérdida que hay de cualquier elemento nutritivo, salvo la vitamina C.

B. VITAMINA A:

1. QUIMICA.

El término Vitamina A se aplica para designar cualquier sustancia o mezcla de sustancias isoprenoides que exhiben cualitativamente la actividad biológica del retinol^{9,4}, las cuales son esenciales, por lo menos, para visión, reproducción, crecimiento, y diferenciación y mantenimiento de los epitelios.

El todo-trans-retinol es la principal forma química de la vitamina A. Su forma estructural es la siguiente:

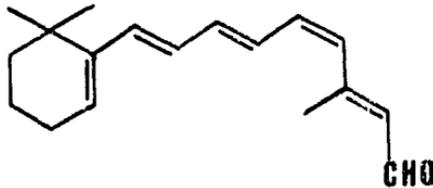


todo-trans RETINOL

El todo-trans retinol es un alcohol con un anillo alicíclico de 6 átomos de carbono y una cadena lateral, constituida por dos unidades de isopreno, con todos los dobles enlaces en configuración trans⁵. Es soluble en grasas y solventes orgánicos, insoluble en agua, estable en álcalis, pero no en ácidos, inestable a la luz y al oxígeno⁶. Se encuentra principalmente en dos formas: la vitamina A₁ o retinol 1, que es la forma más común en los animales, y la vitamina A₂ o retinol 2 que se presenta sólo en los peces de agua

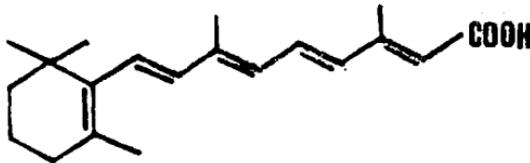
dulce. Estas dos moléculas difieren únicamente en que la vitamina A₂ presenta un doble enlace más que la A₁ entre los átomos 3 y 4 del anillo.

La forma aldehídica de la vitamina A es el retinal, que se encuentra en la retina y está involucrado en la visión nocturna.



11-cis RETINAL

La forma ácida de la vitamina A es el Acido Retinoico, que es un metabolito altamente activo en algunas funciones.



todo-trans ACIDO RETINOICO

Mientras que el retinol y el retinal son metabólicamente interconvertibles en el cuerpo, el ácido retinoico es irreversible a retinol o retinal debido a su fuerte oxidación.

2. FUENTES.

La mayor fuente de vitamina A en la dieta la constituyen los pigmentos carotenoides de las plantas, principalmente el β -caroteno; los ésteres de retinilo de cadena larga que contienen los alimentos animales, tales como son la carne y la leche, también son buenas fuentes de vitamina A.

La vitamina A es la única vitamina que se presenta en las plantas sólo en forma de compuestos precursores o provitaminas, principalmente como β -caroteno⁷.

3. BIOQUIMICA:

a) Absorción.

Cuando la obtención de vitamina A es a partir del β -caroteno u otros carotenoides, estos son primeramente transformados en retinol en la mucosa intestinal. Este proceso biosintético involucra dos enzimas solubles, que son la 15-15' dioxigenasa y la retinaldehído reductasa. El β -caroteno se rompe por la doble ligadura central por un mecanismo de dioxigenación catalizado por la 15-15' dioxigenasa, produciéndose dos moléculas de retinaldehído; el retinal es entonces reducido a retinol por la retinaldehído reductasa, utilizando NADH o NADPH como cofactores^{7,8}.

Los ésteres de retinilo obtenidos en la dieta son hidrolizados en el intestino, y el retinol resultante es absorbido por las células de la mucosa.

La absorción del retinol por las células de la mucosa intestinal se lleva a cabo por difusión facilitada, y es directamente proporcional a la concentración luminal intestinal⁹. Su absorción requiere de la presencia de sales biliares y grasas, para la formación de micelas. Asimismo, los ácidos grasos libres promueven la conversión del β -caroteno a retinal, y de esta forma se incrementa el gradiente de concentración efectivo entre el lumen y el epitelio intestinal, con lo cual aumenta la absorción⁹.

La presencia de la vitamina E en el intestino también es un factor importante, debido a que probablemente evita la destrucción oxidativa de la vitamina A⁹. Posteriormente el retinol, ya sea sintetizado a partir del caroteno o proveniente de la hidrólisis de los ésteres de retinilo, es reesterificado con ácidos grasos, principalmente con ácido palmítico. La esterificación intestinal del retinol es catalizada por la enzima microsomal acil CoA: retinol aciltransferasa (ARAT)¹⁰.

b) Transporte por quilomicrones.

Los ésteres de retinilo formados en la mucosa intestinal, son incorporados por los enterocitos a las partículas denominadas quilomicrones, los cuales son prácticamente grasa neutra con otros lípidos y un 2% de proteína¹¹; estos son transportados vía linfática

a la circulación general.

Los quilomicrones son metabolizados a remanentes de los quilomicrones durante su circulación en la sangre, pues, por ejemplo, muchos de los triglicéridos son hidrolizados por tejidos extrahepáticos. Algunas de las apoproteínas, fosfolípidos y ésteres de colesterol en los quilomicrones son intercambiados entre ellos y otras lipoproteínas o membranas celulares, y únicamente una pequeña parte de los ésteres de retinilo son transferidos de los quilomicrones y sus remanentes a otras lipoproteínas o membranas celulares¹⁰, así, los remanentes de los quilomicrones al llegar al hígado aún contienen la mayoría de los ésteres de retinilo, los que son entonces removidos de la circulación por los hepatocitos.

c) Almacenamiento.

El hígado desempeña un importante papel en la captación, procesamiento y liberación del retinol, ya que regula los niveles plasmáticos del mismo y su distribución a los órganos blanco; además es el principal órgano almacenador de vitamina A. El hígado está formado por 4 diferentes tipos celulares que son: i) las células parenquimatosas o hepatocitos, ii) las células estrelladas perisinusoidales, también llamadas células almacenadoras de grasa, células Ito, células intersticiales, células almacenadoras de lípidos y células almacenadoras de vitamina A, iii) las células endoteliales, y iv) las células de Kupffer; sin embargo, sólo los dos primeros tipos están involucrados en el metabolismo del retinol

hepático, aunque también se ha mencionado que las células de Kupffer podrían tener algún papel muy modesto dentro del mismo, pero éste aún no es muy claro¹⁰.

Los remanentes de los quilomicrones son reconocidos por los hepatocitos por medio de receptores de alta afinidad para la proteína apo E en las partículas remanentes, y posteriormente son endocitados¹².

Los hepatocitos son de mayor tamaño y más numerosos que los demás tipos celulares; ocupan un 90% de la masa total del hígado y representan alrededor del 65% del total de las células del mismo. En estas células la mayor parte de los ésteres de retinilo tomados de los remanentes de los quilomicrones vuelven a experimentar una hidrólisis, la cual es catalizada por la retinilo éster hidrolasa (REH). Se ha sugerido que la hidrólisis de los ésteres de retinilo podría jugar un papel importante en la transferencia de los retinoides desde los endosomas hasta el retículo endoplásmico¹³, donde la mayoría del retinol puede ser procesada para su secreción ligada a RBP (Proteína ligadora del retinol), o para su almacenamiento¹²; sólo una parte muy pequeña puede ser convertida en ácido retinoico, glucoronidos de retinilo, manosilo retinilo fosfato u otros metabolitos¹⁴.

A pesar de que los hepatocitos son los captadores de los remanentes de los quilomicrones, los cuales transportan la vitamina A, se sabe que la mayor parte del retinol hepático se encuentra en las células estrelladas. Parece ser que el transporte del retinol de

los hepatocitos a las células estrelladas está mediado por proteínas ligadoras. La evidencia actualmente disponible sugiere dos posibles acarreadores para la transferencia del retinol: la proteína ligadora de retinol (RBP) y la proteína celular ligadora de retinol (CRBP). Probablemente el retinol es también transferido en dirección opuesta, es decir, de las células estrelladas a los hepatocitos, para la movilización del retinol como complejo retinol-RBP¹⁵.

La RBP es sintetizada y secretada por los hepatocitos. Blomhoff ha sugerido que el retinol ligado a RBP puede ser liberado hacia las células estrelladas vía receptores para RBP en esas células¹⁴, y que la CRBP está involucrada en una ruta de transporte más directa entre ambos tipos celulares; sin embargo, esto no se ha demostrado.

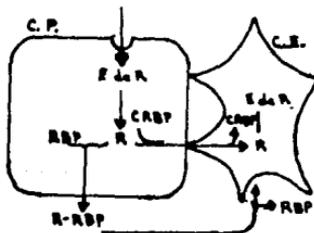


Fig. A según Blomhoff.

Las células estrelladas no sintetizan ni acumulan RBP; sin embargo, la concentración de CRBP en ellas es cerca de 22 veces mayor que en los hepatocitos, pero debido a la gran diferencia que hay entre ambos tipos celulares en tamaño y número, más del 90% del total de CRBP del hígado se encuentra en los hepatocitos¹⁵.

Por medio de la separación de los diferentes tipos celulares de hígado de ratas normales, se ha establecido que las células estrelladas contienen de 28 a 34 nMol de retinol/ 10^6 células, y que los hepatocitos contienen de 0.5 a 0.8 nMol de retinol/ 10^6 células. Las células endoteliales y las células de Kupffer contienen cantidades sumamente bajas de retinol. Esto nos indica que más del 80% del retinol en el hígado está contenido en las células estrelladas, y que sólo del 10 al 15% está presente en los hepatocitos^{15,17}.

Las células estrelladas perisinusoidales están localizadas en el Espacio de Disse, generalmente en las hendiduras perisinusoidales entre hepatocitos adyacentes; se ha mencionado que pueden jugar un papel en la síntesis de algunos componentes del tejido conectivo, y que pueden también estar involucrados en los cambios patológicos observados durante el desarrollo de la fibrosis del hígado¹⁸. Representan un 7% del número total de las células del hígado; su característica morfológica principal es la presencia de abundantes gotas de grasa en el citoplasma¹⁹. Los análisis bioquímicos de estas gotas demuestran que están compuestas principalmente por ésteres de retinilo¹⁴, lo cual confirma que la vitamina A está almacenada dentro de las gotitas de grasa en las células estrelladas del hígado en forma de ésteres de retinilo, principalmente palmitato de retinilo.

Dos tipos diferentes de gotas de lípidos pueden distinguirse dentro de las células estrelladas: un tipo aparece encerrado por una

membrana, mientras que el otro carece de tal estructura. Estudios recientes han demostrado que las gotitas de lípidos consisten de aproximadamente 42% de ésteres de retinilo, 28% de triglicéridos, 13% de colesterol y 4% de fosfolípidos²⁰. Muy cercanas a las gotitas de lípidos se ha encontrado una estructura membranosa que ha sido denominada "cuerpo multivesicular"; se ha sugerido que esta estructura puede estar activamente involucrada en el metabolismo del retinol²⁰.

d) Transporte ligado a RBP

La unión del retinol a RBP en el retículo endoplásmico del hepatocito da como resultado el complejo retinol-RBP, u holo-RBP, que pasa al Aparato de Golgi para después ser secretado hacia la circulación sanguínea.

La RBP es una molécula de una sola cadena, con peso molecular de 21 000. Actualmente se conoce su secuencia completa de aminoácidos²¹. Presenta sólo un sitio ligador para una molécula de retinol; es sintetizada por los hepatocitos como una pre-RBP, y rápidamente convertida en apo-RBP por la remoción de un polipéptido de aproximadamente 3 500 daltones²².

La combinación de retinol y RBP protege y estabiliza la vitamina A; también la hace soluble y transportable en el plasma, además de que protege a los tejidos de la acción tóxica del retinol libre¹⁶.

Después de su secreción por el hígado, el complejo retinol-RBP

se une a otra proteína, la prealbúmina plasmática o transtirretina (TTR), lo cual reduce la filtración glomerular y el catabolismo renal de RBP. La molécula de prealbúmina consta de 4 subunidades idénticas, y tiene un peso molecular de 54 980; se ha determinado su secuencia de aminoácidos, así como su estructura tridimensional²⁸. Aunque cada subunidad de TTR presenta un sitio de unión para RBP, sólo una molécula de RBP puede ser ligada por el tetrámero, debido probablemente a que la primera molécula de RBP que se liga, disminuye la afinidad de las otras tres. Por lo tanto, la holo-RBP y la prealbúmina se encuentran en proporción de 1:1.

El proceso de captación del retinol por los tejidos blanco, involucra receptores de superficie celular para RBP^{24,25}. Cuando el complejo retinol-RBP-TTR se liga a esos receptores, el retinol se libera desde la RBP y es tomado por las células para su subsecuente metabolismo. Una vez que el retinol entra a las células es ligado por la proteína celular ligadora de retinol (CRBP). Esta proteína es diferente a la RBP del plasma, la cual no parece ser incorporada a las células; probablemente se disocia del receptor, disminuyendo entonces su afinidad por TTR y disociándose de ésta.

Los componentes protéicos del complejo retinol-RBP-TTR son catabolizados independientemente¹⁰. Una molécula de RBP puede estar involucrada en varios ciclos de transporte del retinol entre el hígado y los tejidos blanco, en tanto que eventualmente moléculas de RBP libres son filtradas y degradadas por el riñón.

El hígado también puede acumular retinol desde el complejo

retinol-RBP-TTR; por lo tanto, hay un reciclamiento de retinol entre el plasma y el hígado. Se sabe que cerca de la mitad del retinol liberado por el hígado, en el complejo RBP es retomado nuevamente por el hígado aproximadamente 56 hrs después¹⁶.

e) Excreción.

El retinol es excretado por dos vías: en mayor proporción por las heces fecales, y en menor grado por la orina²⁶.

Para su excreción, el retinol es primeramente oxidado a ácido retinoico vía retinal; esto ocurre en el intestino, en el hígado y en los órganos blanco. El ácido retinoico es transportado en el plasma unido a la albúmina sérica²⁷; esta forma de vitamina A es muy activa en el mantenimiento del crecimiento y reparación de los epitelios, siendo aproximadamente 10 veces más activa que el retinol en suprimir la queratinización de tráquea en cultivo²⁸; sin embargo, es inactiva en el mantenimiento de la espermatogénesis y en la visión. El ácido retinoico no puede ser reducido a retinal o retinol por el organismo.

Después de la oxidación del retinol, hay una isomerización de una doble ligadura del ácido retinoico, produciéndose el 13-cis ácido retinoico; éste tiene una actividad biológica similar a la del todo-trans ácido retinoico siendo menos tóxico que éste; ambos isómeros son reconocidos por la Proteína Celular Ligadora de Acido Retinoico (CRABP). Zile et al. encontraron en la mucosa del intestino delgado el glucorónido tanto del 13-cis ácido retinoico

como del todo-trans ácido retinoico sugiriendo que in vivo ambos isómeros son glucoronizados^{2p}. Los glucoronidos son los principales metabolitos de excreción de los ácidos retinoicos y son eliminados a través de la bilis. En jámsteres se ha demostrado que el todo-trans ácido retinoico y el 13-cis ácido retinoico son convertidos a sus glucoronidos, siendo una parte transformada en un metabolito común, el ácido 13-cis-4 oxoretinoico vía el ácido 13-cis-4 hidroxiretinoico, los cuales no presentan actividad biológica³⁰. Los derivados 4-oxo también son glucoronizados³¹. Una segunda vía de oxidación del ácido retinoico da lugar al ácido 5,6 epoxirretinoico, que ha sido identificado en la bilis, en la mucosa intestinal y en el riñón³². Aunque el ácido 5,6 epoxirretinoico in vivo sólo tiene un 0.5% de la actividad del retinol para el mantenimiento del crecimiento, in vitro sí presenta actividad de vitamina A.

Haenni y Bigler han identificado principalmente 3 metabolitos fecales del ácido retinoico, en los que las principales modificaciones son: una oxidación en el anillo en posición 4, una oxidación de los grupos metilos del anillo, y la formación de una infrecuente ligadura para dar ácido 9-cis-5 hidroxiretinoico³³. Otro metabolito biliar más recientemente descubierto es la retinotaurina, que es el ácido retinoico que ha sufrido una oxidación en el carbono 4 del anillo ciclohexano, una hidroxilación de un grupo metilo del anillo, una saturación de dos dobles ligaduras del lado de la cadena, una descarboxilación del carbono 15 y una oxidación del carbono 14, conjugado todo con taurina; este compuesto representa el

10% de la radioactividad total excretada en bilis. Se ha sugerido que los 3 metabolitos fecales descubiertos por Haenni y Bigler son intermediarios en la formación de la retinotaurina³⁴.

Otros estudios muestran que una parte de los metabolitos biliares del AR son reabsorbidos en el intestino, y puesto que algunos de ellos tienen actividad de vitamina A, pueden así contribuir al contenido total de la vitamina en el cuerpo³⁵.

También se ha observado que los carbonos C-14 y C-15 del retinol pueden ser oxidados a CO₂³⁶, y que los metabolitos urinarios tienen el extremo de la cadena lateral isoprenoide cortada o parcialmente saturada³⁶.

4. FISILOGIA.

La vitamina A es un nutriente esencial para los animales superiores. En base al efecto de las deficiencias de este factor, en los mamíferos se ha sugerido que varias funciones son llevadas a cabo por la vitamina A las cuales son:

1. Aporta el cromóforo 11-cis retinal en la visión nocturna,
2. Actúa en la diferenciación y crecimiento de los tejidos epiteliales,
3. Mantiene la fisiología normal de las gónadas y del embarazo,
4. Interviene en el crecimiento de los huesos,
5. Regula el funcionamiento de las glándula tiroides e hipófisis.

De estas funciones poco se conoce sobre su acción a nivel bioquímico, a excepción de su papel en la visión nocturna como un

cromóforo en los procesos visuales.

La Rodopsina, que es el pigmento visual receptor en la visión con baja intensidad luminosa o escotrópica, se encuentra en los bastoncillos de la retina de muchos mamíferos, y está compuesta de la proteína Opsina y el 11-cis retinal. Cuando la rodopsina está expuesta a la luz el 11-cis retinal se transforma en todo-trans retinal por medio de una reacción estrictamente fotoquímica, lo cual trae como consecuencia toda una serie de cambios moleculares que finalizan en la disociación de la molécula, para dar opsina y todo-trans retinal libres. El todo-trans retinal a su vez se transforma en todo-trans retinol que es la forma de vitamina A como se acumula. Esto viene a construir el activador molecular que produce una serie de cambios electrofisiológicos en la retina, que se traducen en impulsos en las terminaciones del nervio óptico, los cuales son transmitidos al cerebro⁵.

La rodopsina en la obscuridad puede ser regenerada desde opsina y todo-trans retinal. Este último puede nuevamente sufrir una isomerización para dar 11-cis retinal a través de una secuencia de reacciones enzimáticas en las que intervienen dos enzimas, la retinal reductasa y la retinol isomerasa. El 11-cis retinal entonces se combina con la opsina para producir la rodopsina, completando así el ciclo visual.

La función de la vitamina A en la visión se diferencia claramente de la que tiene en el metabolismo. En las otras 4

funciones están involucradas las dos formas metabólicas de la vitamina A, el retinol y el ácido retinoico, los cuales pueden actuar ya sea en el núcleo celular alterando la expresión de la información genética de las células epiteliales, controlando así su diferenciación, o funcionar extranuclearmente en el retículo endoplásmico o en la membrana celular. En ambos casos parece ser que la vitamina A controla la síntesis de glicoproteínas específicas.

En relación a la acción nuclear de la vitamina A, se ha observado que ésta controla la diferenciación de los epitelios, disminuyendo la expresión del epitelio escamoso estratificado y estimulando la del epitelio mucoso. En la deficiencia de vitamina A el epitelio mucoso cambia a escamoso queratinizado; cambios en dirección opuesta también pueden ocurrir, como lo observaron Fitton-Jackson y Fell, quienes cultivaron piel de embrión de pollo de 12 días de edad en un medio con vitamina A; esto produjo que el epitelio de la piel cambiara de escamoso queratinizado a ciliado mucoso. Cuando se transfirió de regreso a un medio libre de vitamina A se revirtió el proceso, y las células basales empezaron a producir nuevamente filamentos de queratina³⁷. Esta acción de la vitamina A es ejercida en el núcleo celular³⁸, determinando el tipo de queratina por sintetizar y el contenido correspondiente de RNAm para esa queratina. Asimismo, se ha demostrado que la deficiencia de vitamina A puede reducir la síntesis de DNA, RNA y proteínas en diferentes tejidos, tales como los del hígado, intestino, testículo y oviducto, siendo este efecto reversible con la administración de

acetato de retinilo³⁹⁻⁴⁰.

En el mantenimiento de la fisiología normal de las gónadas y del embarazo, la acción de la vitamina A también puede ser a través de la estimulación de los tejidos germinales y embrionarios por diferenciarse, semejante a lo que ocurre en la diferenciación de los epitelios, es decir, afectando la expresión del genoma para producir y suprimir proteínas específicas. Se ha observado que ratas hembras deficientes en vitamina A pueden ser fecundadas pero reabsorben el feto, y que en las aves el huevo aunque fertilizado, no se desarrolla más allá del segundo día⁴².

Lo opuesto a la diferenciación, es decir la regresión y reabsorción de los tejidos, han sido frecuentemente descritas como un efecto del exceso de retinol o ácido retinoico, como ocurre en el hueso y cartilago. En explantes fetales de cartilago de rata, el exceso de ácido retinoico induce cambios específicos en el patrón de síntesis de proteínas, sugiriendo que en el curso de la reabsorción del cartilago provocada por los retinoides se efectúa un cambio en la expresión genética; asimismo, para que el ácido retinoico efectúe tal reabsorción es necesario que la célula pueda llevar a cabo síntesis de RNA y proteínas⁴³.

Las proteínas ligadoras juegan un papel muy importante en llevar el retinol y el ácido retinoico hasta el núcleo celular.

La vitamina A tiene efectos sobre las membranas celulares en general, y en particular ejerce acción sobre la permeabilidad y la adhesión celular, así como en la interacción célula-célula. En la

diferenciación celular, cuando se llega a la diferenciación en queratinocitos, la membrana celular se vuelve más permeable, la célula pierde poder reductor y los grupos SH se oxidan a S-S, lo que conduce a la producción de queratina insoluble. Cuando se agrega ácido retinoico a queratinocitos en cultivo, se inhibe todo el proceso de la diferenciación terminal; sin embargo, la adición de un detergente, el cual hace más permeable la membrana celular, revierte la acción del ácido retinoico⁴⁴.

Por otro lado, se ha observado que la metaplasia escamosa que se presenta en la piel de pollo cultivada en ausencia de vitamina A, está acompañada de pérdida de uniones intercelulares; al incluir ácido retinoico en el medio de cultivo, se duplican estas uniones⁴⁵.

Otra propiedad de las membranas celulares, tal como la adhesividad que presentan las células en cultivo, es afectada por la vitamina A: el tratamiento con ácido retinoico de células oncogénicas en cultivo, las cuales muestran una menor adhesión al sustrato, resulta en un alineamiento más ordenado, así como en una mayor adhesividad⁴⁶. Algunas células oncogénicas no contienen proteínas celulares ligadoras del retinol ni de ácido retinoico; sin embargo, tanto el retinol como el ácido retinoico provocan un aumento en la adhesividad de estas células, lo cual sugiere fuertemente que estos retinoides actúan principalmente a nivel de la superficie de la membrana celular⁴⁷. Esta acción se obtiene, al menos en parte, por tener la glicoproteína fibronectina unida a la membrana celular⁴⁸; el ácido retinoico también estimula la

síntesis de esta glicoproteína⁴⁹.

Por otra parte, la vitamina A también afecta la fluidez de la membrana celular: en el proceso de diferenciación de las células de carcinoma embrionario que es estimulado por el ácido retinoico, hay una reducción en la fluidez de la membrana⁵⁰. Asimismo, las membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas alimentadas durante 2 meses con una dieta alta en vitamina A, mostraron una fluidez significativamente menor que las de los animales controles; así, esta reducción en la fluidez de la membrana se correlaciona negativamente con el contenido de vitamina A en ella⁵¹.

La vitamina A es necesaria para el crecimiento celular, el cual es regulado por factores polipeptídicos que se unen a receptores específicos de la superficie celular. Se ha reportado que el ácido retinoico estimula fuertemente la unión a la célula del factor de crecimiento EGF; este efecto se logra mediante el aumento del número de receptores en la superficie celular⁵².

La evidencia hasta hoy presentada sugiere que la función de la vitamina A en la superficie celular es ejercida principalmente a través de un efecto en las glicoproteínas de ésta. Además, muchos experimentos han mostrado la acción de la vitamina A sobre las glicoproteínas: se ha observado la pérdida de algunas glicoproteínas en animales deficientes en vitamina A, y la recuperación de ellas al suministrar la vitamina⁵³; también se han observado cambios en glicoproteínas específicas en células cultivadas en ausencia y presencia de la vitamina⁵⁴. Se ha reportado que la vitamina A en

forma de retinol-fosfato-manosa, interviene en la remanosiación de glicoproteínas específicas, después de que el oligosacárido ha sido transferido a la proteína lo cual resulta en glicoproteínas con alto contenido de manosa⁵⁵. Asimismo, se ha encontrado *in vitro* que en microsomas de ratas deficientes en vitamina A, hay una reducida transferencia del oligosacárido GlcNAc2 Man9 Glc3 desde el transportador dolicol-fosfato a la proteína receptora; esto podría explicar la acumulación de oligosacáridos unidos a dolicol-fosfato, y la reducida glicosilación de proteínas en tejidos deficientes en vitamina A. La adición de retinol-fosfato o la preincubación de los microsomas con éste, no tiene ningún efecto en la glicosilación⁵⁶. El mecanismo por el cual la vitamina A afecta esta transferencia del oligosacárido a la proteína aún no ha sido establecido, pero es posible que la vitamina afecte la expresión del gen de la glicosil transferasa, controlando así la biosíntesis de glicoproteínas.

5. HIPOVITAMINOSIS A.

Los signos de deficiencia de vitamina A pueden desarrollarse si en cualquier eslabón de la cadena metabólica se impide el acceso de la vitamina a los tejidos. Los posibles mecanismos responsables de la hipovitaminosis A son: a) contenido inadecuado en la dieta; b) por absorción inadecuada, que puede ser debida a una pobre emulsificación por deficiencia de ácidos biliares, como ocurre en ictericia obstructiva, o por defectos en la absorción de las grasas, como en la enfermedad celiaca; c) también se puede producir

hipovitaminosis A por alteraciones en el mecanismo de transporte, como por ejemplo en la alipoproteinemia beta; y d) por una deficiente conversión de retinol en ácido retinoico, lo cual ocurre en algunas enfermedades de la piel?

La deficiencia de vitamina A provoca las siguientes alteraciones: i) Defectos en la visión nocturna: hay una adaptación anormal a la obscuridad; ii) Anormalidades en el tejido óseo: hay una desorganización en el crecimiento del hueso, así como fallas en la reabsorción durante el remodelamiento, dando lugar secundariamente a la compresión de nervios; iii) Incremento en la presión del líquido cefalorraquídeo; iv) Alteraciones en la reproducción: en ratas se ha observado que hay un cese de la espermatogénesis en los machos y una reabsorción de los fetos en las hembras; v) Metaplasia escamosa de los epitelios mucosos, que incluyen el epitelio de revestimiento de la porción superior e inferior del aparato respiratorio, del aparato genitourinario, del ojo y glándulas paraoculares, de las glándulas salivales, y de las glándulas accesorias de la lengua y de la cavidad bucal.

En la deficiencia de vitamina A se presentan alteraciones de los ojos, que en conjunto se denomina xeroftalmia: inicialmente hay sequedad y opacidad de la conjuntiva, a lo cual se denomina xerosis; la córnea se pone seca, rugosa y turbia por alteraciones intrínsecas, y hay carencia de lágrimas debido a la obstrucción de los conductos; esto es seguido por ulceración y destrucción de la córnea (queratomalacia), lo cual puede conducir rápidamente a la

ceguera^{37,38}.

Además, en estudios clínicos se ha reportado la presencia de anemia como consecuencia de la deficiencia de vitamina A. Esta anemia es probablemente debida a una disminución de la síntesis de hemoglobina, causada por un impedimento en la movilización del hierro del hígado al tejido hematopoyético; el papel de la vitamina A en la movilización del hierro es aún desconocido³⁹.

6. HIPERVITAMINOSIS A.

Cuando la ingestión de vitamina A excede los requerimientos básicos y sobrepasa la capacidad del organismo para almacenar fisiológicamente la vitamina, se producen diversos trastornos como resultado de la alta toxicidad de este factor.

Los casos reportados de intoxicación por vitamina A en el humano raramente son el resultado de la ingestión de alimentos naturales. La causa más común de intoxicación por este factor se debe al prolongado consumo de suplementos vitamínicos, los cuales son adicionados a la dieta normal, con la idea errónea de que esto ayudará a mantener una buena salud y a contrarrestar enfermedades. Asimismo, la toxicidad producida por la hipervitaminosis A se ha incrementado en los últimos años, debido no sólo a fadismos alimenticios, sino también a su uso en ciertas condiciones dermatológicas, tal como el acné, así como en el hipogonadismo relacionado con el alcoholismo, y en la prevención del cáncer.

En el hombre, los signos de toxicidad aguda por vitamina A

incluyen náusea, vómito, dolor de cabeza, papiledema, descamación de la piel, ataxia, letargo, desorientación visual, alopecia, hiperlipemia, anorexia y hemorragias. También se ha reportado efectos tetratogénicos e incluso la muerte de un neonato.⁶⁰

La hipervitaminosis A crónica puede producir esplenomegalia, daños hepatocelulares y fibrosis hepática. Las manifestaciones clínicas usuales del hígado son: hepatomegalia, cirrosis e hipertensión portal con ascitis. A nivel celular, las células estrelladas presentan numerosas vacuolas de lípidos y un estado de transición a formas fibroblásticas; el retículo endoplásmico rugoso es más activo en la síntesis de la colágena. También pueden presentarse daños en la barrera sinusoidal y deposición de material de las membranas basales en los espacios perisinusoidales⁶¹. En los hepatocitos también ocurren cambios patológicos, como son la inestabilidad de las membranas lisosomales, lo cual conduce a la liberación de enzimas, incremento de citolisosomas e hinchazón de las mitocondrias⁶¹. Las anomalías funcionales del hígado generalmente consisten en ligeros cambios de las fosfatasa alcalinas, elevación de las transaminasas, retención de la sulfobromoftaleína y elevación del tiempo de protrombina. Recientemente se ha encontrado en el hombre que aún moderadas cantidades de vitamina A (20 000 a 45 000 UI diarias), cuando se ingieren por largos períodos (7 a 10 años), pueden causar daño hepatocelular significativo⁶².

También en el hueso la toxicidad de la vitamina A causa algunas

anormalidades: provoca una rápida reabsorción ósea, afectando al esqueleto y, más específicamente, el remodelamiento óseo. Estas anormalidades incluyen destrucción de la matriz ósea y un incremento en el recambio mineral del hueso⁶³.

En animales, el exceso de vitamina A en la dieta causa una aceleración de la reabsorción ósea, que resulta en fragilidad ósea y fracturas espontáneas, exoftalmia, engrosamiento temporal de la piel, alopecia, eritema, formación de células mucosas en las membranas queratinizadas, hemorragias y disminución del crecimiento⁶⁴⁻⁶⁷. Por otro lado, hay evidencia considerable del efecto teratogénico de la vitamina A suministrada en altas dosis al ratón, rata, jámster y cobayo. Las malformaciones incluyen fisura palatina, costillas fusionadas, columna vertebral bifida, meningocefalia, hidronefrosis y anormalidades cardíacas y genitourinarias^{64,68}. En la rata se producen fracturas y hemorragias uterinas, las cuales parecen ser una manifestación especial de la facilidad con que se presentan hemorragias en esta hipervitaminosis⁶⁷. La administración de grandes dosis de retinol a ratas jóvenes durante 2 días, causa un incremento en los niveles de lípidos, glucógeno y citrato en el hígado, así como una marcada estimulación de la gluconeogénesis^{69,70}.

Se ha reportado que el retinol y el ácido retinoico libres afectan las membranas celulares. Cantidades anormales de vitamina A se combinan con lipoproteínas de la membrana, y después con una proteína exógena para lisar células de diferentes tejidos y

organelos celulares^{74,72}. La acción inicial de exceso de retinol sobre los eritrocitos es una expansión de la membrana celular, seguida por hemólisis⁷¹. Los eritrocitos son rápidamente destruidos cuando son tratados a 37°C con 10 µg o menos de vitamina A/ml^{73,74}. Las enzimas lisosomales son liberadas por exceso de vitamina A, tanto in vitro como in vivo⁷⁵.

Recientemente se ha reportado que uno de los factores potencializadores más comunes de la toxicidad de la vitamina A, es el abuso en la ingestión del alcohol^{76,77}. Asimismo, el hidroxitolueno butilado (BHT), un antioxidante empleado en la industria de los alimentos, también potencializa la toxicidad de la vitamina A en ratas, además de reducir aceleradamente las reservas hepáticas de esta vitamina⁷⁸.

Se ha sugerido que las manifestaciones clínicas de hipervitaminosis A, resultan cuando la cantidad de proteína ligadora de retinol es insuficiente para ligar todo el retinol, quedando así la membrana celular expuesta a la vitamina libre⁶⁸.

7. REQUERIMIENTOS DE VITAMINA A EN LA RATA

En la rata el requerimiento de vitamina A ha sido determinado utilizando animales deficientes en este factor y observando el efecto del suministro de diferentes niveles de la vitamina sobre 3 parámetros principales: 1. Recuperación de la velocidad de crecimiento, 2. Disminución de la presión del líquido cefalorraquídeo, y 3. Eliminación de metaplasia escamosa en el ducto

nasolacrimal⁷⁰.

El requerimiento de vitamina A de la rata es afectado por diferentes factores, como son:

a) Efecto del ciclo de vida: los requerimientos nutricionales de la mayoría de las especies animales, cambian con las diferentes etapas del ciclo de vida; esto también ocurre con los requerimientos de vitamina A de la rata. Al igual que otros mamíferos, ésta nace con muy bajos niveles de vitamina A hepática, y puesto que su crecimiento en esta etapa es muy rápido su requerimiento de esta vitamina es mayor que el del adulto. Henry et al. estimaron que las madres requieren durante la lactancia alrededor de 15 UI diarias de vitamina A preformada, y que ésta es secretada en la leche materna⁸⁰.

Durante la etapa de crecimiento, la utilización de la vitamina A, definida como la velocidad de vaciamiento de las reservas hepáticas y renales, presenta una relación lineal directa con la velocidad de crecimiento del animal⁸¹.

Por otro lado, se ha demostrado que la necesidad de vitamina A está más relacionada con el peso corporal que con la ingestión de energía⁷⁰. Esta relación es consistente con la función de la vitamina A en el mantenimiento de los epitelios, los cuales cuantitativamente están directamente correlacionados con la masa corporal.

b) Efecto de los factores nutricionales: la presencia y concentración de algunos factores nutricionales en la dieta, pueden afectar el metabolismo de la vitamina A. El almacenamiento hepático de ésta, así como su liberación hacia los tejidos extrahepáticos y su utilización por éstos, pueden incrementarse o disminuirse dependiendo de los niveles de proteínas, lípidos, vitaminas D y E, ácidos grasos insaturados y zinc presentes en la dieta y/o en el organismo⁸².

Así, la deficiencia de proteína puede resultar en una reducción de vitamina A sérica y tisular, debido a que la RBP no puede ser sintetizada en cantidades normales^{83,84}. Las reservas hepáticas de vitamina A de ratas deficientes en este factor, a las que posteriormente se les suministró acetato de retinilo, se incrementaron cuando la proteína dietética se aumentó de un 10% a un 20%, pero ya no se incrementó más cuando la proteína dietética se elevó a 40%⁸⁵.

Debido a que la vitamina A es liposoluble, la presencia de otros lípidos (triglicéridos y fosfolípidos) en la dieta básica es muy importante para su absorción y utilización normales. También en ratas, cuando a una dieta sin grasa se añadió 10% de aceite de algodón, la absorción de vitamina A produjo un mayor crecimiento⁸⁶.

El zinc es requerido para la liberación de la vitamina A del hígado, pero no para su almacenamiento en el mismo. En ratas deficientes tanto en vitamina A como en zinc, el suplemento de esta vitamina A causó acumulación de ella en el hígado, pero los

niveles plasmáticos se incrementaron sólo ligeramente. Sin embargo, el suplemento de vitamina A y zinc provoca aumento tanto en los niveles hepáticos como plasmáticos de la vitamina⁸⁷.

Por otra parte, algunos xenobióticos tales como el etanol, el fenobarbital y el hidroxitolueno butilado, disminuyen significativamente las reservas hepáticas de vitamina A. Las consecuencias de esta reducción dependen del nivel de vitamina A suministrado en la dieta: con niveles dietéticos marginales de vitamina A, estas drogas pueden tener efectos antinutricionales debido a la aceleración en la disminución de las reservas hepáticas de vitamina A, mientras que con niveles excesivos de esta vitamina estos fármacos pueden incrementar la toxicidad de la vitamina porque aumentan la movilización o el metabolismo hepático de la misma, lo cual también provoca una reducción de sus reservas hepáticas.

El retinol movilizado del hígado hacia los tejidos debido a la ingestión de alcohol, no sólo se encuentra como retinol ligado a RBP, sino también como retinol asociado a lipoproteínas. Asimismo, es probable que después de la ingestión crónica de etanol, se incremente la secreción de lipoproteínas por el hígado.

c) Efecto de la forma de presentación en la dieta: la forma como la vitamina A se suministra a las ratas es importante debido a la inestabilidad de ella; se alcanzan niveles hepáticos mayores cuando esta vitamina se suministra como acetato de retinilo incluido en una matriz de gelatina, que cuando la misma cantidad de vitamina A se

agregada a la dieta disuelta en éter de petróleo^{7p}.

d) **Requerimientos en la rata adulta:** el requerimiento de vitamina A ha sido determinado utilizando animales deficientes en este factor, y observando el efecto del suministro de diferentes niveles de la vitamina en la recuperación de la velocidad de crecimiento, en la disminución de la presión del líquido cefaloraquídeo y en la eliminación de la metaplasia escamosa en el ducto nasolacrimal. En los primeros estudios se encontraron requerimientos de vitamina A muy elevados (12 000 UI/kg de dieta), quizás debido a que las dietas utilizadas eran deficientes en vitamina E, y posiblemente también en otros nutrientes, así como a la forma en que la vitamina se adicionó a las dietas^{8a}. Más recientemente se ha encontrado que se requieren entre 1100 y 2500 UI/kg de dieta, suministradas en forma de acetato de retinilo incluido en una matriz de gelatina, para eliminar los síntomas de deficiencia^{8p,9a}. Debido a la inestabilidad de la vitamina A y a la variabilidad del requerimiento de la rata bajo diferentes condiciones ambientales, se ha recomendado que las dietas deben contener cuando menos 4 000 UI/kg de vitamina A para crecimiento y mantenimiento^{7p}, nivel que puede rebasar hasta 4 veces el mínimo requerido por el animal.

SEGUNDA PARTE

SECCION EXPERIMENTAL

A. OBJETIVO

Los requerimientos dietéticos de vitamina A para la rata han sido establecidos en base a los niveles necesarios para prevenir síntomas de deficiencia de esta vitamina. Más aún, sobre estos niveles se ha sugerido un pequeño exceso para cubrir las fluctuaciones en las necesidades de esta vitamina en el animal^{7P}; sin embargo, es sabido que los requerimientos de animales no deficientes en vitamina A son menores que los de los deficientes; pero si se agregan niveles extras, puede resultar una dieta con un considerable exceso de vitamina A, lo cual puede provocar una hipervitaminosis A crónica en animales alimentados con dietas de mantenimiento por largos periodos.

Granados et al. han establecido que niveles moderadamente altos de vitamina A adicionados a las dietas de mantenimiento (5 000 a 30 000 UI %) provocan en el jámster dorado (Mesocricetus auratus auratus) cálculos biliares pigmentarios aproximadamente en 50 días, con una frecuencia dependiente de la dosis; estos animales no desarrollan síntomas de hipervitaminosis A, con excepción de una ligera alopecia dorsal^{01,02}. Los niveles hepáticos de vitamina A en esos animales llegan a ser de 850 a 2 000 µg/g de hígado. Esto sugiere que pueden presentarse sutiles alteraciones bioquímicas producidas por una ligera hipervitaminosis A, que no se manifiestan clínicamente. Además también sugiere que la utilización de animales

con hipervitaminosis A asintomática, puede afectar los resultados de otros experimentos que se realicen con dichos animales.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue establecer los niveles hepáticos de vitamina A de ratas de diferentes edades, alimentadas con la dieta de mantenimiento para roedores "Nutricubos Purina". Estos resultados serán comparados con los que se obtengan en un trabajo que ya ha comenzado a realizarse en jámsteres de las mismas edades, lo cual es de importancia para el avance de las investigaciones que sobre la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster, se han venido desarrollando en este laboratorio.

B. MATERIAL Y METODOS

En los dos experimentos reportados en el presente estudio se emplearon ratas albinas (Rattus norvegicus albinus) de la cepa Sprague-Dawley, de ambos sexos y de 3 diferentes edades. En el primer experimento solamente se determinó vitamina A hepática en animales de tres diferentes edades; en el segundo experimento se repitió lo realizado en el primero, y se determinó vitamina A plasmática, transaminasas GOT y GPT, como prueba de función hepática. Además, se llevó un control del peso semana de las ratas a partir de su destete, para establecer las curvas de crecimiento como un parámetro de estado de salud de los animales. Estas ratas proceden de la colonia del bioterio de la Facultad de Ciencias, y

fueron mantenidas en el mismo bioterio en jaulas de acrílico de 30 x 43.5 x 19 cm con tapa de acero galvanizado, bajo periodos de iluminación y temperatura ambientales. En cada jaula fueron alojadas de 4 a 5 ratas, y se empleó aserrín como material de nidal.

Los animales fueron alimentados con Nutricubos Purina para Roedores Pequeños (Purina S. A. de C. V., México, D. F.) y agua corriente ad libitum durante todo el experimento. Este alimento es usado como dieta de mantenimiento en este bioterio, y contiene 12 500 UI de vitamina A por kilogramo, según especificación proporcionada por los productores.

1.- Primer Experimento.

Se emplearon 20 hembras y 20 machos de 26, 90 y 210 (± 5) días de edad promedio, excepto para los machos de 210 días de edad, de los que sólo se disponía de 14 animales.

Para obtener las muestras de hígado, los animales fueron pesados y anestesiados con éter; se les hizo una incisión ventral y se cortó la aorta y cava inferiores para eliminar la mayor parte de sangre del hígado; inmediatamente después se disecó el hígado y se guardó en refrigeración a 0°C, y su contenido de vitamina A se analizó en el transcurso de los 3 días siguientes. El sacrificio de las ratas y el procesamiento de las muestras se realizó en semiobscuridad. Este experimento se llevó a cabo durante enero y febrero de 1988.

2.- Segundo Experimento.

En este experimento se emplearon 20 hembras y 20 machos de 22, 92 y 188 (± 1) días de edad promedio. Los animales fueron pesados semanalmente a partir del día de destete. El día del sacrificio los animales fueron anestesiados con éter y sangrados por punción cardíaca con jeringas de 5 ml y agujas de 21G, enjuagadas con EDTA al 20% a un pH de 7.4; la sangre (5 ml) se colectó en tubos con 5 mg de EDTA y se mezcló suavemente. Después del sangrado, a los animales se les practicó una incisión ventral y se cortaron la aorta y cava inferiores. Se diseccionó el hígado y se guardó en refrigeración a 0°C. La sangre fue centrifugada a 2 500 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman, modelo TJ-6; el plasma fue separado y dividido en 2 partes, para el análisis de transaminasas y de vitamina A plasmática; las muestras fueron mantenidas a 4 y 0°C, respectivamente, hasta el momento de los análisis, los cuales fueron realizados en el transcurso de los 3 días siguientes a la toma de las muestras. Tanto el manejo de las muestras como los análisis de vitamina A en hígado y plasma, fueron realizados en semiobscuridad.

Los animales de 22 días de edad fueron sacrificados en noviembre de 1988, mientras que los de 92 y 188 días lo fueron en enero de 1989.

Vitamina A hepática: la determinación de vitamina A se realizó siguiendo el método de Olson²³; cada hígado fue pesado en una balanza analítica modelo Mettler A30, colocado en una caja de Petri de 60 x 15 mm, y finalmente fue picado y mezclado homogéneamente. Se

tomó una alícuota de 0.5 g, la cual se colocó en un vial con tapón de rosca, y fue macerado junto con 1 g de sulfato de sodio anhidro, por medio de una varilla de vidrio, hasta formar una pasta; inmediatamente después se agregaron 5 ml de cloroformo. Los viales fueron tapados y mantenidos a 0°C durante toda la noche. Una alícuota de 100 a 300 microlitros del extracto clorofórmico (dependiendo de la concentración de éste) se llevó a 3 ml con etanol absoluto, en una cubeta de cuarzo de 3 ml de capacidad por 1 cm de paso. Se determinó la absorbancia a 380, 330 y 280 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQII. Finalmente, la cantidad de vitamina A en el hígado se calculó con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g retinol/g hígado} = 0.5 (2.27 \times A_{380} - A_{330} - A_{280}) \times \text{el Factor de Dil.} / 0.1835$$

donde 0.5 equivale al peso de la muestra de hígado y 0.1835 al coeficiente de extinción del retinol.

Vitamina A plasmática: la concentración de vitamina A en plasma se determinó por el método fluorométrico de Thompson⁶⁴. La calibración del espectrofluorómetro se llevó a cabo con un estándar secundario preparado en la siguiente forma: 10 mg de acetato de vitamina A se saponificaron con 1 ml de agua + 0.5 g de KOH durante 20 minutos en agua hirviendo al baño María; luego se enfrió, se añadió 1 ml de agua y se extrajo con 5 ml de hexano. Se colocaron 2 ml de extracto de hexano en una columna de cromatografía con 5 g de alumina neutra grado 1, debilitada con 0.2 ml de agua. La columna primero se eluyó con 50 ml de hexano, luego con 50 ml de éter etílico al 10% en hexano, y por último con 50 ml de éter etílico al

50% en hexano; ésta última fracción se colectó y evaporó, luego se diluyó con hexano hasta obtener una absorbancia de 0.2 U.O. a 325 nm, lo cual usando un coeficiente de extinción molecular al 1% en 1 cm de 1830 U. O. equivale a una concentración de 1 µg de retinol/ml.

De la solución anterior se hizo una dilución de 20 veces para obtener una concentración de 0.05 µg/ml, que se empleó como estándar de vitamina A, el cual es estable sólo durante unas horas; la fluorescencia de este estándar se leyó a longitudes de onda de 330 nm de excitación y 480 nm de emisión; al mismo tiempo se leyó una solución de sulfato de quinina de 0.01 µg/ml en 0.1 N de ácido sulfúrico; esta solución fue utilizada como estándar en posteriores determinaciones, ya que es estable.

Las muestras de plasma se analizaron por duplicado: se colocaron 300 µl de muestra en cada tubo y 300 µl de etanol; luego se añadieron 3 ml de hexano. Esta mezcla se agitó en vortex por 1 minuto, y se centrifugó por 5 minutos a 2 000 rpm a 0°C en una centrifuga Beckman modelo TJ-6. Todo el proceso se llevó a cabo en semioscuridad. La fluorescencia del extracto de hexano (sobrenadante) se leyó a 330 nm de excitación y 480 nm de emisión en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo LS-5.

L-Alanina: 2-oxoglutarato aminotransferasa plasmática: esta enzima fue determinada por el método de Reitman y Frankel²⁵; en un tubo de 100 x 13 mm fueron colocados 250 µl de la solución amortiguador-sustrato, la cual contenía 100 mM de amortiguador de fosfato de sodio a pH 7.4, 200 mM de DL-alanina y 2 mM de

alfa-cetoglutarato; se incubó por 5 minutos a 37°C, y posteriormente se agregaron 0.05 µl de plasma, continuándose la incubación por 30 minutos. Inmediatamente después se añadieron 250 µl de una solución 1.5 mM de 2,4-dinitrofenilhidracina, y se mantuvo 20 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este período se agregaron 2.5 ml de 0.4 N de NaOH y se determinó la absorbancia a 546 nm en el espectrofotómetro, entre 5 y 30 minutos después de agregar el NaOH. Las determinaciones se hicieron por duplicado y se leyeron contra un blanco, el cual consistía de la misma mezcla tratada de la misma manera, excepto que el plasma se agregó después de la solución de 2,4-dinitrofenilhidracina.

L-Aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa plasmática: esta enzima fue determinada por el método de Reitman y Frankel⁹³, y es igual al método para L-Alanina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, excepto que se emplearon sólo 25 µl de plasma y la solución amortiguador-sustrato contenía 100 mM de L-aspartato en vez de 200 mM de DL-alanina.

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando la prueba de "t de Student".

C. RESULTADOS:

1.- Primer Experimento.

Los resultados del 1er. experimento respecto al tamaño de los animales, peso del hígado y porcentaje de hígado respecto del peso corporal, pueden verse en la Tabla 1. Como era de esperarse, conforme avanza la edad de las ratas se incrementa su peso corporal, y el tamaño del hígado, siendo los incrementos mayores en los machos. En relación al peso porcentual del hígado, se observa en la Tabla 1 que tanto en machos como en hembras éste va disminuyendo al ir creciendo los animales, de tal modo que a los 210 días de edad se ha reducido el hígado en más de un 1% del peso corporal.

Los resultados respecto a la vitamina A hepática se presentan en la Tabla 2 y Figuras 1 y 2, las cuales muestran que las ratas de 26 días de edad exhiben niveles de vitamina A muy bajos, obteniéndose en machos y hembras un promedio de 28.3 μg de retinol/g de hígado, y una vitamina A hepática total de 54.7 μg de retinol/hígado. Las reservas hepáticas de vitamina A se incrementan rápidamente, pues a los 90 días de edad ya se presentan niveles considerados como normales; promediando los valores para machos y hembras se obtuvo una concentración de 213.3 μg de retinol/g de hígado y una vitamina A hepática total de 1469.9 μg de retinol/hígado. A los 210 días de edad, la vitamina A hepática se encuentra por arriba de niveles que algunos autores consideran como moderadamente elevados^{7p}, siendo en promedio 378.2 μg de retinol/g de hígado y 2867.9 μg de retinol/hígado.

La comparación de la vitamina A hepática en los dos sexos mostró que las hembras tuvieron concentraciones significativamente mayores ($P < 0.001$) que los machos en todas las edades estudiadas, mientras que la vitamina A hepática total fue muy similar ($P < 0.4$) en machos y hembras de 26 días de edad, ligeramente mayor en los machos que en las hembras a la edad de 90 días ($P < 0.05$), y mayor en las hembras que en los machos de 210 días de edad ($P < 0.02$).

TABLA 1
 Peso Corporal y Hepático de las ratas del primer experimento. *

Sexo	Edad (días)	n	Peso Corporal (g)	Peso del hígado (g)	Peso porcentual del hígado
dd	26	20	47.4 ± 8.6	2.18 ± 0.54	4.55 ± 0.59
pp	26	20	45.1 ± 7.2	1.87 ± 0.49	4.08 ± 0.54
dd	90	20	244.4 ± 32.9	6.4 ± 1.5	3.41 ± 0.25
pp	90	20	177.1 ± 20.8	5.94 ± 0.8	3.30 ± 0.33
dd	210	14	323.7 ± 22.4	9.09 ± 0.8	2.80 ± 0.18
pp	210	20	211.1 ± 10.8	6.63 ± 0.5	3.14 ± 0.18

* Media ± D. S.

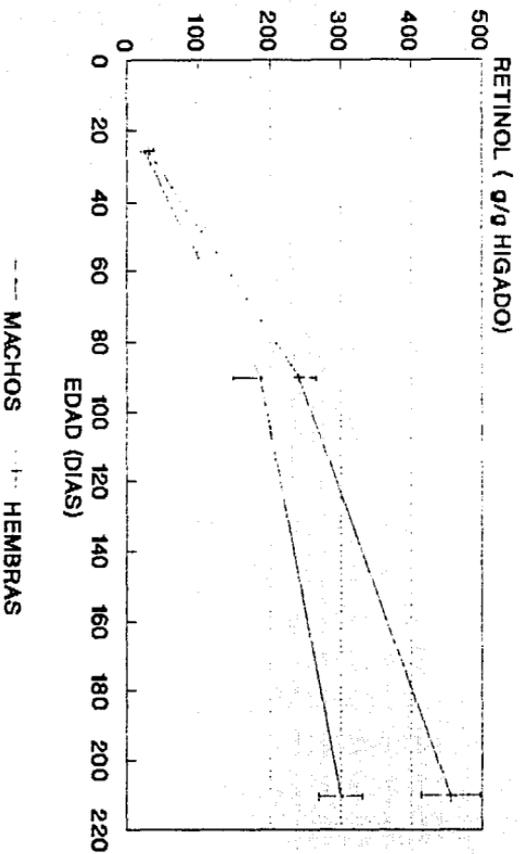
TABLA 2

Vitamina A hepática en las Ratas del primer experimento.

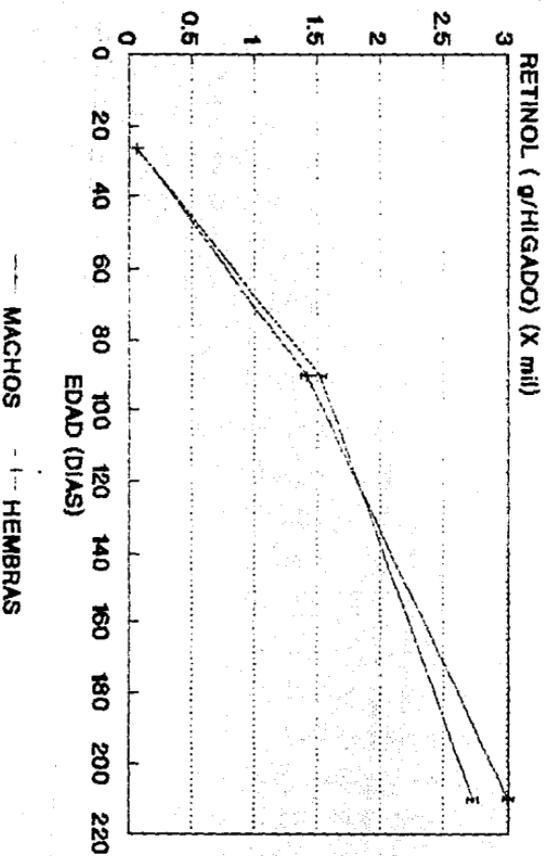
Sexo	Edad (días)	n	Vitamina A hepática (µg/ g de hígado)	Vitamina A hepática total (µg/ hígado)
♂♂	26	20	24.6 ± 6.2	54.7 ± 22.1
♀♀	26	20	32.06 ± 6.7	60.8 ± 22.5
♂♂	90	20	186.5 ± 37.8	1522.8 ± 200.5
♀♀	90	20	240.1 ± 23.1	1417.1 ± 107.2
♂♂	210	14	300.8 ± 33	2724.7 ± 306
♀♀	210	20	455.6 ± 43.6	3011.2 ± 325

* Medio ± D. S.

FIG.1 CONCENTRACION DE VITAMINA A
HEPATICA EN LAS RATAS
DEL PRIMER EXPERIMENTO



**FIG.2 VITAMINA A HEPATICA TOTAL
EN LAS RATAS DEL PRIMER EXPERIMENTO**



2.- Segundo Experimento:

En relación al peso corporal, peso del hígado y el peso porcentual del hígado, los resultados se presentan en la Tabla 3, en la cual se observa que, al igual que en el experimento anterior, el peso corporal y el del hígado se incrementan con la edad, siendo este incremento mayor en los machos que en las hembras. De igual manera, en este experimento se observó que el peso porcentual del hígado disminuye a medida que avanza la edad de los animales.

Respecto a la vitamina A hepática, los resultados pueden verse en la Tabla 4 y Figuras 3 y 4. Similarmente a lo ocurrido en el primer experimento, se observó un incremento tanto en la concentración como en la cantidad de vitamina A hepática conforme avanza la edad de los animales. Así, al promediarse los valores de hembras y machos se obtuvo una concentración y cantidad de retinol de 26.8 $\mu\text{g/g}$ de hígado y de 1605.5 $\mu\text{g/g}$ de hígado, y para los animales de 188 días de edad fueron de 396.1 $\mu\text{g/g}$ de hígado y 3225.5 $\mu\text{g/g}$ de hígado.

La comparación de la vitamina A hepática en los dos sexos, mostró que la concentración de ésta es similar en machos y hembras de 22 y 92 días de edad ($P < 0.7$ y $P < 0.2$, respectivamente), y superior en las hembras a la edad de 188 días ($P < 0.001$). La cantidad de vitamina A hepática fue similar en las ratas de ambos sexos de 22 y 188 días de edad ($P < 0.6$ y $P < 0.1$, respectivamente) y ligeramente mayor en los machos que en las hembras de 92 días ($P < 0.001$).

En cuanto a la vitamina A plasmática, ésta sólo se determinó en

ratas de 92 y 188 días de edad, debido a problemas técnicos en las ratas recién destetadas. Los resultados pueden verse en la Tabla 4, la cual muestra que los niveles de retinol plasmáticos son similares en las dos edades y en ambos sexos; sin embargo, existen pequeñas diferencias entre machos y hembras de 92 días de edad ($P < 0.01$) a favor de los primeros, y entre los machos de las 2 diferentes edades analizadas ($P < 0.01$), a favor de los de 92 días.

En este segundo experimento se determinaron las actividades de 2 transaminasas en plasma, para evaluar la función hepática. Los resultados, que se presentan en la Tabla 5 y figura 5, indican que no hay diferencias significativas en la actividad de la transaminasa glutámica oxaloacética (GOT) en las diferentes edades y sexos, excepto entre hembras de 92 y 188 días de edad ($P < 0.02$). Por otra parte, la actividad de la transaminasa glutámica pirúvica (GPT) se incrementó significativamente con la edad de los animales, tanto para hembras como para machos ($P < 0.001$ en todos análisis, excepto entre machos de 92 y 188 días de edad, con una $P < 0.005$), mientras que entre los sexos de la misma edad no hubo diferencias.

En relación al crecimiento como un parámetro fisiológico para evaluar el status de salud de un animal, en la Figura 6 se presentan las curvas de crecimiento de las ratas de 92 y 188 días de edad, las cuales muestran que el crecimiento de hembras y machos sigue una curva normal para ambas edades y sexos, alcanzando, como es sabido, mayores tallas los machos que las hembras.

TABLA 3

Peso Corporal y Hepático de las Ratas del segundo experimento.*

Sexo	Edad (días)	n	Peso Corporal (g)	Peso del hígado (g)	Peso porcentual del hígado
♂♂	22	20	37.49 ± 7.5	1.61 ± 0.4	4.27 ± 0.4
♀♀	22	20	33.97 ± 3.2	1.49 ± 0.2	4.37 ± 0.2
♂♂	92	20	238.48 ± 15.9	8.58 ± 1.5	3.5 ± 0.6
♀♀	92	20	169.58 ± 12.6	6.89 ± 4.04	4.04 ± 0.3
♂♂	188	17	323.1 ± 21.8	9.78 ± 0.7	3.03 ± 1.2
♀♀	188	20	208.9 ± 17.1	7.03 ± 0.9	3.37 ± 0.5

* Media ± D. S.

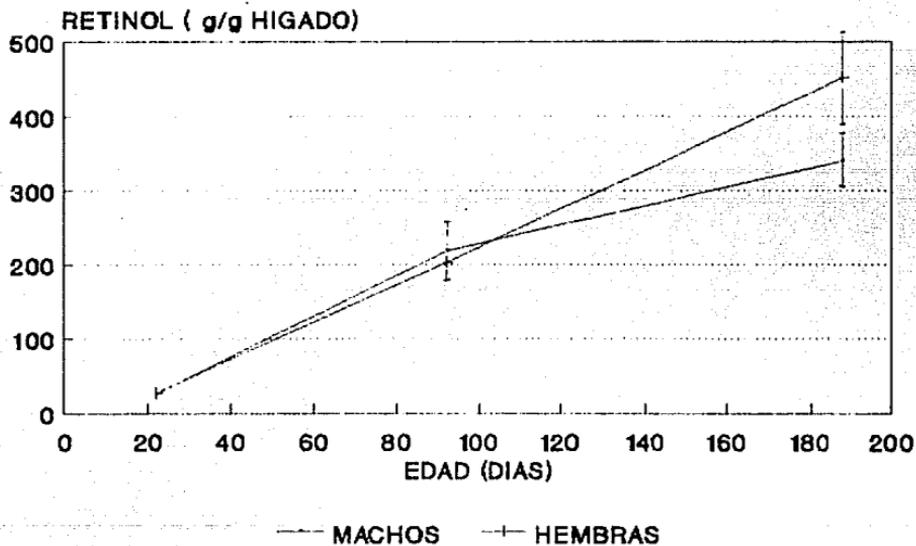
TABLA 4

Vitamina A Hepática y Plasmática de las Ratas del segundo experimento.*

Sexo	Edad (días)	n	Vitamina A hep. (µg/g de hígado)	Vitamina A hep. total (µg/híg.)	V. A Plasmática del hígado
♂♂	22	20	26.5 ± 5.2	41.6 ± 9.1	-----
♀♀	22	20	27.2 ± 6.1	40.0 ± 8.5	-----
♂♂	92	20	218.5 ± 37.1	1826.5 ± 1.5	29.77 ± 4.6
♀♀	92	20	202.4 ± 36.5	1384.6 ± 163.4	23.67 ± 8.0
♂♂	188	17	340.5 ± 36.5	3324.0 ± 383	25.46 ± 4.24
♀♀	188	20	451.7 ± 68.2	3126.9 ± 306.2	23.33 ± 3.57

* Media ± D. S.

**FIG.3 CONCENTRACION DE VITAMINA A
HEPATICA EN LAS RATAS
DEL SEGUNDO EXPERIMENTO**



**FIG.4 VITAMINA A HEPATICA TOTAL
EN LAS RATAS DEL SEGUNDO EXPERIMENTO**

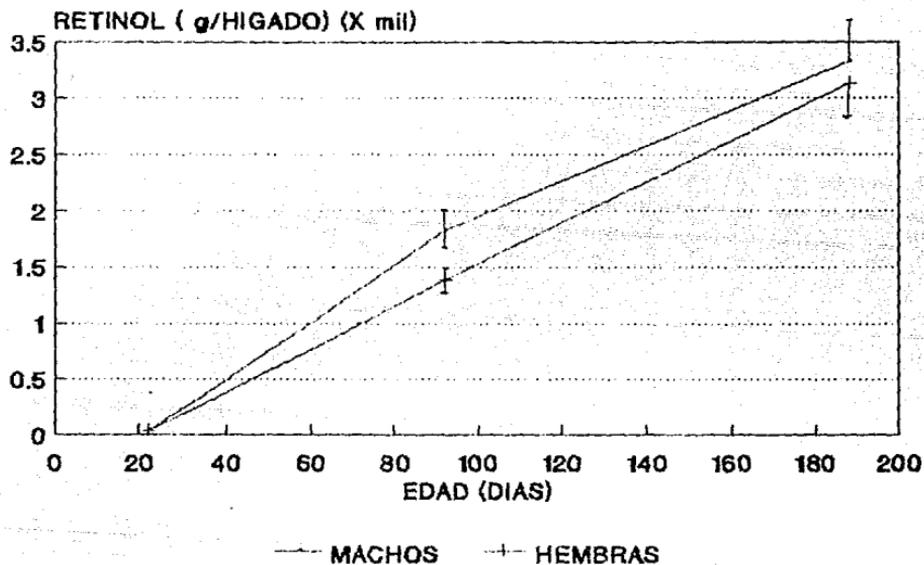


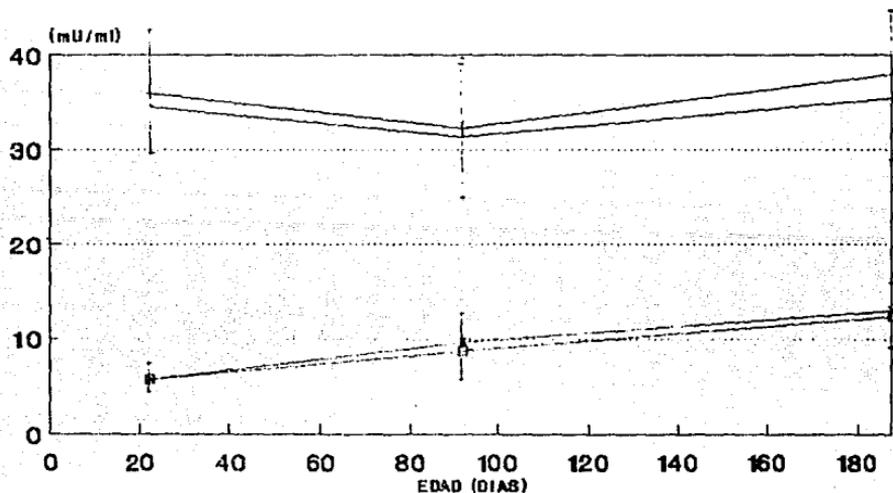
TABLA 5

Transaminasas GOT y GPT en plasma de ratas del segund experimento.*

Sexo	Edad (días)	n	G O T (mU/ml)	G P T (mU/ml)
♂♂	22	20	34.65 ± 5.00	5.745 ± 1.60
♀♀	22	19	35.95 ± 6.99	5.74 ± 1.49
♂♂	92	20	31.35 ± 6.65	9.68 ± 2.95
♀♀	92	20	32.25 ± 6.70	8.76 ± 2.39
♂♂	188	17	35.41 ± 6.78	12.87 ± 2.68
♀♀	188	20	37.95 ± 7.10	12.3 ± 3.38

* Media ± D. S.

FIG.5 TRANSAMINASAS GOT Y GPT EN PLASMA DE RATAS DEL SEGUNDO EXPERIMENTO



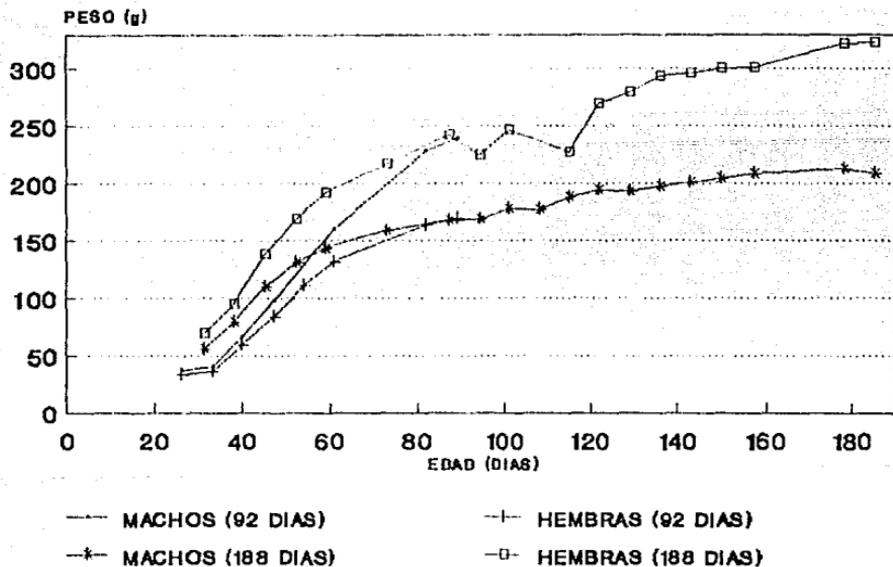
--- GOT (MACHOS)

---+ GOT (HEMBRAS)

---* GPT (MACHOS)

---□ GPT (HEMBRAS)

**FIG.6 CURVAS DE CRECIMIENTO
DE LAS RATAS DEL SEGUNDO EXPERIMENTO**



D. DISCUSION:

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la vitamina A hepática en la rata albina, alimentada con una dieta estándar de mantenimiento, se incrementa con la edad. Así, los animales recién destetados presentan un bajo contenido de vitamina A hepática, el cual se incrementa rápidamente, de manera que a la edad de 210 días las reservas hepáticas de vitamina A llegan a ser hasta 50 veces mayores que las de los animales recién destetados. Si aceptamos que una rata deficiente en vitamina A requiere aproximadamente 2 UI diarias de esta vitamina para restablecer el crecimiento normal⁶⁶, entonces las ratas de 210 días de edad en este estudio tuvieron suficiente vitamina A para 1 400 días, o sea más de 3.5 años, lo cual excede la longevidad esperada de la rata; sin embargo, para alcanzar una longevidad completa, según Moore se requieren 100 UI diarias⁶⁵, por lo que las reservas en el presente trabajo sólo hubieran alcanzado para 28 días.

Algunos autores consideran el nivel de 250 µg de retinol/ g de hígado como moderadamente alto⁷⁰; en nuestro estudio los animales de 210 días rebasaron este nivel entre un 20 a un 80%, lo cual indica que las dietas comerciales contienen niveles elevados de vitamina A. Este exceso de vitamina en las dietas comerciales (12 500 UI/kg en Nutricubos Purina par Roedores Pequeños y 30 000 UI/kg en Purina Mouse Chow No. 5015,⁶⁷) se debe a la recomendación de añadirla en niveles superiores a los requerimientos mínimos, por la variabilidad en las necesidades de los animales bajo diferentes condiciones, y

por la labilidad de la vitamina A a la luz y a la oxidación, pues anteriormente ésta era agregada a la dieta disuelta en aceite o éter de petróleo; sin embargo, actualmente la vitamina A se adiciona en una forma muy estable, como es el acetato de retinol en esferas de gelatina. Por otra parte, la variabilidad en las necesidades no justifica los niveles empleados, pues se excede por un margen considerable las necesidades de la rata. Por lo anterior, sería conveniente reducir el contenido de vitamina A en las dietas de mantenimiento para roedores, de tal manera que sólo se suministre las cantidades recomendadas (4 000 UI/kg de dieta)^{7p}, o ligeramente por arriba de éstas. Lo más conveniente sería poder mantener una reserva hepática de vitamina A constante en animales adultos; asimismo los resultados de la presente investigación sugiere que para el mantenimiento de la rata, se tengan dietas con diferentes contenidos de vitamina A: una para animales en crecimiento y otra para adultos.

En las ratas de este estudio no se encontraron síntomas de deficiencia ni de hipervitaminosis A. La capacidad del hígado para almacenar vitamina A se sabe que es muy grande, y que el nivel de este factor en el plasma se mantiene dentro de límites regulados por el hígado; esto fue observado en el segundo experimento de este estudio, pues a pesar de haber una diferencia considerable en las reservas hepáticas de vitamina A, los niveles plasmáticos de ésta se mantuvieron muy similares.

Tampoco se encontraron diferencias en los sexos en ninguna de las edades estudiadas. Por otra parte, recientemente se ha

encontrado que quilomicrones cargados con vitamina A, a niveles alcanzados postprandialmente en humanos que ingieren una o dos Provisiones Diarias Recomendadas, inducen una diferenciación terminal de células leucémicas HL-60 y reducen su crecimiento¹⁰⁰; esto señala que los niveles postprandiales alcanzados pueden tener efectos distintos a los de los niveles plasmáticos de retinol, lo cual pudiera reflejarse no sólo en células leucémicas sino también en otros tejidos, por lo que se podría hablar de una hipervitaminosis postprandial en humanos, pero de tipo crónico en animales mantenidos con dietas que contienen de 3 a 7 veces la Provisión Diaria Recomendada de vitamina A. Sin embargo, se requiere de más estudios para determinar si esto realmente ocurre.

Variaciones en el status de vitamina A en el organismo, o el efecto crónico de altos niveles postprandiales de ésta podrían provocar diferencias a nivel bioquímico en la rata: por ejemplo, cambios en la fluidez de la membrana celular⁵¹ y/o alteraciones en la actividad de enzimas de la glicólisis⁷⁰. En el jámster dorado se ha encontrado que dosis moderadamente altas no producen síntomas macroscópicos de hipervitaminosis A; sin embargo, estos animales desarrollan cálculos biliares pigmentarios⁹¹, lo cual indica que las alteraciones a nivel bioquímico se presentan antes que las alteraciones macroscópicas.

En el segundo experimento se determinaron transaminasas para evaluar la función hepática, encontrándose que la GOT no cambió en los animales de las diferentes edades; sin embargo, la GPT, cuya

elevación en el suero es más indicativa de daño hepático que GOT, se incrementó ligera pero significativamente con la edad. Si esta elevación de GPT refleja afección hepática por los niveles de vitamina A o es fisiológicamente normal, sólo podrá establecerse en estudios con dietas que contengan niveles controlados de la vitamina.

Por otra parte, se ha reportado la interacción de la vitamina A con otros factores, tales como el etanol, el zinc y la vitamina E, entre otros, por lo que el status de vitamina A es especialmente importante en estudios que impliquen estos factores. También es importante tener en cuenta los altos niveles dietéticos de vitamina A en estudios en los que se requiera mantener los animales en experimentación por largos periodos, pues podría presentarse una hipervitaminosis A crónica subclínica que confunda los resultados.

A pesar de lo anteriormente expuesto, es también probable que las ratas mantenidas con dietas semejantes a la del presente estudio que contengan niveles similares vitamina A, no sean afectadas por la acumulación de ésta en el hígado ni por una probable hipervitaminosis A postprandial, y que lo establecido en este estudio sea el status fisiológicamente normal de vitamina A en la rata alimentada con Nutricubos Purina.

De la comparación de la concentración hepática de vitamina A en los dos sexos, se puede mencionar que ambos experimentos mostraron que las hembras adultas tienen una mayor concentración de vitamina A. Probablemente esta acumulación de retinol por las hembras se inicie desde el destete, pues en el primer experimento hubo una

diferencia pequeña ($\approx 8 \mu\text{g}$ de retinol), pero significativa en los sexos a favor de las hembras recién destetadas, la cual fue aumentando hasta llegar a ser notable a los 210 días de edad ($155 \mu\text{g}$ de retinol); que algunas veces estas diferencias no sean significativas sino hasta edades de más de 90 días, lo comprueba el 2o experimento.

Posiblemente las diferencias en concentración de vitamina A en los sexos sea debida a la necesidad por parte de las hembras de una mayor cantidad de esta vitamina para la gestación y la lactancia; sin embargo, también podría ser sólo parte del dimorfismo sexual que se presenta en estos animales, pues aunque los machos son de mayor tamaño, concentran más vitamina A en su hígado más pequeño.

Respecto a la vitamina A hepática total, se puede mencionar que ésta tiende a ser semejante en los dos sexos a pesar de que los machos son mayores en tamaño corporal y hepático, lo cual confirma que las hembras almacenan más vitamina A que los machos.

Aunque la acumulación de vitamina A en términos de tiempo no es lineal, sí se aproxima a una recta, por lo que se realizó un ajuste por mínimos cuadrados de los valores obtenidos tanto para machos como para hembras en los dos experimentos, con el fin de tener una idea de la cantidad de vitamina A que se acumula por día (pendiente de la recta): para el primer experimento se obtuvo que los machos acumularon aproximadamente 14 UI/día , mientras que las hembras almacenaron aproximadamente 16 UI/día ; en el segundo experimento se obtuvieron valores de 19.5 y 18.5 UI/día para machos y hembras,

respectivamente. Si se considera que una rata adulta come en promedio 16 g diarios (rango de 12 a 20 g^{po}) de alimento empastillado, y que los Nutricibus Purina contienen 12 500 UI%, entonces una rata adulta ingiere aproximadamente 200 UI de vitamina A por día, o sea que almacena entre el 8 y 9% de la dosis ingerida. El resto de la dosis diaria debe ser empleado por el animal para su metabolismo, y una parte debe perderse por destrucción o por no absorberse del tracto gastrointestinal.

E. CONCLUSIONES

En el presente estudio se han establecido los niveles hepáticos de vitamina A de ratas albinas recién destetadas, de 3, 6 y 7 meses de edad, encontrándose en resumen lo siguiente:

- a) La vitamina A hepática total en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta estándar de mantenimiento, se incrementa casi linealmente con la edad, en el rango de 22 a 210 días de edad.

- b) La Transaminasa glutámica pirúvica se incrementa ligera pero significativamente con la edad.

- c) Las ratas hembras adultas de más de 6 meses de edad, presentaron una mayor concentración de vitamina A hepática; sin embargo, el nivel de vitamina A hepática total es similar en ambos sexos.

TERCERA PARTE
RESUMEN GENERAL Y BIBLIOGRAFIA

A. RESUMEN:

La presente investigación consta de dos experimentos realizados con el objeto de determinar el contenido hepático de vitamina A de ratas de diferentes edades, alimentadas con una dieta de mantenimiento para roedores, y así evaluar el status de esta vitamina en estos animales. Este trabajo consta de 3 partes:

Primera parte: Se hace un resumen general sobre la nutrición de los animales de laboratorio, una revisión sobre los conocimientos actuales de la química, fuentes, bioquímica y fisiología de la vitamina A, así como de los efectos de la hipovitaminosis e hipervitaminosis A. Además, se revisan los estudios sobre los requerimientos dietéticos de la vitamina A en la rata, y los factores que los afectan.

Segunda parte: Esta corresponde a la sección experimental, y reporta los resultados de 2 experimentos en los que se analizó el contenido de vitamina A de ratas de diferentes edades, alimentadas con una dieta normal de mantenimiento (Nutricubos Purina para Roedores Pequeños, de Purina, S. A. de C. V.) y agua corriente ad libitum.

En el primer experimento se disecó el hígado de 20 hembras y 20 machos de 26, 90 y 210 días de edad (excepto para los machos de 210 días, de los que sólo se dispuso de 14 animales), y se midió la cantidad de vitamina A siguiendo el método espectrofotométrico de

Olson. En este experimento se encontró que el peso porcentual del hígado disminuye conforme avanza la edad de los animales, a diferencia del contenido de vitamina A hepática que se incrementa rápidamente con la edad. Promediando los valores de machos y hembras de una misma edad, se obtuvieron los siguientes valores hepáticos de la concentración de vitamina A (I) y vitamina A total (II): 26 días I = 28.3 µg/g, II = 54.7 µg/ hígado; 90 días, I = 213.3 µg/g, II = 1469.9 µg/ hígado; 210 días, I = 278.2 µg/g, II = 2867.9 µg/ hígado.

Las hembras mostraron concentraciones significativamente mayores que los machos ($P < 0.001$); sin embargo, la vitamina A total fue similar en los sexos de la misma edad.

En el segundo experimento se emplearon ratas de 22, 92 y 188 días de edad, 20 hembras y 20 machos de cada edad. En estos animales se llevó un control de su peso semanal a partir del día de su destete. A todos los animales, igual que en el primer experimento, se les determinó la vitamina A hepática en base al método de Olson, habiendo obtenido los siguientes valores promedio de machos y hembras: 22 días, I = 26.8 µg/g, II = 40.8 µg/ hígado; 92 días, I = 210.5 µg/g, II = 1605.5 µg/ hígado; 188 días, I = 396.1 µg/g, II = 3225.5 µg/hígado. En los animales de 92 y 188 días de edad se determinó la vitamina A plasmática por el método fluorométrico de Thompson, encontrándose que los niveles de esta vitamina en el plasma son muy similares en todas las edades estudiadas, así como también en los dos sexos. Asimismo, en este segundo experimento se determinaron las actividades de 2 transaminasas, la glutámica

pirúvica (GPT) y la glutámica oxalacética (GOT), por el método de Reitman y Frankel, para evaluar la función hepática. GOT no registró diferencias en las diferentes edades ni sexos, mientras que la actividad de GPT se incrementó ligera pero significativamente con la edad, pero manteniéndose semejante en los dos sexos de la misma edad.

B. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ford, D. J.: Nutrition and Feeding. Chapter 4. En: T. B. Poole (Ed): Longman The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals. 6th Ed. Scientific & Technical. Harlow, pp 35-57, 1987.
- 2.- Mead, J. F. y Fulco, A. J.: The unsaturated and polyunsaturated fatty acids in health and disease. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, 1976.
- 3.- Goodman, De W. S.: Vitamin A metabolism. Fed. Proc., 39: 2716 - 2722, 1980.
- 4.- Goodman, De W. S.: Vitamin A Metabolism. Chapter 20. En: Biology and Pathobiology. I.M. Arias, H. Popper, D. Schachter, D.A. Shafritz, (Ed.): Raven Press, New York, pp 347-352. 1982.
- 5.- Lehninger, A. L.: Biochemistry. 2d ed., Worth. New York, 1975.
- 6.- Embree, N. D., Ames, S. R., Lehman, R. W. y Harris, P. L.: Determination of vitamin A. Meth. Biochem. Anal. 4: 43 - 98, 1957.
- 7.- Marks, J.: The fat-soluble vitamins in modern medicine. Vitam. Horm. 32: 131 - 154, 1974.
- 8.- Wolf, G.: Multiple functions of vitamin A. Physiol. Rev., 64: 873 - 937, 1974.
- 9.- Hollander, D., y S. Muralidhara.: Vitamin A intestinal absorption in vivo: influence of luminal factors on transport. Am. J. Physiol. 232: E471 - E477, 1977.

- 10.- Blomhoff, R.: Hepatic retinol metabolism: Role of the various cell types, Nutr. Rev. 45: 257 - 263, 1987.
- 11.- Peña, D. A., Arroyo, B. A., Gómez, P. A. y Tapia, I. R.: Bioquímica. Limusa. México, D.F., 1979.
- 12.- Blomhoff, R., Eskild, W., Kindberg, G. M., Frydz, K. and Berg, T.: Intracellular transport of endocytosed chylomicron [3H] Retinyl ester in rat liver parenchymal cells. J. Biol. Chem. 260: 13566 - 13570, 1985.
- 13.- Blaner, W. S., Dixon, J. L., Moriwaki, H., Martino, R. A., Stein, O., Stein, Y. y Goodman, De W. S.: Studies on the in vivo transfer of retinoids from parenchymal to stellate cells in rat liver. Eur. J. Biochem., 164: 301 - 107, 1987.
- 14.- Hendriks, H. F., Brouwer, A., y Knook, D. L.: The role of hepatic fat-storing (stellate) cells in retinoid metabolism. Hepatology., 7: 1368 - 1371, 1987.
- 15.- Blomhoff, R., Rasmussen, M., Nilsson, A., et al.: Hepatic retinol metabolism. J. Biol. Chem., 260: 13560 - 13565, 1985.
- 16.- Blomhoff, R., Norum, K. R., y Berg, T.: Hepatic uptake of [3H] retinol bound to the serum retinol binding protein involves both parenchymal and perisinusoidal stellate cells. J. Biol. Chem., 260: 13571 - 13575, 1985.
- 17.- Hendriks, H. F., Verhoofstad, A. M., Brouwer, A., De Leeuw, A. M., y Knook, D. L.: Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. Exp. Cells Res., 160: 138 - 149, 1985.

- 18.- Villalobos, P. J.: Gastroenterologia. 2a edición. Vol. 2. Francisco Méndez Oteo, México, D. F., 1985.
- 19.- Wake, K.: Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their relative structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. Int. Rev. Cytol., 66: 303 - 353, 1980.
- 20.- Yamada, M., Blaner, W. S., Soprano, D. R., Dixon, J. L., Kjeldbye, H. M., y Goodman, de W. S.: Biochemical characteristics of isolated rat liver stellate cells. Hepatology., 7: 1224 - 1229, 1987.
- 21.- Rask, L., Anundi, H., y Peterson, R. A.: The primary structure of the human retinol-binding protein. Febs Lett., 104: 55 - 58, 1979.
- 22.- Soprano, D. R., Pickett, C. B., Smith, J. E., y Goodman, De W. S.: Biosynthesis of plasma retinol-binding protein in liver as a larger molecular weight precursor. J. Biol. Chem., 256: 8256 - 8258, 1981.
- 23.- Kanda, Y., Goodman, De W. S., Canfield, E., y Morgan, F. J.: The amino acid sequence human plasma prealbumin. J. Biol. Chem., 249: 6796 - 6805, 1974.
- 24.- Heller, J.: Interactions of plasma retinol-binding protein with its recertor. J. Biol. Chem., 250: 3613 - 3619, 1975.

- 25.- Rask, L., y Peterson, P. A.: In vitro uptake of vitamins A from the retinol-binding plasma protein to mucosal epithelial cells from the monkey's small intestine. J. Biol. Chem., 251: 6360 - 6366, 1975.
- 26.- Olson, J. A.: The metabolism of Vitamin A. Pharmacol. Rev., 19: 559 - 596, 1967.
- 27.- Smith, J. E., Milch, P. O., Muto, S., y Goodman, De W. S.: The plasma transport and metabolism of retinoic acid in the rat. Biochem., 132: 821 - 827, 1973.
- 28.- Sporn, M. B., Clamon, G. H., Dunlop, N. M., Newton, D. L., Smith, J. M., y Saffioti, U.: Activity of vitamin A analogues in cell cultures of mouse epidermis and organ cultures of hamster trachea. Nature, 253: 47 - 50, 1975.
- 29.- Zile, M. H., Inhorn, R. C., y De Luca, H. F.: Metabolism in vivo of all-trans-retinoic acid. J. Biol. Chem., 257: 3544 - 3550, 1982.
- 30.- Frolík, C. A., Roller, P. P., Roberts, A. B., y Sporn, M. B.: In vitro and in vivo metabolism of all-trans and 13-cis-retinoic acid in the hamster. J. Biol. Chem., 255: 8057 - 8062, 1980.
- 31.- Frolík, C. A., Swanson, B. N., Dart, L. L., y Sporn M. B.: Metabolism of 13-cis retinoic acid: identification of 13-cis-retinoyl and 13-cis-4-oxoretinoyl-B-glucuronides in the bile of Vitamin A-normal rats. Arch. Biochem. Biophys., 208: 344 - 352, 1980.

- 32.- Napoli, J. L., Mc Cormick, A. M., Schnoes, H. I., y De Luca, H. F.: Identification of 5,8-oxyretinoic acid isolated from small intestine of vitamina A-deficient rats dosed with retinoic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 2603 - 2605, 1978.
- 33.- Haenni, R., y Bigler, F.: Isolation and identification of 3 major metabolites of retinoic acid from rat faces. Helv. Chim. Acta, 60: 881 - 887, 1977.
- 34.- Skare, K. L., Schnoes, H. I., y De Luca H. F.: Biliary metabolites of all-trans retinoic acid in the rat: isolation and identification of a novel polar metabolite. Biochem., 21: 3308 - 3317, 1982.
- 35.- Swanson, B. N., Frolik, C. A., Zahharevitz, D. W., Rollier, P. P., y Sporn, M. B.: Dose-dependent kinetics of all-trans retinoic acid in rats. Biochem. Pharmacol. 30: 107 - 113, 1981.
- 36.- Haenni, R., Bigler, F., Meister, W. and Englert, G.: Isolation y identification of 3 urinary metabolites of retinoic acid in the rat. Helv. Chim. Acta, 59: 2221 - 2227, 1976.
- 37.- Fitton-Jackson, S. F., y Fell, H. F.: Epidermal fine structure in embryonic chicken skin during a typical differentiation induced by vitamin A in culture. Dev. Biol., 7: 394 - 419, 1963.

- 38.- Fuchs, E. y Green, H.: Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell*, 25: 617 - 625, 1981.
- 39.- Sherman, B. S.: The effect of vitamin A on epithelial mitosis in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, 37: 469 - 480, 1961.
- 40.- Zile, M. H., Bunge, E. C. y De Luca, H. F.: DNA labeling of rat epithelial tissues in vitamin A deficiency. *J. Nutr.*, 111: 777 - 788, 1988.
- 41.- Ganguly, J., Sarada, K., Jayaram, M., Joshi, P. S., Das, R. C., y Murthy, S. K.: On the systemic mode of action of vitamin A. *World Rev. Nutr. Diet.*, 31: 59 - 64, 1978.
- 42.- Strickland, S., Smith, K. K. y Marotti, K. R.: Hormonal induction of differentiation interatocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell*, 21: 347 - 355, 1980.
- 43.- Kister, A.: Retinoic acid-induced cartilage resorption. *Differentiation*, 21: 168 - 174, 1982.
- 44.- Year, M. Stanley, J.R. y Katz, S.I.: Retinoic acid delays terminal differentiation of keratinocytes in suspension culture. *J. Invest. Dermatol.*, 76: 363 - 366, 1981.
- 45.- Elias, P. M. Grayson, S. Caldwell, T. M. y McNutt, N. S.: Gap junction proliferation in retinoic acid-treated basal cell carcinoma. *Lab. Invest.*, 42: 469 - 474, 1980.

- 46.- Adamo, S., De Luca, L., Silverman-Jones, C.S. y Bhat, P.V.: Retinoic-induced adhesion in cultures transformed mouse fibroblast. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62: 1473 - 1478, 1979.
- 47.- De Luca, L. M.: Studies in mannosyl carrier fraction of retinol and retinoic acid in epithelial and mesenchimal tissues. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 6: 611-619, 1982.
- 48.- Blomer, S. D. y Wolf, G.: Retinoids and phorbol esters alter release of fibronectin from enucleated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6541-6545, 1982.
- 49.- Blomer, S. D. y Wolf, G.: Stimulation of fibronectin production by retinoic acid in mouse skin tumors. *Cancer Res.*, 42: 4465-4472, 1982.
- 50.- Jatten, A.M., De Luca, L. M. y Meeks, R. G.: Enhancement in apparent membrane microviscosity during differentiation of embrional carcinoma cells induced by retinoids. *Exp. Cell Res.*, 138: 494-498, 1982.
- 51.- Kim, C., Leo, A.M., Lowe, N. y Lieber, C. S.: Effects of vitamin A and ethanol on liver plasma membrane fluidity. *Hepatology* 4: 735-741, 1988.
- 52.- Jetten, A.M.: Action of retinoids and phorbol esters on cell growth and the binding of epidermal growth factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 359: 200-217, 1981.
- 53.- De Luca, L. M. The direct involvement of vitamin A in glycosyl transfer reactions of mammalian membranes. *Vitamin. Horn.* 35: 1-17, 1977.

- 54.- Lotan, R.: Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 605: 33-91, 1980.
- 55.- De Luca, L. M., Creek, K., Morre, J.D. y Shidoji, Y.: Retinyl phosphate as a carrier of mannose in the endoplasmic reticulum of liver tissue. En: Popper, H., Reutter, W., Kottgen, E. y Gudat, F. (Eds.): *Structural carbohydrates of liver*. Falk Symposium No. 34. MTP Press Ltd., Boston, pp 33-49, 1983.
- 56.- Effect of vitamin A deficiency in rats on glycosylation of glycoproteins. *Nutr. Rev.*, 47: 56-57, 1989.
- 57.- Domen, H. A. P. C.: Deficiencia de vitamina A, xeroftalmia y ceguera. En: *Conocimientos actuales en nutrición*. INCAP, Guatemala, 1978.
- 58.- Thorn, G. W., Adams, R. D., Braunwald, E., Isselbacher, K. J. y Petersdorf, R. G.: *Medicina Interna Harrison*. Tomo 1. 5a ed. La Prensa Médica Mexicana, S. A., México, 1984.
- 59.- Vitamin A and Iron deficiency. *Nutr. Rev.*, 47: 119 - 121, 1989.
- 60.- Bush, M. E., y Dahms, B. B.: Fatal hypervitaminosis A in a neonate. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 108: 838 - 842, 1984.
- 61.- Hruban, Z., Russell, R. M., Boyer, J. L. et al.: Ultraestructural changes in livers of two patients with hypervitaminosis A. *Am. J. Pathol.*, 76: 451 - 468, 1974.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 63.- Fang-Li, X.: The affects of chronic Vitamin A excess on bone remodeling in aged rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 191: 103 - 107, 1989.
- 64.- Hayes, R. C. y Mark, D. H.: Toxicity of the vitamins. En: Toxicants occurring naturally in foods. Nat. Acad. Sci., Washington, 1973.
- 65.- Dam, H.: The biochemistry of fat-soluble vitamins. En: Progress in the chemistry of facts and other lipids. Pergamon Press Ltd., Londres, 1955.
- 66.- Hafez, E. S., y Dyer, I. A.: Animal growth and nutrition. Lea & Febiger, Filadelfia, 1969.
- 67.- Moore, T. y Wang, Y. L.: Hypervitaminosis A. Biochem J., 39: 222-228, 1945.
- 68.- Di Palma, J. R. y Ritchie, D.M.: Vitamin toxicity. Ann Rev. Pharmacol. Toxicol., 17: 13-148, 1977.
- 69.- Dileepan, K. N., Singh, V. N. y Ramachandran C. K.: Early effects of hypervitaminosis A on gluconeogenic activity and amino acid metabolizing enzymes of rat liver. J. Nutr., 107: 1809-1815, 1977.
- 70.- Singh, V. N., Singh, M. y Dileepan, K. N.: Early effects of vitamin A toxicity on hepatic glycolysis in rat. J. Nutr., 108: 1959-1962, 1978.

- 71.- Dingle, J.T., glauert, A. M., Danmiel, M. y Lucy, J. A.: Vitamin A and membrane systems. 1. The action of the vitamin A on the membranes of cells and intracellular particles. Biochem. J., 84: 76, 1962.
- 72.- Lucy, J.A. y Dingle, J.T.: Vitamin A and membrane systems. 2. Membrans stability and protein-vitamin A- lipid interactions. Biochem. J., 84: 611-621, 1962.
- 73.- Gell, H. B., Dingle, J. T., y Weeb, M: Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 4. The especificity of the effect on embrionic chick-limb cartilage in culture and on isolated rat-liver lysosomes. Biochem J., 83: 63 - 69, 1962.
- 74.- Dingle, J. T., y Lucy, J. A.: Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 5. The effect of vitamin A on the stability of the erithrocyte membrane. Biochem J., 84: 611 - 621, 1962.
- 75.- Dingle, J. T. y Lucy, J. A.: Vitamin A, carotenoids and cell fuction. Biol. Rev., 40: 422-461, 1965.
- 76.- Effect of Xenobiotics on hepatic vitamin A storage. Nutr. Rev., 45: 274 - 275. 1987.
- 77.- Leo, M. A., Lowe, N. y Lieber, C. S.: Potentiation of ethanol-induced hepatic vitamin A depletion by phenobarbital and butylated hydroxytoluene. J. Nutr., 117: 70 - 76, 1987.
- 78.- McCormick, D. L., Hultin, T. A., y Detrisac, C. J.: Potentiation of vitamin A hepatotoxicity by butylated hydroxytoluene. Toxicol. Appl. Pharmacol., 90: 1 - 9, 1987.

- 79.- Nutrient requirements of laboratory animals. National Research Council. 3rd rev. ed., Vol. 10 NRC, Washington, D. C. 1978.
- 80.- Henry, K. M., et al.: Dietary protein and utilization of vitamin A. J. Nutr., 76: 435 - 440, 1962.
- 81.- Rechcigl, M., et al.: Dietary protein and utilization of vitamin A. J. Nutr., 76: 435 - 440, 1962.
- 82.- Rogers, A. E.: Nutrition. Chapter 6. En: The laboratory rat. Baker, H. J., Lindsey, J. R., y Weisbroth, S. H. (Ed.): Academic Press, New York, pp 123 - 152, 1979.
- 83.- Muhial, H., y Glover, J.: Effects of dietary deficiencies of protein and retinol on the plasma level of retinol-binding protein in the rat. Br. J. Nutr., 32: 549 - 558, 1974.
- 84.- Underwood, B.: Effect of protein quantity and quality on plasma response to an oral dose of vitamin A as an indicator of hepatic vitamin A reserves in rats. J. Nutr., 110: 1635 - 1640, 1980.
- 85.- Kamath : J. Nutr. 102: 1972.
- 86.- Muelder, K. D., y Kelly, E.: The effect of level of fat in the diet upon utilization of vitamin A. J. Nutr., 23: 335 - 344, 19492.
- 87.- Smith, J. C., McDaniel, E. G., Fan, F. F., y Halsted, J. A.: Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism. Science, 181: 954, 1973.

- 88.- Sherman, H. C., y Trupp, H. Y.: Long term experiments at or near the optimum level of intake of vitamin A. *J. Nutr.*, 37: 467, 1949.
- 89.- Corey, J. E., y Hayes, K. C.: Cerebrospinal fluid pressure, growth, and hematology in relation to retinol status of the rat in acute vitamin A deficiency. *J. Nutr.*, 102: 1585 - 1594, 1972.
- 90.- Coward, W. A., et al.: The retinol requirements of rats for spermatogenesis and vision. *Br. J. Nutr.*, 23: 619 - 626, 1969.
- 91.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Cálculos biliares en el jámster dorado, XV. Acción litogénica de la Vitamina A. XIII Congr. Latinoamer. Cien. Fisiol. y XX Congr. Nal. Fisiol., México, D. F., Resúmenes de Comunicaciones, p. 173, 1977.
- 92.- Cárdenas, R.: Estudio sobre la litogenicidad de la vitamina A y carotenoides en el jámster dorado. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM, 1979.
- 93.- Olson, J. A.: A simple dual assay for vitamin A and carotenoids in human liver. *Nutr. Rep. Internat.*, 12: 807 - 813, 1979.
- 94.- Thomson, J. N., Erdody, P., Maxwell, W. B., y Murray, T. K.: Fluorometric determination of vitamin A in dairy products. *J. Dairy Sci.*, 55: 1077 - 1080, 1973.

- 95.- Reitman, S., y Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamate oxalacetate and glutamate piruvate transaminases. Amer. J. Clin. Path., 28: 56 - 63, 1957.
- 96.- Moore, T.: Vitamin A. Elsevier Publ. Co., New York. 1957.
- 97.- Robinson, M. E., Verrinder Gibbins, A. M., y Hardy, M. H.: Normal levels of vitamin A in tissues of the Syrian hamster (Mesocricetus aratus) determined colorimetrically, Laboratory Animals, 22: 117 - 121, 1988.
- 98.- Effect of retinoids on growth and diferentiation of myeloid leukemia cells. Nutr. Rev., 47: 153 - 154, 1989.
- 99.- Williams, Ch. S. F.: Rat. En : Practical guide to laboratory animals. The C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1976.
- 100.- Dam, H.: Nutritional aspects of gallstones formation with particular reference to alimentary production of gallestones in laboratory animals. World Reviw of Nutrition and Dietetics., 11: 119 - 239, 1969.