

2932



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO SOBRE LAS POSIBLES ALTERACIONES
PRODUCIDAS POR LA VITAMINA A QUE INDUCEN
COLELITIASIS PIGMENTARIA DEL JAMSTER
DORADO (Mesocricetus auratus).**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ANA MARIA CADENA VIDAL**

FALLA DE ORIGEN



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	Pág.
INTRODUCCION	1
Primera Parte	
Revisión de la literatura sobre la colelitiasis.	1
I. Clasificación de los cálculos biliares.	1
A. Cálculos de colesterol:	1
a) Patogénesis.	2
b) Epidemiología.	4
c) Modelos animales.	5
B. Cálculos pigmentarios.	7
a) Patogénesis	9
b) Epidemiología.	11
c) Modelos animales.	15
Segunda Parte	
Revisión de la literatura sobre la vitamina A	
1. Historia.	16
2. Química.	16
3. Metabolismo.	17
4. Funciones.	19
5. Hipervitaminosis.	22
Tercera Parte	
Sección Experimental	
A. Objetivos.	25
B. Material.	25
1. Generalidades.	26
2. Primer Experimento.	26
3. Segundo Experimento.	28
4. Tercer Experimento.	29
5. Cuarto Experimento.	30
C. Resultados.	32
D. Discusión.	49
E. Conclusión.	53
Cuarta Parte	
Resumen general y Bibliografía	
1. Resumen.	54
2. Bibliografía.	57

INTRODUCCION

El presente estudio biomédico es una contribución al entendimiento de la patogénesis de la colelitiasis, cuya frecuencia y gravedad van en rápido aumento tanto en México como en otros países.

Hemos utilizado como modelo experimental el jámster dorado, cuyas cualidades lo han hecho el roedor más adecuado para el estudio experimental de los cálculos biliares.

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto sobre colelitiasis en el jámster que se ha venido desarrollando en este laboratorio y comprende las investigaciones que se llevan a cabo sobre la acción colelitogénica pigmentaria de la vitamina A.

Asimismo, en este estudio se ha realizado una revisión actualizada de los conocimientos sobre la epidemiología, patogénesis e investigaciones en modelos animales, de los diferentes tipos de colelitiasis; además se incluye una revisión de los conocimientos sobre el metabolismo, funciones y toxicidad de la vitamina A.

Las investigaciones reportadas en esta tesis han sido presentadas parcialmente en los Congresos Nacionales de Gastroenterología XVIII, XIX y XX, realizados en las ciudades de Guadalajara, D.F. y Morelia, respectivamente.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias de esta Universidad, bajo la dirección del Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, a quien deseo expresar mis más sinceros agradecimientos por su eficiente dirección. Asimismo, agradezco al Dr. Humberto Granados su acertada ayuda en la realización y redacción del presente estudio.

PRIMERA PARTE

REVISION DE LA LITERATURA SOBRE LA COLELITIASIS

Los cálculos biliares son reconocidos como una enfermedad muy antigua; - éstos se han encontrado en algunas momias egipcias que datan de 7000 años A. C. (1). La coleditiasis se empezó a conocer como tal, en la época del Renacimiento. A finales del siglo XIX en un estudio de autopsias se demostró que -- los cálculos estaban presentes en el 11% de los sujetos en edades entre 41 y 50 años, y el 28% en aquellos de 60 años o más (2).

Un cálculo biliar es la formación de un cuerpo duro, que se produce cuando una sustancia que normalmente existe en la bilis se precipita al aumentar su concentración relativa; este precipitado se asocia con glicoproteínas de las vías biliares hasta constituir un conglomerado al que se le combinan - otras sustancias de la bilis (3).

1. CLASIFICACION DE LOS CALCULOS.

En 1565 Kentman publicó la primera clasificación de los cálculos, (1). - Se sabe que los sustancias de la bilis que con mayor frecuencia forman cálculos son: colesterol, pigmentos biliares y sales de calcio. En base a su constitución los cálculos se han clasificado en tres tipos principales:

A. CALCULOS DE COLESTEROL.

B. CALCULOS DE PIGMENTO.

C. CALCULOS MIXTOS.

A. Cálculos de colesterol: estos cálculos contienen este lípido hasta - en un 98% de su peso; son cristalinos, radiados y translúcidos de forma re - dondeada u ovoidea y de superficie lisa o nodular; miden en el hombre de 1 a 4 centímetros de diámetro. También existen los cálculos múltiples de colesterol, los cuales son menos comunes y tienen la apariencia de una frambuesa - (4).

Puesto que el colesterol es el principal constituyente de estos cálcu - los, revisaremos brevemente su metabolismo.

El colesterol dentro del cuerpo humano sufre alteraciones para transfor - marse en sustancias de interés fisiológico, como por ejemplo en hormonas y - provitaminas, y también es constituyente de membranas celulares (5). El colesterol es absorbido en el intestino e incorporado en los quilomicrones forma-

dos en el epitelio intestinal. Después de que los quilomicrones descargan sus triglicéridos en el tejido adiposo, los remanentes de los quilomicrones transportan - el colesterol al hígado, órgano en el cual también se sintetiza colesterol y cuya síntesis es regulada por la cantidad de colesterol absorbido en la dieta. Este lípido no es hidrosoluble, pero en la bilis se mantiene asociado a micelas mixtas, - las cuales están constituidas por sales biliares y lecitina, poseyendo pesos moleculares de 11000 a 75000 (4).

La lecitina, los ácidos biliares y el colesterol son lípidos con propiedades anfipáticas es decir, que sus moléculas presentan una parte hidrofílica y otra hidrofóbica orientándose en una interfase de aceite-agua. El colesterol sólo tiene hidrofílico el OH en el carbono 3; el resto de la molécula es hidrofóbica, por lo cual en soluciones acuosas se precipita en forma de cristales (6).

a) Patogénesis: la bilis vesicular humana está cercana del punto de saturación del colesterol. Cualquier cambio en la concentración absoluta de ácidos biliares, fosfolípidos y/o colesterol, reduce la capacidad de solubilidad micelar, del colesterol provocando la precipitación del mismo y la formación del cálculo (7).

Recientemente se ha propuesto otro mecanismo para que el colesterol se mantenga "disuelto" en la bilis. Varios estudios indican que vesículas unilamelares de 100 nm presentes en la bilis son capaces de transportar y almacenar lípidos biliares, incluyendo altos niveles de colesterol (8).

Ahora bien en los parámetros que pueden influir en la formación de estos cálculos se clasifican según Carey (7), en seis tipos de acuerdo con los diferentes - desordenes metabólicos que produce una bilis anormal:

i) Defecto en la síntesis de ácidos biliares que se asocia con la deficiencia de la enzima 12- α -hidroxilasa, con la administración de estrógenos y con - xantomatosis cerebrotendinosa.

ii) Pérdida excesiva de ácidos biliares debida a la insuficiencia pancreática, la ileostomía y a trastornos de absorción primaria de los ácidos biliares.

iii) Reducción en la retroalimentación de ácidos biliares, debida a la secreción de ácidos biliares primarios, lo cual se ha observado en gente de raza blanca con colelitiasis biliar.

iv) Secreción excesiva de colesterol asociada con la obesidad.

v) Reducción de ácidos biliares e incremento en la secreción de colesterol, tal como ocurre en los indios americanos y en los blancos.

vi) Enfermedad primaria de cálculos extrahepáticos, salmonelosis, nutrición total parenteral, somatostatina y vagotomía.

Admiral y Small (9), postulan que la formación de los cálculos de colesterol -- no solamente son el producto de una bilis saturada de este lípido, sino que hay -- otros factores involucrados en la patogénesis de esta enfermedad, ya que la sobresa-- turación puede ser sólo el primer paso de la cascada para la formación del cálculo, puesto que se ha observado que entre el 40 y 80% de sujetos normales sin cálculos -- presentan una bilis sobresaturada de colesterol, definida como un exceso de coles-- terol sobre el límite de solubilidad micelar. La presencia de vesículas en la bilis podría explicar esta frecuente sobresaturación metaestable de colesterol en la bilis, así como su grado y duración (9).

Recientemente se ha introducido el término "metaestabilidad" de la bilis para indicar los diferentes límites de saturación de colesterol sin que éste precipite o forme cristales monohidratados.

A la precipitación o formación de cristales de colesterol en la bilis se llama proceso de "nucleación" (10, 11).

Se ha establecido que el tiempo para que la bilis de pacientes con cálculos, forme cristales de colesterol, es menor que el de la bilis de individuos sin cálcu-- los con el mismo grado de saturación, es decir, que el tiempo para que se lleve a-- cabo la nucleación es menor en los primeros. Burnstein et al. (12), observaron que una mezcla de bilis de pacientes con y sin cálculos de colesterol en proporció 1:1, tiene un tiempo de nucleación tan rápido como el de la bilis de pacientes con cál-- culos; al reducir la proporción de la bilis anormal en 1:10 la nucleación sigue -- siendo rápida. Estos resultados pueden ser debidos a la presencia, en la bilis -- anormal, de factores que aceleran la nucleación (12). Estudios con bilis y solu-- ciones modelo de bilis han sugerido que la agregación de vesículas lipídicas pue-- den ser un evento clave en el proceso de nucleación del colesterol; cualquier fac-- tor que aumente esta agregación, e. g., iones de calcio y/o proteínas, pueden redu-- cir el tiempo de nucleación (13). Sin embargo, también se ha reportado un factor -- antinucleante en la bilis de pacientes normales: se trata de la apolipoproteína -- A-I, la cual agragada a bilis anormal prolonga el tiempo de nucleación.

La precipitación y conglomeración de los cristales de colesterol pueden re-- querir de la adición de mucina y material de descamación; a este proceso se le de-- nomina nucleación heterogénea, en contraste con la nucleación homogénea en la que los cristales ocurren espontáneamente en concentraciones por encima del límite de la metaestabilidad (9). Observaciones hechas por Womack en modelos animales ali -- mentados con dietas litogénicas, muestran un aumento en la síntesis y secreción de mucus y glicoproteínas antes de desarrollarse los cálculos de colesterol (14), lo

cual indica una nucleación heterogénea.

b) Epidemiología: La colelitiasis es una enfermedad que en algunos casos puede permanecer indetectable durante toda la vida (7).

En estudios postmortem se ha observado que un gran número de pacientes con cálculos no presentan síntomas, es decir, que en ellos los cálculos son asintomáticos o silenciosos.

Los datos sobre la frecuencia de cálculos de colesterol son variables de una zona a otra, de un país a otro o entre diferentes grupos de edades. Se estima que en los Estados Unidos de América cerca de veinte millones de personas padecen esta enfermedad (2), y en el noreste de este país, el 70% de pacientes con colelitiasis presenta cálculos de colesterol, mientras que en Bolivia se ha encontrado que el 100% de los cálculos son de colesterol (15). Por lo contrario los Masai de Africa están prácticamente exentos de esta enfermedad. En Ghana se registra un 0.4% y en Uganda 1.35% (16).

En los países Orientales se han reportado las siguientes frecuencias: Singapur 6%, Tailandia 3%, China 0.23%. En la India la frecuencia es mayor en el Norte que en el Sur. En Europa Occidental la colelitiasis es común: en Suecia se encuentra la frecuencia más elevada 38%, y en Francia y Alemania es menos frecuente que en Inglaterra; mientras que en Australia es de un 31% (2).

En México la colelitiasis es un problema importante de salud pública: aproximadamente el 9% de la población adulta, es decir, cerca de tres millones de personas padecen la enfermedad y de ellas el 1.3%, o sea 40,000 pacientes, mueren anualmente como consecuencia directa de este padecimiento (17).

Ahora bien, la frecuencia de la colelitiasis es influida por factores tales como la dieta, edad, sexo, raza y herencia.

i) Dieta: el contenido calórico y de colesterol en la dieta, así como la obesidad, favorecen el desarrollo de estos cálculos (18).

ii) Edad: esta enfermedad es tres veces más frecuente entre los 20 a los 40 años (2).

iii) Sexo: la formación de cálculos en la vesícula biliar ocurre casi en un 40% de las mujeres y sólo en un 24% en los hombres; esta diferencia no es significativa antes de la pubertad, ni después de los 60 años (1). Cabe mencionar que esta diferencia no se observa entre los filipinos y suecos.

iv) Raza: los estudios realizados en indios norteamericanos demuestran que un 70% de los indios Pima padecen colelitiasis hacia los 30 años, mientras que los indios de Trinidad Tobago muestran sólo una frecuencia de 0.07%. En los --

suecos la frecuencia es particularmente elevada, en tanto que los Masai de Africa no presentan colelitiasis (2).

v) Herencia: ha sido reportado que el 20,5% de familiares en primer grado de pacientes con cálculos, también presentan colelitiasis, mientras que sólo el 9% de un grupo control la presentan, lo cual indica que existen factores hereditarios de esta enfermedad (19).

Hay otros factores que se asocian con la colelitiasis de colesterol: es más frecuente en mujeres con antecedentes de embarazo que en nulíparas, pero no hay una relación con el número de embarazos (4). Los pacientes con pancreatitis y diabetes exhiben una mayor frecuencia (2). Por otro lado en estudios de necropsias se ha encontrado con frecuencia que la colelitiasis esta asociada a casos de aterosclerosis, infarto del miocardio, fibrosis quística del páncreas y xantomatosis cerebrotendinosa (7).

c) Modelos Animales: el estudio de la colelitiasis en animales de laboratorio ha aportado valiosa información para el mejor conocimiento de esta enfermedad en el hombre. Los principales modelos de colelitiasis de colesterol son el jámster, el ratón, el perro de las praderas y primates.

Jámster: Dam y Christensen, en 1952 (26), lograron producir tres tipos de cálculos por medio de una dieta libre de grasas y rica en glucosa, estos cálculos se pueden clasificar en:

i) Cálculos de colesterol, los cuales son blancos o amarillo claro, cristalinos, y compuestos exclusivamente de colesterol. Estos cálculos son los que se presentan en la mayoría de los animales con la dieta mencionada.

ii) Cálculos pigmentarios: son amorfos, generalmente negros o verdes, sin colesterol pero con un alto contenido de calcio, fosfato, ácidos biliares conjugados con glicina y un bajo contenido de bilirrubina. Este tipo de cálculos se presenta con una baja frecuencia usando la dieta mencionada.

iii) Cálculos mixtos: es un tipo combinado de cálculos de colesterol y pigmentarios. Estos son los menos frecuentes con la dieta utilizada.

La producción de cálculos de colesterol con una dieta semipurificada sin grasas y con un azúcar de fácil absorción como la glucosa, se obtiene entre 6 y 7 semanas, con una frecuencia del 80 al 100% . La formación de estos cálculos se favorece usando jámsteres de 4 a 6 semanas de edad. Se ha observado también que estos cálculos se presentan un poco más frecuentemente en los machos que en las hembras.

Se ha observado que grasas insaturadas tales como el aceite de soya y el aceite de hígado de bacalao, al nivel del 2% en la dieta, disminuyen los cálculos

de colesterol, lo cual no ocurre con una grasa saturada tal como la manteca de cerdo. Sin embargo con los aceites de soya y de hígado de bacalao se aumenta la frecuencia de cálculos pigmentarios (24).

La substitución de la glucosa por carbohidratos no refinados tales como el almidón de arroz y de papa o la lactosa en la dieta litogénica, disminuye la formación de cálculos de colesterol, mientras que la sacarosa favorece la formación de cálculos pigmentarios(25). Los jámsteres mantenidos con la dieta de glucosa y libre de grasas presentan una concentración mayor de colesterol biliar y una menor de ácidos biliares totales comparados con los alimentados con la dieta de almidón de arroz libre de grasas, la cual es aparentemente la razón para la precipitación del colesterol en los animales con dieta de glucosa y libre de grasas (27). Asimismo, esta última dieta produce un aumento en la síntesis de colesterol (28).

Recientemente se ha demostrado que con la dieta libre de grasa y rica en glucosa, la frecuencia de cálculos de colesterol en el jámster va disminuyendo con forme la caseína es substituida por proteína de soya. Esta reducción de la litogenicidad de la dieta, esta asociada a una reducción de colesterol biliar y a un aumento en la proporción de sales biliares/colesterol (29).

El fenobarbital administrado a jámsteres en el agua de beber (1mg/ml), induce la formación de bilis litogénica y la formación de cálculos de colesterol (30).

Otra forma de producir cálculos de colesterol en jámster, es suministrandoles en la dieta un alto contenido de colesterol e inyectandoles estrógenos sintéticos durante 12 semanas (31).

Ratón: la formación de cálculos ha sido producido sólo por una dieta semipurificada rica en colesterol y ácido cólico (117). Esta dieta produce altas concentraciones de colesterol en la bilis y en el suero; al eliminar el colesterol o el ácido cólico de la dieta, sigue presentandose la colesterolemia, pero no la litogenia. Existe diferente suceptibilidad a la formación de cálculos de colesterol en el ratón, ya que se ha reportado que ciertas cepas desarrollan estos cálculos con alta frecuencia, mientras que otras no lo desarrollan, esta diferencia se ha sugerido que puede estar relacionada con una mayor actividad del hígado para convertir el colesterol a ácidos biliares, y para esterificar al colesterol en las cepas no suceptibles a formar cálculos (21).

Perro de las praderas: en este animal se han reportado cálculos de colesterol suministrando este lípido; la administración de 1.2% de colesterol en la dieta, durante dos o tres semanas, produce colelitiasis en casi todos los animales (22, 23).

Primates: en estos animales se han producido cálculos de colesterol alimentandos durante largos periodos con dieta semipurificada rica en colesterol; con esta dieta se ha observado que el mono rhesus y el mono verde africano son resistentes a la formación de cálculos, mientras que el chimpance, aunque si es susceptible a la dieta, la adquisición y mantenimiento de los animales es muy costoso. El mono ardilla ha sido el mejor modelo de esta colelitiasis, ya que, además de su pequeño tamaño, con la dieta mencionada casi el 100% de los animales desarrollan cálculos (23).

B. Cálculos de pigmentos: una amplia variedad de compuestos orgánicos pueden ser identificados en estos cálculos, tales como proteínas, calcio, fosfatos, carbonatos, bilirrubinato y sulfatos, así como algunos metales tales como: Cu, Fe, Mn y Zn (32).

Se han diferenciado dos tipos de cálculos pigmentarios: cálculos cafés de pigmento y cálculos negros de pigmento (15), siendo sus características las siguientes:

i) Cálculos cafés de pigmento: son múltiples, de color café a anaranjado, lámiminados, de consistencia blanda y grasa que contienen sales de calcio, principalmente de bilirrubina, ácidos grasos (derivados de lecitina), fosfato y raramente carbonato; también contienen pequeñas cantidades de colesterol. Se presentan tanto en los conductos extra como en los intrahepáticos.

ii) Cálculos negros de pigmento: son múltiples, de consistencia dura y amorfos, contienen sales de calcio y bilirrubina (polimerizada), fosfato y/o carbonato, una mínima cantidad de colesterol y ácidos grasos; usualmente se presentan en la vesícula biliar y no están asociados con bilis infectada (33, 34, 35).

Las sustancias que posiblemente son las más importantes en la formación de este tipo de cálculos, son la bilirrubina y el calcio.

La bilirrubina (fig 1), procede de la degradación de la molécula hemo o ferro-protoporfirina IX, componente principal de la hemoglobina, y de otras hemoproteínas que se encuentran en los microsomas de las células hepáticas, tales como el citocromo P-450.

Primeramente la enzima hemo-oxigenasa abre el anillo porfirínico de la molécula hemo en el puente alfa, con lo que libera monóxido de carbono formándose así la molécula de biliverdina. Esta se reduce rápidamente a bilirrubina, catalizada por la enzima biliverdina reductasa. Así, pues, por cada molécula de hemo que se degrada, se forma una molécula de bilirrubina y una de monóxido de carbono (36).

La bilirrubina es un tetrapirrol del tipo biladieno-a,c, que contiene dos

dipirrometanonas asimétricas conectadas por un metileno. Debido a las dobles ligaduras a y c (fig. 1), la molécula tiene dos sitios de asimetría E-Z. En el organismo el isómero IX- α -Z,Z de la bilirrubina es el que predomina, y en este isómero los carboxilos y los anillos dipirrometanonas forman puentes de hidrógeno intramoleculares, y como consecuencia de estos enlaces la bilirrubina IX- α -Z,Z es insoluble en soluciones a pH fisiológico o por debajo de éste, y tiene un pK' dentro del rango alcalino (37).

El isómero IX- α -Z,Z puede dar lugar a los fotoisómeros E-Z, Z-E y E-E (fig. 1), los cuales son más polares y solubles en el agua; las formas E,Z o Z,E son reversibles espontáneamente a la forma Z,Z aún en ausencia de luz; también el isómero E,Z puede sufrir una ciclización fotocatalizada del grupo endo vinilo del anillo A y por lo tanto no se puede revertir a la forma Z,Z en la obscuridad sin embargo, puede sufrir oxidación y polimerización para dar lugar a pigmentos negros y violeta obscuro (38).

Debido a su insolubilidad acuosa la bilirrubina IX- α -Z,Z es transportada en la sangre unida a la albúmina plasmática hasta el hígado, donde es conjugada con compuestos orgánicos polares tales como el ácido glucurónico; y de esta forma la bilirrubina se vuelve hidrosoluble y puede ser excretada en la bilis. La bilirrubina puede ser monoconjugada o diconjugada, dependiendo de si uno o los dos ácidos propiónicos se encuentran conjugados. A pesar de que es necesario que sea conjugada para excretarse en la bilis, una pequeña proporción de bilirrubina, generalmente alrededor del 2% de total, no se encuentra conjugada y puede estar presente como monoanión o dianión. Esta bilirrubina no conjugada es la que puede precipitarse para formar el cálculo. La bilirrubina en su forma de monoanión se comporta probablemente como una molécula anfifílica que puede intercalarse en las micelas de las sales biliares y lecitina de la bilis; la cadena del grupo carboxilo no ionizado está embebida en la micela, mientras que el otro carboxilo de la molécula se orienta hacia la fase acuosa de la bilis.

El calcio está presente en todos los cálculos pigmentarios como sal, y los aniones que son más rápidamente precipitados son el carbonato, bilirrubinato, fosfato y palmitato.

El calcio juega un papel importante en la formación de los cálculos pigmentarios, pues se han encontrado en éstos precipitados de calcio de los cuatro aniones antes mencionados, en la siguiente proporción: en los cálculos negros de pigmento el total de sales de calcio es en promedio de 15%, (carbonato 13%, fosfato 5% y palmitato 1%); además, el pigmento negro (polímero de bilirrubina) también contienen calcio. En los cálculos cafés de pigmento el bilirrubinato cálcico re-

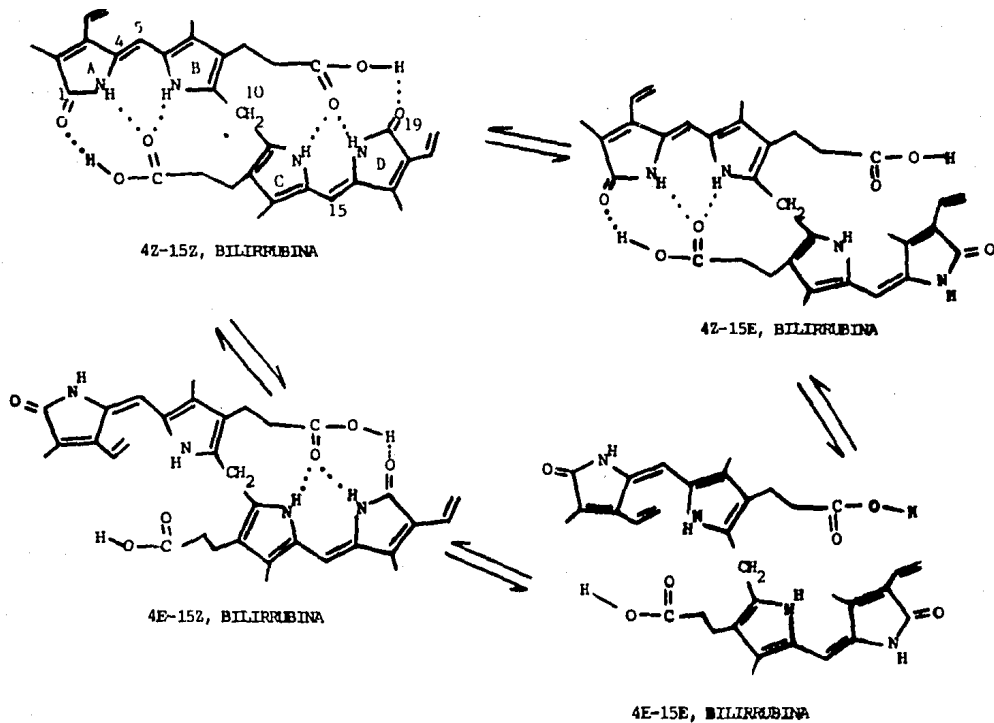


Fig 1. Fotoisomerización de la bilirrubina IX- alfa

presenta el 50%, el fosfato existe en un porcentaje menor de 1, el palmitato en un 23%, y no presentan carbonato (39).

La precipitación de estas sales puede ocurrir si se sobrepasa el límite de una o más especies de iones (41).

a) Patogénesis de los cálculos pigmentarios: En la bilis de pacientes normales, de la bilirrubina total existe sólo el 2% de bilirrubina no conjugada. En pacientes con cálculos negros de pigmento la concentración de bilirrubina total es más baja, con respecto a la normal o igual a ella, a excepción de pacientes con hemólisis crónica, en donde la bilirrubina total sí esta elevada. La bilis de pacientes con cálculos de bilirrubinato de calcio, tiene una concentración más elevada de bilirrubina no conjugada que los que no presentan cálculos negros de pigmento (41). Por otro lado el valor del pH de la bilis de pacientes con cálculos de pigmento se encuentra dentro del rango fisiológico (6.2 a 7.8), y la concentración de ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol se mantiene normal.

El bilirrubinato de calcio es el componente principal de ambos tipos de cálculos, y se considera que puede haber tres mecanismos por medio de los cuales se satura la bilis de bilirrubinato de calcio y éste se precipita (42).

i) Incremento en la concentración de bilirrubinato de calcio: la bilis de ratas que han sido sometidas a fototerapia, muestra un incremento en la concentración de bilirrubina no conjugada debido a la formación de fotoisómeros que se re-
vierten a bilirrubina IX- α -2,2 en la bilis, por lo que más bilirrubina puede formar bilirrubinato de calcio, el cual es altamente insoluble (43).

Maki et al. (44), sugieren que el factor principal en la patogénesis de los cálculos de bilirrubinato cálcico es el aparente exceso en la concentración de bilirrubina no conjugada en la bilis, generada por la hidrólisis de bilirrubina conjugada; ésta hidrólisis es catalizada por la β -glucuronidasa de E.coli, que in-
fecta la bilis de pacientes con cálculos café de pigmento. La enzima hidroliza el bilirrubinato de glucoronido a bilirrubina libre y ácido glucurónico; el calcio en la bilis se combina con el radical carboxilo de la bilirrubina libre, para formar el bilirrubinato de calcio.

Una posible hipótesis sobre la formación de los cálculos café de pigmento es que estos son el resultado de un efecto electrostático de iones y de enlaces puente con sustancias orgánicas de alto peso molecular, tales como glicoproteínas; el precipitado entonces se condensa bajo la influencia de movimientos físicos, lle-
gando a la consolidación. Esta hipótesis ha sido apoyada por modelos experimentales in vitro, en los cuales se han producido concreciones sólidas similares a cál

culos (44).

ii) Incremento en la actividad de los iones de calcio libres: la presencia de sales de calcio (bilirrubinato, carbonato, fosfatos y de ácidos grasos) en la bilis de pacientes con cálculos puede explicarse por un incremento en la actividad de iones calcio en la bilis, debido a un decremento en las concentraciones de sales biliares y de otros agentes que normalmente interaccionan con el calcio, o a un incremento en el calcio total. En cobayos se ha observado que las sales biliares no conjugadas se difunden más rápidamente fuera de la vesícula biliar que las sales conjugadas. Una desconjugación bacterial de sales biliares en la bilis infectada puede dar como resultado una disminución en la concentración de sales biliares. Asimismo, los cambios de permeabilidad selectiva en la vesícula biliar, tal como se ha observado en vesículas no funcionales de cobayos y de pacientes humanos, favorecen la absorción de sales biliares a las cuales son normalmente impermeables (39).

Sin embargo Sutor y Wilkie reportaron que la concentración de calcio total en la bilis humana de vesículas no funcionales está reducida, manteniéndose la proporción de iones calcio a calcio total constante entre 8 a 15% en la bilis hepática y vesicular de pacientes con cálculos (45).

iii) Decremento de los factores que solubilizan el bilirrubinato de calcio: se ha sugerido que en presencia de calcio la solubilidad del anión bilirrubinato es aumentada por los ácidos biliares y disminuida por la adición de lecitina (46).

Este efecto puede deberse a la formación de complejos de calcio y/o bilirrubina con sales biliares, cuya formación puede ser interferida por la lecitina, -- cambiando así los productos iónicos, es decir, favoreciendo la formación de bilirrubinato de calcio. La interacción del bilirrubinato cálcico con las micelas mixtas podría ayudar a su solubilización por medio de las sales biliares; sin embargo una disminución de sales biliares o un aumento en la concentración de lecitina contribuirían a la precipitación del bilirrubinato de calcio.

Los cálculos negros de pigmentos contienen también otras sales de calcio, entre ellas el carbonato. Recientemente se ha reportado que durante la concentración normal de la bilis por la vesícula, se secretan iones hidrógeno intercambiables por iones de sodio y agua. Los protones liberados en la bilis reaccionan con iones de bicarbonato para producir agua y bióxido de carbono, el cual se equilibra posteriormente con el bióxido de carbono de la sangre. Cuando la concentración biliar de bicarbonato se encuentra reducida se producirá una acidificación

de la bilis; asimismo, esta reacción disminuye los iones de carbonato y bicarbonato, previniendo que los iones de calcio reaccionen con éstos, evitando así la formación de carbonato de calcio. La formación y precipitación del carbonato de calcio podría contribuir a la formación del cálculo negro, o ser el factor principal en la génesis de los cálculos de sales de calcio (47).

b) Epidemiología de los cálculos pigmentarios: la gran mayoría de los estudios epidemiológicos publicados hasta principios de los 70s, hacen poca referencia a este tipo de cálculos, por lo cual hay pocos datos sobre la epidemiología de esta colelitiasis. Así, se sabe que los cálculos café de pigmento están asociados con infecciones bacterianas y parasitarias; por otra parte los cálculos negros de pigmento se presentan frecuentemente en pacientes con hemólisis, talacemia, esferocitosis, prótesis valvular cardíaca y cirrosis, aunque la mayoría de las pacientes con este tipo de cálculos no presentan necesariamente estos padecimientos (34).

En pacientes con colelitiasis en los Estados Unidos, los cálculos negros de pigmento se presentan con una frecuencia del 27 al 33% (48); y raramente se presentan los cálculos café de pigmento como enfermedad primaria pero sí en el 50% de los casos de cálculos recurrentes.

Los cálculos café de pigmento ocurren frecuentemente en el Este de Asia, incluyendo Japón, China, Korea, Tailandia y Malasia, en donde por técnicas de diagnóstico tales como colangiografía percutánea transhepática, endoscopia colangiográfica retrógrada, ultrasonografía y tomografía computarizada, se han encontrado que un 20% de todos los cálculos pertenecen a este tipo, y que se presentan con mayor frecuencia en las zonas rurales que en las urbanas (49).

En Japón de 2144 casos el 70% fueron cálculos de colesterol y 23.5% de tipo café de pigmento (50). En la India de 33 pacientes con cálculos el 33% fueron negros de pigmento, y el 9% café de pigmento (51).

En general, los cálculos negros de pigmento se asocian con el mundo occidental, mientras que los café de pigmento con las zonas rurales de oriente. La frecuencia de los cálculos pigmentarios se incrementa con la edad, pero no se ha encontrado diferencias debidas a raza o sexo.

c) Modelos animales de colelitiasis pigmentaria: los cálculos producidos en animales se han clasificado de manera similar a los de los humanos, (cálculos negros de pigmento y cálculos café de pigmento), considerandose además en esta clase los cálculos de sales biliares y de sales de calcio. A continuación presentamos estos modelos y sus características:

Jámster: como ya mencionamos, Dam y Christensen en 1952, originalmente rep. taron una dieta semipurificada libre de grasas y rica en glucosa, que produce cálculos biliares de colesterol y un pequeño porcentaje de cálculos pigmentarios. Cuando la glucosa es substituida por sacarosa, la frecuencia de cálculos pigmentarios aumenta ligeramente, ocurriendo lo mismo cuando a la dieta con glucosa se le adiciona 2% de grasas insaturadas, tales como el aceite de soya y el de hígado de bacalao. La formación de estos cálculos se favorece cuando se emplean animales de 15 a 17 semanas de edad (60).

Granados en 1971 observó que dietas de mantenimiento para ratones, administradas a jámsteres, producían en estos cálculos de pigmento que no contenían colesterol pero sí hidroxihapatita (61). Estos cálculos se presentan con mayor frecuencia en machos que en hembras, y la orquidectomía disminuye apreciablemente esta colelitiasis (62).

En 1972 Granados introdujo en México la cepa de jámsteres usada por él en Cuba (ChCM), y continuo aquí sus estudios sobre la colelitiasis, observando que ésta se presentaba cuando la dieta de mantenimiento era suplementada con leche de vaca y zanahoria (63). Posteriormente se comprobó que la fracción grasa de la leche -- (crema y mantequilla) era la responsable de esta colelitiasis. Así se estableció una dieta no purificada consistente de 75% de "Purina Laboratory Chow for Rats, Mice and Hamsters" y 25% de mantequilla pura de leche de vaca como dieta litogénica (64).

A diferencia de la mantequilla, varios aceites vegetales y la margarina carecen de acción litogénica (65).

Posteriormente se estudió la acción litogénica de otra grasa de origen animal, la manteca de cerdo, y se encontró que ésta también producía cálculos pigmentarios aunque con menor frecuencia que la mantequilla. Asimismo se demostró que la composición de la dieta básica influye en la litogenicidad de la mantequilla (66, 67).

También se estudio la posible acción potencializadora de la testosterona en la colelitiasis producida por la mantequilla. Se encontro que esta hormona suministrada al jámster macho normal, potencializa apreciablemente la acción litogénica de la mantequilla (68).

Con el objeto de tener una visión más específica de la acción litogénica de los componentes de la leche, Granados y colaboradores experimentaron con leches procesadas y elaboradas por la casa Nestlé, encontrandose que dos de ellas (La Lechera y Pelargón) producen un alto porcentaje de cálculos pigmentarios. De las -

dos leches Carnation estudiadas (Proteína y Vitaminada), la vitaminada produjo -- cálculos con alta frecuencia (69). Debido a que las leches ensayadas contienen -- adiciones de vitamina A, B y D, y ya que la mantequilla también contiene un alto nivel de vitamina A, se ensayaron estas vitaminas por separado. Se encontro que -- sólo la dieta básica adicionada con acetato de vitamina A, a niveles de entre -- 5000 y 33000 UI%, inducen cálculos pigmentarios con una frecuencia proporcional al nivel de vitamina A suministrada (70,71, 72).

Posteriormente se ensayó la litogenicidad de otras fuentes de vitamina A, la zanahoria y el β -caroteno sintético, encontrandose que ninguna de las dos es li togénica per se; sinembargo, la zanahoria potencializa tanto la acción litogénica de la dieta con 25% de mantequilla como la de la dieta con 15000 UI% de vitamina A (73, 74).

Puesto que en las dietas empleadas por Dam, la sustitución de glucosa por sa carosa aumenta la frecuencia de cálculos pigmentarios (60), Granados et al., (75) ensayaron varios azúcares de fácil absorción tales como son: sacarosa, fructuosa y glucosa adicionadas al nivel del 50% a la dieta básica (Purina). Los tres azúca res indujeron colelitiasis pigmentaria: la glucosa en un alto porcentaje, seguida de la sacarosa, mientras que la fructuosa fue poco litogénica.

Como se mencionó anteriormente, la colelitiasis pigmentaria producida por la mantequilla es más frecuente en machos que en hambras; lo mismo ocurre cuando la colelitaaisis se induce con vitamina A o con glucosa. La ovariectomía incrementa la frecuencia de hembras con cálculos pigmentarios, lo cual es contrario a lo que su cede en los machos, en los cuales la orquidectomía disminuye la frecuencia (76, 77).

Por otra parte, en la búsqueda de sustancias que prevengan la acción litogénica de la mantequilla y de la vitamina A. Se puso a prueba el producto comercial "Drenohepar" (Laboratorios Lepetit México, S.A.), el cual contiene coleréticos, colagogos y hepatoprotectores. El Drenohepar, al nivel del 2% en la dieta litogé nica de Purina y mantequilla, previno completamente la colelitiasis (78). También se estableció que de los constituyentes del Drenohepar, el ácido dehidrocólico al nivel de 0.5% en la dieta litogénica con mantequilla o con vitamina A, previene la colelitiasis pigmentaria (79).

Posteriormente se utilizó un extracto de aceite de cártamo denominado "Polifiat KA-02", el cual tiene la siguiente composición de ácidos grasos: ácido palmítico 6.5%, ácido esteárico 2.5%, ácido oleico 12%, ácido linoleico 77% y ácido li nolenico 2%. Este extracto previno la formación de cálculos pigmentarios con las

dietas litogénicas de glucosa y de vitamina A; no obstante que este extracto proviene del aceite de cártamo, éste último no protege contra la colelitiasis, así como tampoco lo hace el aceite de olivas (80).

Ratón: Trotman et al., reportaron una cepa de este ratón con anemia normoblástica (nb/nb) que desarrolla cálculos biliares del tipo negros de pigmento. Estos cálculos se presentan con una frecuencia del 75% y no se desarrollan antes de los 6 meses de edad. Las hembras muestran el doble de frecuencia que los machos. La bilis vesicular de ratones (nb/nb) con cálculos con respecto a los que no presentan cálculos tienen un pH más bajo y una mayor concentración de bilirrubina total, -- calcio y ácidos biliares. Asimismo, la fracción ionizada de bilirrubina no conjugada es más elevada en animales con colelitiasis que en los que no la presentan (56).

Ratón de patas blancas o matorralero (*Peromyscus*): se producen espontáneamente cálculos pigmentarios en animales con y sin esferocitosis. Los cálculos se presentan en todas las edades, en ambos sexos, pero son más comunes en los ratones -- con esferocitosis; se cree que factores hereditarios predisponen a estos animales para la formación de cálculos; este defecto no involucra sólo al gen recesivo responsable de la esferocitosis (55).

Perro de las praderas: la resección intestinal distal produce cálculos pigmentarios en este animal; se cree que la interrupción de la circulación enterohepática de los ácidos biliares, causa un incremento en la proporción de bilirrubina/ácidos biliares que provoca la precipitación de bilirrubinato de calcio (58).

Cobayo: en este animal se producen cálculos pigmentarios ricos en fosfatos de calcio, con una dieta semipurificada alta en colesterol y adicionada con riboflavina; los animales alimentados sólo con una dieta rica en colesterol no desarrollan cálculos. El exceso de colesterol provoca hígado graso, esplenomegalia y severa -- anemia sin pérdida preliminar de peso (52);

Más recientemente se ha reportado la inducción de cálculos pigmentarios en cobayos alimentados con una dieta de mantenimiento adicionada con un 0.5% de colesterol. Estos cálculos parecen formarse debido a anemia hemolítica inducida por el colesterol (53). Estos cálculos pigmentarios también se han producido en cobayos con cirugía de resección yeyunoileal de 50 a 95% (54).

Conejo: en este animal se producen cálculos de sales cálcicas de ácidos biliares con dietas ricas en colestanol, el cual es similar al colesterol, difiriendo sólo en que carece del doble enlace entre el C-5 y C-6. En el hígado el colestanol es convertido a ácido alocólico, el cual al entrar en la circulación enterohepática es convertido en ácido alodeoxicólico, el cual a su vez se conjuga con glicina

precipitándose en la bilis como una sal de calcio insoluble (59). Más recientemente se ha encontrado que el ácido oleico, al nivel de 15% en la dieta, es transformado en colestanol, el cual como ya mencionamos, produce estos cálculos pigmentarios (118). El antibiótico Kanamicina previene esta colelitiasis, lo cual indica que se requiere que el ácido alocólico sea transformado en alodeoxicólico por la flora intestinal para que se formen los cálculos (118).

Perro: este animal produce cálculos pigmentarios con dietas ricas en taurina y deficientes en proteínas, así como con dietas altas en carbohidratos adicionales de colesterol y con una baja proporción de proteína. Estos cálculos están constituidos por un residuo negro y mucoproteínas; el análisis del pigmento por resonancia nuclear, demuestra que es un pigmento polimerizado. La bilis que rodea estos cálculos presenta la bilirrubina, ácidos biliares no conjugados y hexosamina en concentraciones más elevadas que en la bilis de animales control, también muestran un pH más bajo (57).

C. Cálculos mixtos: son los más comunes, y están constituidos por pigmentos biliares, sales de calcio, una matriz proteica y aproximadamente 70% de colesterol, son numerosos, de superficie dura y facetada por la presión con los demás cálculos biliares; por lo general son lisos y de color café claro u oscuro. Algunos de estos cálculos tienen unas capas formadas de colesterol y otras de pigmentos biliares que delimitan un hueco central (2). Puesto que estos cálculos contienen altos niveles de colesterol, generalmente se considera su patogénesis y epidemiología - son semejantes a las de los cálculos de colesterol.

SEGUNDA PARTE

REVISION DE LA LITERATURA SOBRE LA VITAMINA A.

1. Historia:

El descubrimiento de la vitamina A ocurrió a principios de este siglo, en 1913 McCollum y Davis por un lado, y Osborne y Mendel por el otro, reportaron que ratas alimentadas con dietas sintéticas, en las cuales el tocino, era la única fuente de grasas, presentaban una deficiencia nutricional que podía corregirse administrando un factor contenido en la manteca, la yema de huevo y el aceite de hígado de bacalao (81).

En 1917 McCollum et al., demostraron que la vitamina liposoluble prevenía la xeroftalmia (82). En 1930 Moore demostró la relación entre la vitamina A en los animales y los pigmentos carotenoides llamados provitaminas A, los cuales son convertidos in vivo en la vitamina. En 1931 la vitamina A se aisló en grandes cantidades de el aceite de hígado de pescado, y su estructura fue establecida por Karrer, pero no fue sino hasta finales de los 40's cuando esta vitamina se produjo sintéticamente (83).

2. Química:

La vitamina A es el término genérico que se utiliza para todos los compuestos que exhiben cualitativamente la actividad del retinol (82). Las formas químicas más importantes de la vitamina A son el todo-trans-retinol (fig. 2), el cual es un alcohol que contiene un anillo β -ionona y una cadena lateral constituida por 2 unidades de isopreno; es incoloro, insoluble en disolventes no polares, inestable a la luz, resistente al calor y fácilmente oxidable. En el organismo se presenta principalmente en forma de palmitato de retinilo; otros ésteres que se presentan de manera natural son el estearato de retinilo, el retinil-fosfato y el metabolito activo manosil retinil-fosfato. Existen dos formas alcohólicas de la vitamina A, el retinol 1 y el retinol 2 o 3-dehidro-retinol; la forma aldehídica del retinol, el retinal, es un metabolito que actúa en la visión. Por otro lado la forma ácida, el ácido retinoico, es activo sólo para algunas funciones, tales como en la diferenciación de epitelios y en el crecimiento.

Las provitaminas o precursores del retinol se presentan de manera natural en plantas con α , β , y γ -caroteno. Estas formas de provitaminas A contienen uno o dos anillos alicíclicos de 6 átomos de carbono, y cadenas laterales constituidas por unidades de isopreno.

La actividad de la vitamina A, al igual que la de otras sustancias, es expresada en unidades internacionales las cuales son arbitrarias y en este caso se

se define como $0.3\mu\text{g}$ de retinol (84).

3. Metabolismo:

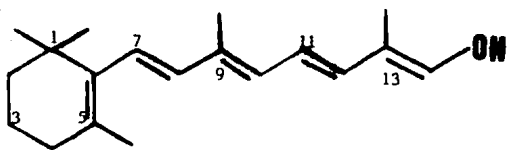
La vitamina A no es sintetizada por los vertebrados, los cuales dependen de la dieta para obtenerla. La principal fuente dietética de vitamina A son ciertos pigmentos carotenoides, tal como el β -caroteno de plantas, y los ésteres de retinilo provenientes de los tejidos animales. Los β -carotenos son convertidos en vitamina A principalmente en la mucosa intestinal; en este proceso intervienen dos enzimas: la β -caroteno 15, 15-desoxigenasa que rompe el β -caroteno en su doble enlace central para dar lugar a dos moléculas de retinal. Esta enzima es soluble y ha sido purificada del intestino de rata y conejo. La otra enzima es la retinaldehído reductasa, que reduce el retinal a retinol; esta enzima tiene un peso molecular de 60000 a 80000 y requiere de NADH o NADPH (85).

La vitamina A cuando se ingiere como ésteres de retinilo es hidrolizada en el intestino por enzimas pancreáticas tales como la retinil-éster-hidrolasa, fosfolipasas y lipasas. La absorción del retinol se lleva a cabo en la mucosa intestinal, el retinol sufre una esterificación que es catalizada por la enzima acil-CoA:retinol acil-transferasa, dando lugar principalmente al palmitato y estearato de retinilo.

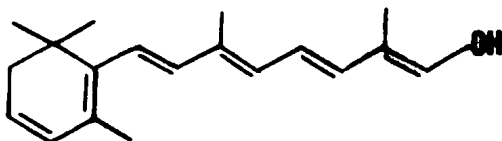
Los ésteres de retinilo son transportados en asociación con los quilomicrones por la linfa hacia la circulación general. En el compartimiento vascular los quilomicrones pierden muchos triglicéridos, debido a la acción de la enzima lipoproteína lipasa, los remanentes de los quilomicrones así formados constituyen una pequeña partícula rica en colestero, que contiene esencialmente todos los ésteres de retinilo originales. En el hígado el quilomicron remanente es captado por endocitosis, seguido de una degradación liposomal de sus constituyentes; se cree que la apolipoproteína E juega un papel importante en este proceso de captación (86).

El hígado es el principal almacén de vitamina A, con un 90% de las reservas totales del organismo. Después de la captación por el hígado, los ésteres de retinilo son hidrolizados e introducidos al citosol y reesterificados. En el hígado las células parenquimatosas son las que tienen un papel importante en la movilización del retinol del hígado hacia los tejidos; también hay células no parenquimatosas, las llamadas lipocitos, que son células de almacenamiento de vitamina A. Se ha sugerido que el retinol proveniente de los quilomicrones llega primero a las células parenquimatosas, de donde es transferido a los lipocitos (87).

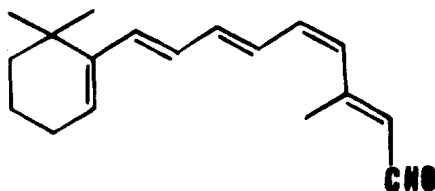
Las células parenquimatosas movilizan el retinol del hígado hacia la sangre unido a una proteína ligadora de retinol (PLR); en el humano esta proteína ligadora de retinol está constituida por una cadena polipeptídica con peso molecular



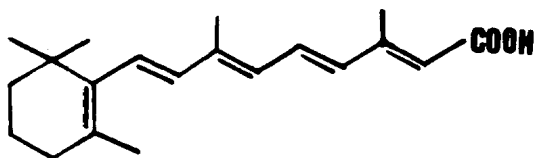
Vitamina A o Retinol-1



3-dehidro-retinol o Retinol-2



11-cis-retinal



Todo-trans-ácido retinoico

Fig 2. Principales formas químicas de la vitamina A

de 21000, y con un sólo sitio de unión para el retinol (88). Este complejo interactúa fuertemente con otra proteína que es la transterritina, también conocida como prealbúmina, la cual se une en proporción 1:1 con la PLR (89). En el humano el nivel usual de PLR es de 40 a 50 $\mu\text{g/ml}$ y el de transterritina de cerca de 200 a 300 $\mu\text{g/ml}$. El nivel de PLR en el plasma es fundamental para la regulación de la concentración de vitamina A en el mismo y su transporte a los tejidos.

En la deficiencia de vitamina A, el contenido hepático de la PLR aumenta y su concentración plasmática disminuye, al parecer porque la salida de PLR del hígado esta bloqueada (90).

Cuando la vitamina A dietética vuelve a estar disponible, el hígado libera rápidamente al plasma PLR unida al retinol, para transportarlo a los tejidos. Cuando hay deficiencia de proteínas (causada por desnutrición o por enfermedad parenquimatosa del hígado), la concentración de PLR se hace insuficiente y las concentraciones plasmáticas de vitamina A disminuyen a pesar de que las reservas hepáticas de ésta son normales. Otros estados patológicos también alteran las concentraciones plasmáticas de vitamina A y PLR: por ejemplo, en la fibrosis quística y en las infecciones febriles; también en las enfermedades renales, en las cuales la concentración sanguínea de vitamina A puede reducirse drásticamente.

Las vías de excreción de la vitamina A son la bilis, la orina y las heces. El primer paso en la eliminación del retinol del organismo es la oxidación a ácido retinoico, quizás a través del retinal, aunque esto ha sido puesto en duda ya que este último se halla en cantidades muy pequeñas en el hígado, riñón y algunos órganos blanco tales como las gonadas; sólo en la retina existe retinal en gran cantidad. Recientemente se ha demostrado que las células renales del cerdo oxidan retinol a ácido retinoico por la fracción microsomal del hígado, aunque también puede sufrir una isomerización dando lugar a 13-cis-ácido retinoico. El ácido retinoico sufre posteriormente otras modificaciones.

Olson et al. (92), identificaron el primer metabolito de vitamina A en la bilis de ratas, a las cuales se les administró ácido retinoico marcado. Los isómeros de todo-trans y 13-cis de ácido retinoico se conjugan dando lugar al retinoil- β -glucurónido, el cual representa el 10% de la dosis administrada. Otro metabolito identificado en la bilis es el 13-cis-4-oxoretinoil- β -glucurónido. Se han identificado en cultivo de tráquea dos metabolitos de ácido retinoico, el ácido todo-trans-4-hidroxi y el ácido todo-trans-4-oxoretinoico; los cuales in vivo son transformados en ácido 13-cis-oxoretinoico, el cual es excretado en la bilis como glucurónido y representa el 8.2% de la dosis de ácido retinoico suministrada (93, 94).

Una segunda vía de oxidación del ácido retinoico da lugar al ácido 5,6-epóxido retinoico, el cual es excretado a través de la bilis, y se ha encontrado conjugado con el ácido glucurónico (95).

Otro compuesto aislado e identificado en la bilis por Skare y colaboradores, proviene de la conjugación de un metabolito del ácido retinoico con taurina: este compuesto es muy polar y ácido, debido al grupo sulfonato de la taurina y representa el 6% de la dosis del ácido retinoico suministrado (142).

Se han identificado en las heces de rata 3 metabolitos, el ácido 4-oxoretinoico, el ácido retinoico con los metilos del anillo hidroxilados y el ácido 9-cis-5-hidroxitretinoico (96), y en la orina metabolitos parcialmente saturados o con la cadena lateral recortada (97).

La mayoría de los metabolitos de la vitamina A en la bilis aún no se han identificado; se sabe que aproximadamente el 34% de los metabolitos del ácido retinoico son reabsorbidos en el intestino, poseyendo algunos actividad de vitamina A, estos pueden ser utilizados y así aumentar el contenido total de vitamina A en el organismo (98).

4. Funciones:

La vitamina A es un nutriente esencial para los animales superiores. En los mamíferos se ha sugerido la existencia de varias funciones de la vitamina A en base al efecto de la deficiencia de este factor; éstas funciones son: a) Cromóforo en la visión nocturna, b) Diferenciación, crecimiento y mantenimiento de los tejidos epiteliales, c) Mantenimiento de la fisiología normal de las gonadas y del embarazo, d) Crecimiento de los huesos, e) Regulación de la glándula tiroides a través de la hipófisis. De estas funciones poco se conoce sobre su mecanismo a nivel bioquímico, a excepción de su papel en la visión nocturna como un cromóforo en los procesos visuales.

La vitamina A es indispensable en el proceso de la visión. La rodopsina, que es el pigmento visual receptor en la visión con baja intensidad luminosa, presente en los bastoncillos de la retina, 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 en opsina y todo-trans retinal.

Esto viene a constituir el activador molecular que produce un impulso en las terminaciones del nervio óptico, el cual es transmitido al cerebro.

La rodopsina puede ser regenerada desde opsina y todo-trans retinal. Este último puede nuevamente sufrir una isomerización para dar 11-cis retinal a tra-

ves 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 opsina para producir la rodopsina, completando así el ciclo visual (121).

La función de la vitamina A en la visión se diferencia claramente de la que tiene en el metabolismo. En las otras funciones están involucradas las dos formas de la vitamina A, el retinol y el ácido retinoico, estos pueden actuar ya sea en el núcleo celular alterando la expresión de la información genética de las células epiteliales, controlando así su diferenciación, o pueden funcionar extracelularmente en el retículo endoplásmico o en la membrana celular, controlando en ambos casos la síntesis de glicoproteínas específicas.

En relación con la acción nuclear de la vitamina A, se ha visto que controla la diferenciación de los epitelios, disminuyendo la expresión del epitelio escamoso estratificado y estimulando la del epitelio mucoso. En la deficiencia de la vitamina A el epitelio mucoso cambia a escamoso queratinizado. Cambios en dirección opuesta pueden ocurrir, como lo observaron Fitton-Jackson y Fell (110), quienes cultivaron piel de embrión de pollo de 12 días de edad en un medio con vitamina A, lo cual produjo que el epitelio de la piel cambiara de escamoso queratinizado a ciliado mucoso; cuando se transfirió de regreso al medio sin vitamina A, se revirtió el proceso y las células basales empezaron a producir nuevamente filamentos de queratina. Esta acción de la vitamina se ejerce en el núcleo celular, donde determina el tipo de queratina a sintetizar y el contenido correspondiente de RNAm para esa queratina (111). Asimismo, se ha demostrado que la deficiencia de vitamina A puede reducir la síntesis de DNA, RNA y proteínas en diferentes tejidos, tales como hígado, intestino, testículo y oviducto, siendo reversible este proceso con la administración de acetato de retinilo (112, 113 y 114).

En el mantenimiento de la fisiología normal de las gonadas y del embarazo, la acción de la vitamina A puede ser a través de la estimulación de los tejidos germinales y embrionarios en diferenciación, tales como 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 concebir, pero no mantener el embarazo, pues hay reabsorción fetal; en las aves el huevo, aunque fertilizado no se desarrolla más allá del segundo día (115, 116).

La regresión y reabsorción de algunos tejidos ha sido frecuentemente descrita como un efecto del exceso de retinol o ácido retinoico, por ejemplo, en hueso y cartilago así en explantos fetales de cartilago de rata, el exceso de ácido re tinoico induce cambios específicos en el patrón de síntesis de proteínas, lo que

sugiere que en el curso de la reabsorción del cartilago, los retinoides afectan la expresión genética; esto explicaría el porqué para que el ácido retinoico efectúe la regresión es necesario que la célula pueda llevar a cabo síntesis de RNA y proteínas (135).

En todas estas funciones nucleares de la vitamina A, las proteínas celulares ligadoras de retinol y ácido retinoico juegan un papel muy importante en transportar estos retinoides al nucleo celular.

La vitamina A tiene efectos sobre las membranas celulares en general, así como particular ejerce acción sobre la permeabilidad y la adhesión celular, así como en la interacción célula-célula. En la diferenciación celular, conforme se llega a la diferenciación terminal de 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 detergente, el cual hace más permeable a la membrana celular, revierte la acción del ácido retinoico (136).

Por otro lado, se ha observado que la metaplasia escamosa que se presenta en la piel de pollo cultivada en ausencia de vitamina A, es acompañada de pérdida de uniones entre células y al incluir ácido retinoico en medio de cultivo se duplican las uniones celulares (137).

Otra propiedad de las membranas celulares, tal como la adhesividad mostrada por células en cultivo, es afectada por la vitamina A así el tratamiento con ácido retinoico de células tumorígenas en cultivo, las cuales muestran una menor adhesión al sustrato, resulta en un aplanamiento y alineamiento más ordenado, así como en una mayor adhesividad (138). Algunas células tumorígenas no contienen proteínas celulares ligadoras ni de 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 celular (139). Esta acción es obtenida, al menos en parte, por mantener la glicoproteína fibronectina unida a la superficie celular (140), aunque el ácido retinoico también estimula la síntesis de ésta glicoproteína -- (140).

La vitamina A también afecta la fluidez de la membrana celular, en el proceso de diferenciación de células de carcinoma embrionario estimulada por el ácido retinoico, hay una reducción en la fluidez de la membrana (143). Asimismo, membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas alimentadas durante 2 meses con una dieta con niveles elevados de vitamina A, mostraron una fluidez significativamente

te menor que las de animales controles; ésta reducción en la fluidez de la membrana se correlaciona negativamente con el contenido de vitamina A en ellas (144).

La vitamina A es necesaria para el crecimiento celular; este crecimiento 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 EGP; lograndose este efecto al aumentar el número de receptores en la superficie celular (145).

La evidencia presentada sugiere que la función de la vitamina A en la superficie celular es ejercida principalmente a travez de un efecto en las glicoproteínas de esta. 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 estas al suministrar la vitamina (146), así como cambios en glicoproteínas específicas en células cultivadas en ausencia y presencia de la vitamina (147). Se ha reportado que la vitamina A, en forma de retinol-fosfato-manosa, interviene en la remanosilación de glicoproteínas específicas, después de que el oligosacárido ha sido transferido a la proteína, lo cual resulta en glicoproteínas con alto contenido de manosa (148). 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 aceptora; 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 glicosilación (149). El mecanismo por el cual la vitamina A afecta ésta transferencia del oligosacárido a la proteína aún no a sido establecido, pero es posible que la vitamina afecte la expresión del gen de la glicosil-transferasa, -- controlando así la biosíntesis de glicoproteínas.

5. Hipervitaminosis:

la ingestión de dosis altas o moderadamente altas de vitamina A pueden ser tóxicas para el organismo.

En el hombre, la toxicidad producida por hipervitaminosis A se ha incrementado en los últimos años debido a fadismos alimenticios, a su uso en ciertas condiciones dermatológicas tal como el acné, en el hipogonadismo relacionado con el alcoholismo y en la prevención del cáncer.

Los síntomas de envenenamiento agudo en el humano, generalmente incluyen: dolor de cabeza, somnolencia, irritabilidad, vértigo, vómito, enrojecimiento e hin

chazones eritematosas de la piel y engrosamiento de las plamas de las manos y p¹ i
tas de los pies. Los síntomas de hipervitaminosis A crónica pueden incluir irrita
bilidad, dolor de cabeza, dermatosis, alopecia, anorexia, pérdida de peso, erup -
siones maculoeritematosas en hombros y espalda, piel seca y escamosa con pruritis,
encias enrojecidas y gingivitis, hemorragias nasales y de la mucosa bucal, náusea
persistente, visión confusa y alteraciones del ciclo menstrual; también se presen
ta patología extensiva de los huesos, incluyendo desmineralización, lo que conduce
ha hinchazoanes dolorosas de las extremidades acompañadas con impedimento de la -
función locomotora (120 -122). Asimismo, se ha reportado hepatomegalia, esplenome
galia, ictericia y un incremento en la presión del fluido cefalorraquídeo (120).

Quizás los efectos tóxicos más serios de la elevada ingestión de vitamina A
son los daños irreparables del hígado, y la permanente inhibición del crecimiento
oseo debido a necrosis de las placas de crecimiento endocondral (120). Las princi
pales lesiones hepáticas son necrosis, fibrosis y cirrosis, que ocasionan obstruc
ción de la circulación portal, anormalidades en las funciones hepáticas y desarro
llo de ascitis e hipertensión portal (123). Las anormalidades funcionales del hí
gado generalmente consisten en ligeros cambios de las fosfatasas alcalinas, eleva
ción de las transaminasas, retención de sulfobromoftaleína y tiempos de protrombi
na. La histopatología de la intoxicación crónica con vitamina A en el hígado huma
no incluyen la acumulación de lipocitos perisinusoidales con fibrosis asociada,
congestión y dilatación sinusoidal, esclerosis de las venas centrales y atrofia -
de las hepatocitos adyacentes; la obliteración del espacio de Disse por células
de Ito inflamadas puede ser la causa de estos cambios (124). Las células de Ito
presentan numerosas vacuolas lipídicas, y hay transición de ellas a formas fibro
blásticas con retículo endoplásmico activo en síntesis de colagena (125). Recien
temente se ha encontrado 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 significativo (124).

La intoxicación con vitamina A ha sido extensivamente estudiada en animales,
pero casi exclusivamente en juvenes. La dosis de vitamina A necesaria para producir
hipervitaminosis en un animal, depende de la especie de que se trate: el ternero
y el cerdo están en un rango de susceptibilidad semejante al hombre (aproximada
mente 1 000 a 3 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día), mientras que la rata y carnivo
ros tales como el perro y el gato, y probablemente el oso polar y la foca, pueden
tolerar dosis extremadamente altas (20 000 a 60 000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) antes de mostrar
efectos clínicos de hipervitaminosis (120).

Un exceso de vitamina A en la dieta causa una aceleración de la reabsorción ósea de los huesos, 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 crecimiento (120, 126-128). Por otro lado, hay evidencia considerable del efecto teratogénico de la vitamina A suministrada en altas dosis en el ratón, rata, jámster y cobayo. Las malformaciones incluyen fisura palatina, costillas fusionadas, columna vertebral bífida, meningocefalia, hidronefrosis y anormalidades cardíacas y -genitourinarias (120, 129). 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 hipervitaminosis A (128). La administración de grandes dosis de retinol a ratas jóvenes durante 2 días, causa un incremento en los niveles de lípidos, glucogeno y citrato en el hígado, así como una marcada estimulación de la gluconeogénesis (130, 131).

Hay una tendencia a asociar la toxicidad con fenómenos membrana ya que, pequeñas cantidades de retinol son esenciales para mantener la estabilidad de las membranas, a través de un ligamento cruzado entre los lípidos y las proteínas de ellas, el exceso de esta vitamina se combina con lipoproteínas de las membrana y después con una proteína exógena para lisar células de diferentes tejidos y organelos celulares (132, 133). La acción inicial del exceso de retinol sobre eritrocitos es una expansión de la membrana celular, seguida por hemólisis (132). Las enzimas lisosomales son liberadas por exceso de vitamina A tanto in vitro como in vivo (134).

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 libre (129).

TERCERA PARTE

SECCION EXPERIMENTAL.

A. Objetivos:

El objetivo de este trabajo fue realizar una investigación acerca de las alteraciones producidas por la vitamina A en el jámster dorado que puedan ser responsables de la colelitiasis pigmentaria, tales como:

- 1) Hemólisis, la cual causaría un incremento de bilirrubina en la bilis (99).
- 2) Aumento en el contenido de proteínas en la bilis vesicular (100), lo que propiciaría el secuestro y nidación de pigmentos biliares para la formación de los cálculos (101).
- 3) Exceso de calcio en la bilis, ya que en estados de hipervitaminosis A se ha observado una remoción de calcio del tejido óseo (102), lo cual podría provocar exceso y precipitación de sales de calcio en la bilis.
- 4) Cambios en el pH de la bilis también pueden afectar la solubilidad de la bilirrubina y de las sales de calcio o incrementar la actividad de iones de calcio y la formación de sales insolubles (103).

Por lo anterior se compararon los valores hematológicos de jámsteres con dieta litogénica y controles normales, así como el contenido de bilirrubina, proteína, calcio y pH en la bilis vesicular. También se determinó calcio en suero, ya que se ha reportado hipercalcemia asociada a toxicidad de la vitamina A. Asimismo, se ha relacionado la frecuencia de colelitiasis con el estatus de vitamina A de animales mantenidos con diferentes niveles dietéticos de la vitamina.

B. Material y métodos:

En los cuatro experimentos realizados se utilizaron jámsteres dorados machos (Mesocricetus auratus), recién destetados (Cepa ChCM), la cual hasta hoy no ha producido mutantes de color del pelaje.

Los miembros de cada camada fueron distribuidos en forma que participaran por igual en los distintos grupos. Los animales fueron mantenidos en jaulas experimentales de hierro galvanizado con piso de malla metálica. La ración básica empleada fue el alimento para roedores pulverizado (DB) procedente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Las dietas experimentales y el agua fueron suministradas ad libitum en recipientes de hierro galvanizado.

Los animales fueron pesados semanalmente para determinar las curvas de crecimiento. Al término del período experimental los animales fueron sacrificados por

fractura de nuca y necropsiados inmediatamente después. Se empleó la prueba de "ji" cuadrada y "t de student" para el análisis estadístico de los resultados.

PRIMER EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento fue el de analizar los valores hematológicos de jámsteres con cálculos pigmentarios, y compararlos con controles normales.

Se utilizaron 14 machos de 30 días de edad promedio; se dividieron en dos grupos y se mantuvieron durante 105 días con las siguientes dietas experimentales: Grupo A, DB sola y Grupo B, DB + 25,000 UI% de acetato de vitamina A, procedente de Productos Roche S.A. de C.V., México, D.F. El experimento se realizó entre octubre y marzo.

Cinco días antes de sacrificar los animales, se tomaron muestras de sangre de 0.7 ml por punción cardíaca, con jeringa de insulina enjuagada con una solución de EDTA al 20% en 0.85% de NaCl. Las muestras fueron analizadas para hematocrito, hemoglobina, cuenta de reticulocitos, leucocitos y eritrocitos por métodos que se presentan más adelante.

al término de los 105 días experimentales, los jámsteres fueron sangrados como se indicó anteriormente (aprox. 3 ml) para determinación de bilirrubina. Inmediatamente después se necropsiaron y se disecaron hígado y bazo.

Las técnicas empleadas en este primer experimento fueron las siguientes:

a) Hematocrito: Se colocó el extremo de un tubo capilar de 75 mm, sobre la sangre, llenándose tres cuartos de su longitud. El extremo del tubo se cerró al fuego y se centrifugaron todos los capilares por 30 minutos a 3000 rpm en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350. Se midió con una regla graduada en milímetros la distancia ocupada del fondo del tubo al extremo del plasma y al extremo de las células empacadas, y se calculó el porcentaje correspondiente a esta últimas.

b) Hemoglobina: La concentración de hemoglobina fue determinada por el método de cianometahemoglobina. Se hizo una dilución 1:200 de la sangre (25 μ l) en solución de Drabkin (5 ml), la cual contiene NaHCO_3 1.0 gr/l, KCN 50 mg/l, KFe(CN)_6 200 mg/l (150).

Las lecturas se realizaron a 540 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II.

Los valores de las absorbancias obtenidas fueron calculadas asumiendo un coeficiente de extinción milimolar de la cianometahemoglobina de 44, y su peso molecular de la hemoglobina de 66 000.

c) Cuenta de eritrocitos: La cantidad de células rojas en las muestras se determinó en un contador electrónico Haema Count MK-25 (General Science, USA) por

duplicado. Se tomaron 20 μ l de sangre que se diluyeron en 16 ml de Isoton (NaCl 7.93 gr/l, EDTA 0.38 gr/l, KCl 0.40 gr/l, NaH_2PO_4 0.19 gr/l, Na_2HPO_4 1.95 gr/l).

De esta primera dilución 1:800 se tomaron 100 μ l y se llevaron a un volumen de 10 ml con Isoton. Esta última muestra con una dilución 1:80 000 sirvió para determinar el número de eritrocitos, expresado en el contador como un número $\times 10$ a la 6/ mm^3 .

d) Tinción de reticulocitos: En un portaobjetos se colocó una gota de azul de cresilo brillante al 1% en solución salina, y se mezcló con una gota de gangre.

La mezcla se toma con un capilar y se colocó en una cámara húmeda por 20 minutos; luego se hizo un frote con dos cubreobjetos, se dejó secar y se montó en un portaobjetos con aceite de inmersión. Se contaron 1500 células al microscopio (Contraste de Fases Zeiss con objetivo de 100 X) y se calculó el porcentaje de reticulocitos.

e) Bilirrubina en plasma: El estandar se preparó de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se colocaron 5 mg de bilirrubina cristalizada con 1 ml de dimetil sulfóxido, se mantuvo a una temperatura de 40 °C hasta disolver totalmente la bilirrubina. En un matraz aforado de 10 ml se colocaron 7 ml de albúmina sérica bovina al 45% y se añadieron 0.4 ml de solución de bilirrubina, agitándose continuamente; luego se aforó a 10 ml con la solución de albúmina. La concentración de este estandar fue de 20 mg/100 ml o 340 M de bilirrubina. Para el ensayo de bilirrubina se hizo una dilución para obtener una concentración de 85 μ M (104).

La concentración de bilirrubina en plasma se determinó por el método de Michaelson (105), con muestras de plasma de 0.05 ml, 2 para la prueba y 1 para el blanco, las cuales fueron diluidas con 0.2 ml de agua. A las muestras de prueba se les agregó 0.5 ml de cafeína-benzoato (20 g de cafeína, 30 g de benzoato de sodio y 50 gramos de acetato de sodio trihidratado por litro), seguido por 0.1 ml de reactivo Diazo (5 g de ácido sulfanílico disueltos en 15 ml de HCl concentrado y llevado a un litro con agua; a 10 ml de esta solución se le agregaron 0.5 ml de NaNO_2 al 0.5% inmediatamente antes del ensayo; diez minutos más tarde se agregaron 0.2 ml de ácido ascórbico al 10%. Por último se agregaron 0.4 ml de tartrato de sodio-potasio alcalino (100 g de NaOH y 350 g de tartrato de sodio-potasio por litro). A la muestra blanco se le agregaron, primero 0.2 ml de ácido ascórbico al 10%, seguido por el reactivo Diazo, cafeína-benzoato y tartrato de sodio-potasio alcalino, como a las muestras prueba. La absorbancia a 600 nm fue medida inmediatamente en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II.

SEGUNDO EXPERIMENTO.

El objetivo de este experimento fue determinar el status de vitamina A y su relación con la frecuencia de colelitiasis en jámsteres alimentados con dieta básica sola (Grupo 1), y adicionada con acetato de vitamina A a los siguientes niveles: Grupo 2, 5 000 UI%; Grupo 3, 10 000 UI%; Grupo 4, 15 000 UI%; Grupo 5, --- 25 000 UI%. El status de vitamina A de los animales fue determinado midiendo la concentración de vitamina A plasmática y hepática.

Se utilizaron 15 jámsteres de 28 días de edad promedio en cada grupo, los --- cuales se mantuvieron 70 días con las dietas experimentales. El estudio se realizó entre junio y agosto.

Al final del período experimental los animales fueron anestesiados y sangrados por punción cardíaca (aprox. 3 ml) como en el primer experimento; se sacrificaron y necropsiaron. Se disecó y peso el hígado.

La determinación de vitamina A en hígado y plasma se realizó por medio de --- las siguientes técnicas:

a) Vitamina A hepática: La determinación de vitamina A en hígado se hizo por método de Olson (106): un gramo de hígado se colocó en un vial de 60 X 25 mm, se agregaron 2.5 g de sulfato de sodio anhidro y se maceró con una varilla de vidrio hasta obtener una mezcla de consistencia pastosa; luego se adicionaron 10 ml de - cloroformo y el vial se mantuvo entre 0 y 4 °C por 12 horas. Posteriormente se - hizo una dilución del extracto de cloroformo con alcohol etílico absoluto y se - leyó la absorbancia a 380, 330 y 280 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II. El contenido de vitamina A se cálculo con la siguiente formula:

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

$$0.5(2.27 \times A_{330} - A_{280} - A_{380}) = A_{330} \text{ Corregida.}$$

No se determinó A450, ya que en un estudio preliminar se observó que los extractos de hígado de jámsteres en experimentación no hay absorbancia apreciable a esta longitud de onda, lo que indica la ausencia de carotenos en el hígado que --- pudieran interferir con la determinación de vitamina A.

b) Vitamina A plasmática: La concentración de vitamina A en plasma se determinó por el método fluorométrico de Thompson (107). La calibración del espectro --- fluorómetro se llevó a cabo con un estandar secundario preparado de la siguiente manera: 10 mg de acetato de vitamina A se saponificaron con 1 ml de agua con 0.5 g

de KOH durante 20 minutos en agua hirviendo, luego 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 3 g de alúmina 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; esta última fracción se colectó y evaporó, luego se diluyó con hexano hasta obtener una absorbancia de 0.2 a 325 nm, que equivale a 1 μ g de retinol/ml usando un coeficiente de extinción de 1% a 1 cm de 1830.

De la solución anterior se hizo una dilución de 20 veces para obtener una concentración de 0.05 μ g/ml que se emplea como estandar de vitamina A, el cual es estable solo unas horas; la fluorescencia de este estandar 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 μ g/ml en 0.1 N de ácido sulfúrico, la cual fue utilizada como estandar en posteriores determinaciones, ya que es estable.

Las muestras de plasma se analizaron por duplicidad; se colocaron 250 μ l de muestra en cada tubo y 250 μ l de etanol; luego se añadieron 3 ml de hexano. Esta mezcla se agitó en vortex por 1 minuto, y se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350. Todo el proceso se llevó a cabo en la semioscuridad. La fluorescencia del extracto de hexano se leyó a 330 nm de excitación y 480 nm de emisión en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo LS-5.

TERCER EXPERIMENTO.

El objetivo de este experimento fue determinar si la concentración de bilirrubina en bilis y el volumen biliar vesicular de animales con cálculos se pudieran encontrar alterados.

Se emplearon 15 machos, 6 del grupo A y 9 del grupo B. El grupo A recibió DB sola y el grupo B, DB + 25 000 UI% de acetato de vitamina A.

Los jámsteres se mantuvieron durante 70 días con las dietas experimentales.

El experimento se realizó de octubre a diciembre.

Al final del período experimental los animales fueron sangrados por punción cardíaca, como en el primer experimento, y se sacrificados por fractura de nuca, realizándose las necropsias inmediatamente después.

a) Volumen biliar: La vesícula fue disecada y la bilis se colectó con una jeringa Hamilton de 100 μ l y se anotó el volumen; luego se colectó la bilis en un tubo de ensayo con 0.4 ml de EDTA 10 mM pH 7.4. Todo el proceso de colecta de bi-

lis se realizó en la semioscuridad. Las muestras se guardaron a 0 °C y se analizó la bilirrubina a las 24 horas.

b) Bilirrubina en bilis: La determinación de bilirrubina en bilis se realizó por el método de Van-Roy (108); el reactivo Diazo fue preparado mezclando 0.15 ml de NaNO₂ (100 mg/ml) con 4 ml de 2 M de ácido p-tolueno sulfónico; 2 ml de esta solución se adicionaron de 1 ml de solución de p-yodoanilina (21 mg/ml) en ácido acético glacial. Después de 2 minutos a temperatura ambiente se le adicionaron -- 5 ml de agua y 0.1 de sulfamato de amonio.

El reactivo blanco se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 2 ml de -- 2 M de ácido p-tolueno sulfónico con 1 ml de la solución de p-yodoanilina y 5 ml - de ácido ascórbico al 10%.

La solución estandar fue preparada disolviendo 3 mg de bilirrubina con 0.4 ml 0.1 N de NaOH con 5 mM de EDTA; se pasó luego a un matraz aforado de 100 ml con -- agua destilada y se llevó a volumen.

Las muestras se dividieron en tres partes (dos de prueba y un blanco) en tubos de ensayo, los cuales contenían 2 ml de acetona-etanol 1:1 (v/v) con 15 mg/ml de 2,6 diterbutil-p-cresol. Para los tubos de prueba se adicionó 0.5 ml de reactivo Diazo y para los tubos blanco, 0.5 ml de reactivo Diazo blanco. Después de una hora a °C, en 0.1 M de cloruro de sodio. Se agregaron 2 ml de acetato de butilo y se extrajeron los pigmentos diazo agitando en un vortex por 30 segundos. Posteriormente se centrifugó a 2 000 rpm durante 10 minutos, se determinó la absorbancia del extracto a 530 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II.

En cada tubo estandar se pipetearon 0.05 ml, 0.1 ml y 0.15 ml de la solución estandar, i.e., 1.5, 3.0 y 4.5 mg de bilirrubina por tubo, y se trataron de igual manera que las muestras.

CUARTO EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento fue determinar los cambios del pH biliar, la concentración de calcio en bilis y plasma, y la concentración de proteína biliar en animales con y sin cálculos. Asimismo, se determinó la vitamina A hepática en ambos grupos para comparar los resultados con los de anteriores experimentos.

Se emplearon 12 animales del grupo A, que recibió DB sola y 20 animales del grupo B que recibió DB + 25 000 UI% de acetato de vitamina A. Los jámsteres se man tuvieron durante 70 días con las dietas experimentales. Este experimento se realizó de enero a abril.

Al final del período experimental los animales de cada grupo fueron divididos

al azar para los diferentes estudios.

a) pH biliar: se utilizaron 16 animales, 6 del grupo A y 10 del grupo B, los cuales fueron puestos en ayuno durante 24 horas antes de ser sacrificados y necropsiados. Se disecó la vesícula biliar y se colectó la bilis con jeringa Hamilton de 100 μ l, se midió el volumen y se colocó la bilis en un papel parafilm para medir el pH con un electrodo de superficie.

b) Calcio en suero y bilis: se utilizaron 16 animales, 6 del grupo A y 10 — del grupo B, la determinación de calcio se realizó utilizando un juego de reactivos para calcio de los Laboratorios Hycel de México S.A. de C.V. México D.F.

c) Determinación de proteína total: se utilizaron 13 animales, 6 del grupo A y 7 del grupo B; la proteína vesicular fue determinada por el método de Lowry et al. (109). El reactivo A se preparó mezclando un volumen de 2% de tartrato de sodio-potasio (peso/vol) con 100 volúmenes de 2% de Na_2CO_3 (peso/vol) en 0.1 N de NaOH, y agregando un volumen de 1% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (peso/vol). El reactivo B se preparó con una dilución del reactivo de Folin-Ciocalteu fenol con agua (1:1). Las muestras fueron diluidas con agua para tener una concentración aproximada de 100 a 300 μ g de proteína/ml; luego 0.1 a 0.3 ml de muestra fueron adicionados de 10 volúmenes de reactivo A. Después de 10 minutos se adicionó un volumen de reactivo B. Al cabo de 30 minutos las lecturas se hicieron a una absorbancia de 600 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II. Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina con una concentración de 0.3 mg/ml.

C. Resultados:

Primer Experimento:

Los resultados del Primer Experimento, en relación con la frecuencia de colelitiasis en los 2 grupos, se presentan en la Tabla 1, la cual muestra que los animales que recibieron la dieta básica (Grupo A), no presentaron cálculos biliares, mientras que el grupo que recibió la dieta básica adicionada con 25 000 UI% de acetato de vitamina A (dieta litogénica), exhibió una alta frecuencia de colelitiasis (71.3%), siendo la diferencia significativa al nivel de 0.01. Como signos clínicos de hipervitaminosis A, los animales que recibieron la dieta litogénica solo presentaron una ligera alopecia dorsal, mientras que los pesos de hígado y bazo (Tabla 1) no mostraron diferencias significativas ($p < 0.1$ y $p < 0.8$, respectivamente) comparados con los del grupo control.

Los resultados del análisis hematológico de ambos grupos se presentan en la Tabla 2, en donde se observa que el grupo B, que recibió dieta litogénica, no muestra diferencias significativas respecto a hematocrito, concentración de hemoglobina, eritrocitos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media y reticulocitos, al compararlos con los del grupo A, que recibió la dieta básica sola. La bilirrubina plasmática tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos, la cual se encuentra en muy baja concentración, como ocurre en otros roedores.

En cuanto al crecimiento, los resultados se presentan como incremento de peso semanal en la Tabla 3 y en la Fig. 3, en las cuales se observa lo siguiente: el grupo que recibió la dieta básica adicionada con 25 000 UI% de acetato de vitamina A disminuyó notablemente su crecimiento a partir de la sexta semana, mostrando al término del experimento un crecimiento menor de 13 gramos, con respecto al grupo control.

Segundo Experimento:

En este experimento se determinó el status de vitamina A y la frecuencia de colelitiasis de jámsteres alimentados con diferentes niveles de vitamina A. Los resultados muestran Tabla 4, que el grupo 3 solo presentó 1 animal con cálculos biliares (6.7%), mientras que en los grupos 4 y 5 las frecuencias de colelitiasis fueron prácticamente iguales (40 y 42.9% respectivamente); sin embargo, de estos dos grupos, la masa promedio de cálculos fue superior en el grupo 5, el cual recibió el nivel más alto de vitamina A. El único animal que presentó cálculos del grupo 3 tuvo una masa de estos muy elevada, lo cual lo señala como un animal indi

TABLA 1.

FRECUENCIA DE CALCULOS BILIARES Y PESO PORCENTUAL DE HIGADO Y BAZO EN EL PRIMER EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	No TOTAL ANIM.	No ANIM. CON CS.	% ANIM. CON CS.	PESO % DEL HIGADO	PESO % DEL BAZO
A DIETA BASICA (DB)	7	0	0	4.4 ± 0.3	0.088 ± 0.010
B DB + 25,000 UI% DE VITAMINA A.	7	5	71.3	5.0 ± 0.8	0.090 ± 0.011

CS : Cálculos biliares.

TABLA 2

VALORES HEMATOLOGICOS Y CONCENTRACION PLASMATICA DE BILIRRUBINA EN EL PRIMER EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	HEMATOCRITO %	HEMOGLOBINA (mg/dl)	CELULAS ROJAS POR $10^6/\text{mm}^3$	VCM (μm^3)	HbCM (pg)	CHbCM (g/dl)	RETICULOCITOS %	BILIRRUBINA PLASMATICA (mg/dl)
A DIETA BASICA (DB)	47.6 ± 3.4	17.1 ± 1.02	7.62 ± 0.3	62.5 ± 3.1	22.5 ± 1.0	35.9 ± 1.5	2.0 ± 0.4	5.4 ± 0.4
B DB + 25000 UI% de vitamina A	49.9 ± 2.8	16.7 ± 0.62	7.59 ± 0.2	61.9 ± 4.6	21.9 ± 1.2	35.5 ± 1.1	2.4 ± 0.5	5.1 ± 1.2

VCM: VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO.

HbCM: HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA.

CHbCM: CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA.

TABLA 3.

INCREMENTO DE CRECIMIENTO, EN GRAMOS. DEL PRIMER EXPERIMENTO.

SEMANAS	GRUPO A	GRUPO B
1	9 ± 3.7	10 ± 3.6
2	18 ± 2.5	17 ± 4.2
3	24 ± 4.5	27 ± 1.9
4	32 ± 1.9	35 ± 1.8
5	39 ± 3.2	39 ± 1.5
6	48 ± 1.8	43 ± 1.4
7	52 ± 2.1	45 ± 1.8
8	55 ± 1.6	46 ± 1.2
9	56 ± 1.4	47 ± 1.6
10	59 ± 1.7	51 ± 1.1
11	62 ± 1.4	50 ± 0.9
12	60 ± 2.0	51 ± 0.8
13	63 ± 1.3	50 ± 2.0
14	67 ± 1.2	54 ± 1.7

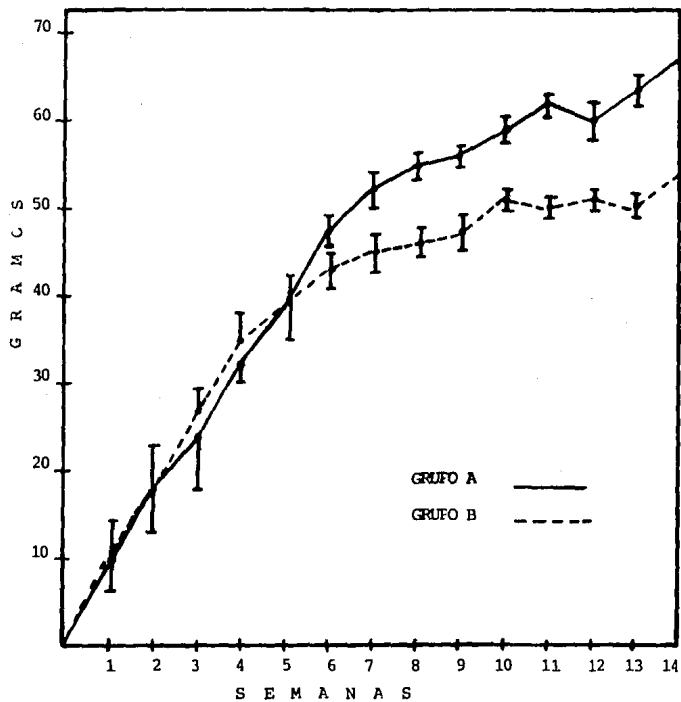


Fig 3. Curvas de incremento de crecimiento de los grupos del -- Primer Experimento: Grupo A, Dieta Básica (DB); Grupo B, DB + -- 25 000 UI% de Vitamina A.

vidualmente muy susceptible a la colelitiasis pigmentaria. En relación con la concentración plasmática de vitamina A, se puede observar en la Tabla 4 que no hubo diferencias significativas entre el grupo control y los que recibieron 5 000, -- 10 000 y 15 000 UI% de vitamina A; no obstante, el grupo 5 que recibió 25 000 UI% de vitamina A, si mostro un incremento significativo ($p < 0.001$) en el nivel plasmático de esta vitamina. Respecto al retinol hepático Tabla 4, hubo una relación directa entre los niveles dietético y hepático de esta vitamina.

En cuanto al peso porcentual de hígado y bazo (Tabla 5), no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos.

En la Tabla 6 y en la Fig. 4 se presentan los datos y las curvas de crecimiento de los 5 grupos. El grupo que recibió la dieta básica sola exhibió el mayor crecimiento, con diferencias superiores en incremento final de 7, 14, 19 y 12 gramos en comparación con los grupos 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Se puede observar que mientras mayor fue el nivel dietético de vitamina A menor fue el crecimiento excepto para el grupo 5, que apesar de recibir el nivel mayor de vitamina A su incremento de peso fue mayor que el de los grupos 3 y 4, que recibieron 10 000 y 15 000 -- UI% de vitamina A.

Tercer Experimento:

En este experimento se determinó si el volumen de bilis vesicular y de bilirrubina biliar se encuentran alterados en los animales que reciben la dieta litogénica.

Los resultados de este experimento respecto a la frecuencia de colelitiasis, se resumen en la Tabla 7: al Grupo A se le administró la dieta básica sola y al Grupo B la dieta litogénica. Como se ha demostrado en experimentos anteriores, - los animales del Grupo A no exhibieron litiasis biliar, pero en el Grupo B de un total de 9 animales, 8 presentaron colelitiasis, lo cual representa el 88.9% -- ($p < 0.01$).

Los resultados del análisis de la bilis respecto a volumen vesicular y bilirrubina, se presentan en la Tabla 8, en la cual se muestra que el volumen de bilis vesicular fue mayor en el grupo que recibió la dieta litogénica (Grupo B), -- aunque esta diferencia no es significativa ($p < 0.1$). La concentración de bilirrubina fue significativamente menor ($p < 0.05$) en el Grupo B (5.04 ± 0.68) que en el Grupo A (9.87 ± 3.28); sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.2$) en la bilirrubina total entre ambos grupos.

En la Tabla 9 y Fig. 5 se presentan las curvas de incremento de peso promedio semanal en ambos grupos, en ellas se puede observar que el crecimiento fue similar en ambos grupos, pues la diferencia fue de sólo 2 gramos.

TABLA 4.

FRECUENCIA DE CALCULOS BILIARES Y VITAMINA A HEPATICA Y PLASMATICA EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	No. TOTAL ANIM.	No. ANIM. CON CS.	% ANIM. CON CS.	PESO PROMEDIO DE CS. EN CADA GRUPO.	VITAMINA A HEPATICA (g/g)	VITAMINA A PLASMATICA (g/dl)
1 DIETA BASICA (DB)	14	0	0	0	181 $\pm$ 59	41.7 $\pm$ 6.8
2 DB + 5000 UI% DE VITAMINA A	13	0	0	0	597 $\pm$ 239	46.0 $\pm$ 13.9
3 DB + 10000 UI% DE VITAMINA A	15	1	6.66	0.1	873 $\pm$ 167	40.1 $\pm$ 11.0
4 DB + 15000 UI% DE VITAMINA A	15	6	40.0	0.073	1193 $\pm$ 123	54.8 $\pm$ 23.7
5 DB + 25000 UI% DE VITAMINA A	14	6	42.9	0.92	1791 $\pm$ 285	99.8 $\pm$ 24.5

CS: CALCULOS BILIARES.

TABLA 5.

PESO PORCENTUAL DE HIGADO Y BAZO EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	PESO % DEL HIGADO	PESO % DEL BAZO
1 DIETA BASICA (DB)	4.15 ± 0.32	0.09 ± 0.02
2 DB + 5000 UI% DE VITAMINA A	4.20 ± 0.65	0.07 ± 0.02
3 DB + 10000 UI% DE VITAMINA A	4.31 ± 0.61	0.08 ± 0.02
4 DB + 15000 UI% DE VITAMINA A	4.05 ± 0.46	0.09 ± 0.03
5 DB + 25000 UI% DE VITAMINA A	3.99 ± 0.45	0.08 ± 0.01

TABLA 6.

INCREMENTO DE CRECIMIENTO, EN GRAMOS, DEL SEGUNDO EXPERIMENTO.

SEMANAS	GRUPOS				
	1	2	3	4	5
1	8 ± 7.9	6 ± 3.9	6 ± 3.2	5 ± 2.9	5 ± 5.1
2	13 ± 1.7	10 ± 1.7	11 ± 1.7	9 ± 1.5	11 ± 2.0
3	33 ± 5.3	27 ± 5.1	16 ± 9.1	11 ± 5.8	21 ± 3.5
4	38 ± 2.4	27 ± 5.0	21 ± 4.2	16 ± 3.8	25 ± 2.5
5	42 ± 3.5	29 ± 4.6	28 ± 2.9	24 ± 3.4	30 ± 4.1
6	49 ± 2.9	39 ± 3.8	33 ± 3.0	30 ± 2.1	38 ± 2.2
7	52 ± 2.4	42 ± 2.6	35 ± 1.7	31 ± 1.0	42 ± 2.1
8	55 ± 3.1	45 ± 2.2	41 ± 5.3	34 ± 2.9	41 ± 1.8
9	59 ± 2.0	52 ± 3.2	45 ± 4.0	40 ± 2.4	47 ± 1.5

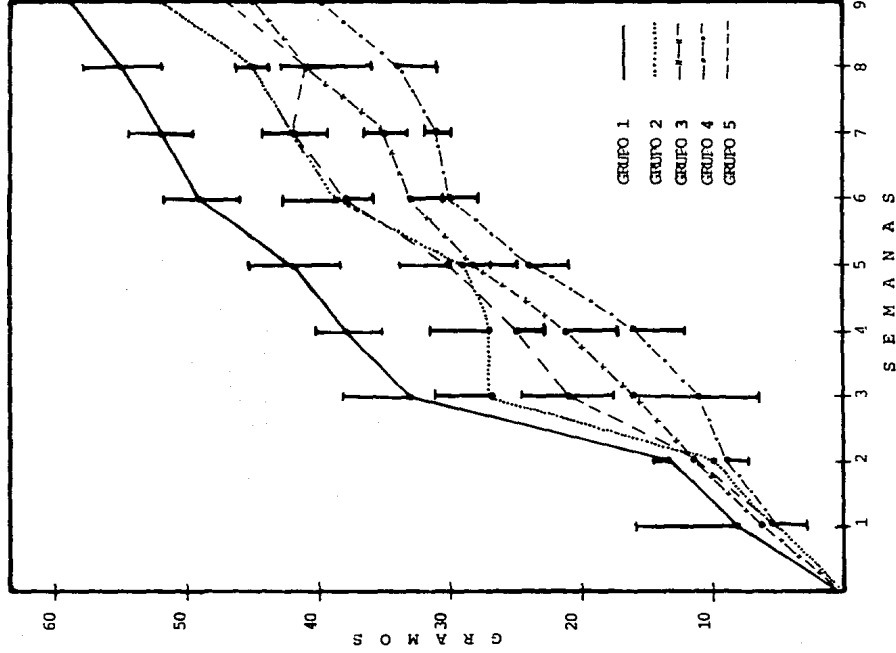


Fig 4 . Curvas de incremento de crecimiento de los 5 grupos del Segundo Experimento: Grupo 1, Dieta Básica (DB); Grupo 2, DB + 5 000 UI% de Vitamina A; Grupo 3, DB + 10 000 UI% de Vitamina A; Grupo 4, DB + 15 000 UI% de Vitamina A; Grupo 5, DB + 25 000 UI% de Vitamina A.

TABLA 7

FRECUENCIA DE LOS CALCULOS BILIARES EN EL TERCER EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	No TOTAL ANIMALES	No ANIMALES CON CALCULOS	PORCENTAJE ANIMALES CON CALCULOS
A DIETA BASICA (DB)	5	0	0
B DB + 25000 UI% DE VITAMINA A	9	8	88.9

TABLA 8

VOLUMEN BILIAR VESICULAR Y BILIRRUBINA BILIAR EN EL TERCER EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	VOL. BILIAR VESICULAR (l)	CONCENTRACION DE BILIRRUBINA (mg/dl)	BILIRRUBINA TOTAL (g/vesícula biliar)
A DIETA BASICA (DB)	34.0 $\pm$ 5.5	9.87 $\pm$ 3.28	3.53 $\pm$ 1.14
B DB + 25000 UI% DE VITAMINA A	43.8 $\pm$ 13.1 **	5.04 $\pm$ 0.68 *	2.34 $\pm$ 0.49

*P < 0.05

**P < 0.1

TABLA 9

INCREMENTO DE CRECIMIENTO, EN GRAMOS, DEL TERCER EXPERIMENTO.

SEMANAS	GRUPOS	
	A	B
1	2 ± 1.5	3 ± 2.0
2	13 ± 1.7	13 ± 3.0
3	21 ± 1.6	24 ± 2.6
4	31 ± 1.7	31 ± 2.6
5	38 ± 1.5	37 ± 1.6
6	41 ± 2.4	41 ± 1.1
7	48 ± 1.8	44 ± 1.1
8	46 ± 1.4	47 ± 0.9
9	47 ± 1.2	44 ± 0.8
10	48 ± 1.0	45 ± 0.7
11	50 ± 0.8	47 ± 0.4
12	50 ± 0.6	45 ± 0.4
13	47 ± 0.5	45 ± 0.5

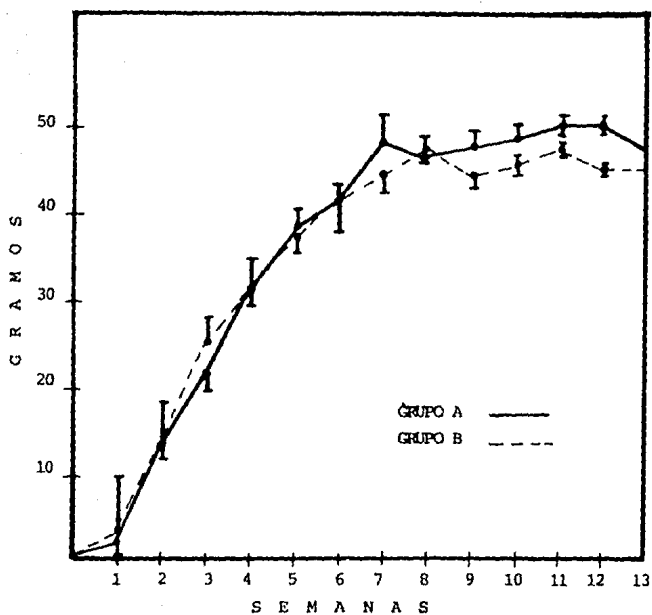


Fig 5. Curvas de incremento de crecimiento de los grupos del Tercer Experimento: Grupo A, Dieta Básica (DB); Grupo B, DB + 25 000 UI% de Vitamina A.

Cuarto Experimento:

En este experimento se estudió la posibilidad de que algunos factores biliares que se sabe que participan directa o indirectamente en la formación de los cálculos pigmentarios, tales como el pH, las proteínas totales y el calcio total, pudieran encontrarse alterados en los jámsteres que reciben la dieta litogénica.

Asimismo se analizó el calcio sérico, pues se ha reportado que en la hipervitaminosis A hay reabsorción ósea e hipercalcemia.

Respecto a la frecuencia de colelitiasis, los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 10, donde se muestra que, al igual que en los anteriores experimentos, el Grupo I, que recibió la dieta básica, no presentó cálculos biliares, mientras que el Grupo II, al cual se le suministró la dieta litogénica presento 20 animales con cálculos 95.2% (p 0.01).

En la Tabla 11 se presentan los resultados de los análisis hechos en bilis y suero. Se determinó pH, proteína y calcio en bilis y suero. Al comparar los resultados de ambos grupos se observó que en ninguno de estos parámetros hubo diferenencias estadísticamente significativas, ya que los valores en ambos grupos fueron similares.

En relación con el crecimiento, los resultados se presentan en la Tabla 12 y Fig. 6; aquí puede observarse que el Grupo II exhibió un menor crecimiento que el Grupo I, desde las primeras semanas, llegando a ser la diferencia de 10 gramos al final del experimento.

TABLA 10

FRECUENCIA DE CALCULOS BILIARES EN EL CUARTO EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	No TOTAL ANIMALES	No ANIMALES CON CALCULOS	% ANIMALES CON CALCULOS
I DIETA BASICA (DB)	12	0	0
II DB + 25000 UI% DE VITAMINA A	21	20	95.2

TABLA 11

VALORES DE pH, CALCIO EN BILIS Y CALCIO SERICO EN EL CUARTO EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	pH EN BILIS	PROTEINA BILIAR (mg/dl)	CALCIO BILIAR (mg/dl)	CALCIO SERICO (mg/dl)
I DIETA BASICA (DB)	7.82 ± 0.23 (n=6)	2.58 ± 1.89 (n=6)	22.2 ± 8.5 (n=5)	11.3 ± 1.4 (n=6)
II DB + 25000 UI% DE VITAMINA A	7.99 ± 0.16 (n=10)	3.89 ± 1.92 (n=7)	29.6 ± 9.0 (n=10)	11.3 ± 1.9 (n=10)

TABLA 12

INCREMENTO DE CRECIMIENTO, EN GRAMOS, DEL CUARTO EXPERIMENTO.

SEMANAS	GRUPOS	
	I	II
1	4 ± 3.4	4 ± 4.7
2	12 ± 2.0	10 ± 5.1
3	18 ± 2.4	13 ± 3.1
4	23 ± 1.6	18 ± 3.6
5	27 ± 1.4	20 ± 2.5
6	30 ± 1.2	23 ± 2.0
7	32 ± 1.7	25 ± 2.7
8	35 ± 1.7	28 ± 3.0
9	37 ± 1.5	30 ± 1.4
10	40 ± 2.4	32 ± 3.3
11	43 ± 1.8	35 ± 2.9
12	45 ± 1.4	35 ± 1.8

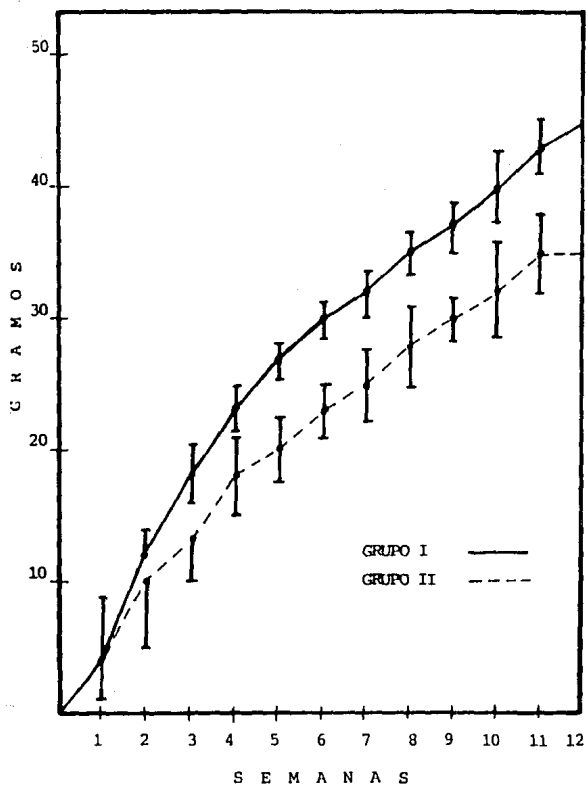


Fig 6 . Curvas de incremento de crecimiento de los grupos del Cuarto Experimento: Grupo I, Dieta Básica (DB); Grupo II, DB + 25 000 UI% de Vitamina A.

D. Discusión:

En el presente estudio se analizaron por vez primera algunos parámetros biológicos que pudieran estar asociados a la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster dorado. Se investigó si existía o no aumento en la concentración biliar de algunos componentes que forman cálculos, tales como bilirrubina, proteína y calcio. Debido a la relación que existe entre la colelitiasis pigmentaria y diversas alteraciones hematológicas que pueden conducir a una sobre producción de bilirrubina, se determinaron los valores hemtológicos que pudieran indicar la existencia de anemia y/o hemólisis. También se analizó calcio en suero, el cual podría señalar un excesiva movilización de este desde los huesos. Asimismo, se determinó el pH biliar, el cual puede alterar la solubilidad de varios componentes de la bilis, y provocar que aún a concentraciones normales estos componentes se precipiten.

Estos estudios fueron iniciados con la determinación de los valores hematológicos del jámster alimentado con la dieta litogénica a base de vitamina A, ya que hay una fuerte evidencia en humanos y en modelos experimentales (ratón anémico, - ratón de patas blancas o matorralero y cobayo) de una asociación entre hemólisis y/o anemia hemolítica y colelitiasis pigmentaria (15, 52, 53, 54, 55, 56). De los valores determinados ninguno indicó la existencia de anemia, pues los valores de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y los valores calculados apartir de estos parámetros (VCM, HbCM y CHbCM), fueron muy similares a los del grupo control; tam poco hubo indicios de una hemólisis compensada, ya que la cuenta de reticulocitos y la concentración de bilirrubina en plasma fueron normales. Se determinó en jámsteres urobilinógeno fecal en heces de 24 horas, ya que es un parámetro muy sensible a la sobreproducción de bilirrubina sin embargo, a pesar de que en análisis - de heces humanas se obtuvieron resultados positivos, en heces de jámster todos - los análisis fueron negativos. Por lo tanto, parece probable que la flora intestinal del jámster sea capaz de modificar la bilirrubina que le llega de la bilis a otros compuestos que no sean urobilinógeno.

El hallazgo de que la colelitiasis pigmentaria no se encuentra asociada con hemólisis, hace del jámster a este aspecto un modelo distinto de los otros roedores, lo cual es importante ya que, como es sabido, en humanos la mayoría de pacientes con cálculos pigmentarios no presentan alteraciones hematológicas.

En relación con los niveles hepáticos de vitamina A estudiados en el segundo experimento, podemos decir que estos fueron directamente proporcionales a los ni-

veles dietéticos de la vitamina, llegandose almacenar en el hígado 10 veces más vitamina en el grupo con el más alto nivel dietético de ella que en el control. Del análisis de estos resultados se observa que se requiere de un nivel de alrededor de 850 μ g de retinol/g fresco de hígado para que empiece a presentarse colelitiasis pigmentaria en el jámster; con niveles de alrededor de 1200 μ g de retinol/g la frecuencia de colelitiasis es ya más obvia.

El nivel plasmático se mantuvo similar en todos los grupos, excepto en el que recibió 25 000 UI% de vitamina A, en el cual el retinol plasmático fue más del doble que el del grupo control.

Es de hecerse notar que en algunos grupos (3 y 4) se presento colelitiasis con niveles plasmáticos similares a los del grupo control (1), lo cual sugiere que la acción de la vitamina A que conduce a la formación de los cálculos es sobre el hígado o vías biliares, y no sobre otros tejidos extrahepáticos, tales como el -- oseo y el hematopoyético.

El peso del hígado y del bazo en los diferentes grupos del segundo experimento, fueron muy similares, es decir, que el nivel dietético de 25 000 UI% de vitamina A suministrado durante 62 días, no produce hepatomegalia, a pesar de presentar una notable hipervitaminosis A, expresada en los altos niveles hepático y plasmático de la vitamina.

A pesar de que en el primer experimento no se encontro evidencia de anemia o hemólisis que indicaran un sobreproducción de bilirrubina, en el tercer experimento se determinó la concentración de este pigmento en la bilis, ya que la bilirrubina no solo se forma por la degradación del grupo hemo de la hemoglobina, sino -- también se origina del hemo de los citocromos, los cuales tienen un rápido recambio en el hígado, que pudiera ser aún mayor con el alto nivel de vitamina A en la dieta litogénica. Los resultados de la determinación de bilirrubina en la bilis -- mostró que la concentración del pigmento fue significativamente inferior en los -- animales que recibieron la dieta litogénica. Esta diferencia en concentraciones -- del pigmento puede explicarse si se observa que el volumen de bilis de los animales con la dieta ligénica fue mayor que la del grupo control, lo cual diluyó la -- bilirrubina biliar, aunque debe anotarse que la cantidad de pigmento excretado fue aproximadamente la misma en ambos grupos, tal como lo demostró la determinación de la bilirrubina total. Estos resultados no descartan la posibilidad de que la -- bilirrubina participe en la formación de los cálculos, pues falta analizar la bilirrubina biliar para determinar que proporciones del pigmento se encuentran conjugados y no conjugados, pues estos últimos pueden formar sales de calcio y preci

ptar.

Aunque el volumen biliar vesicular no fue significativamente diferente entre los dos grupos, éste fue superior en los animales del grupo que recibió la dieta litogénica. Además, en posteriores experimentos hemos encontrado que esta diferencia se conserva, e incluso al sumar los resultados de varios experimentos, es decir, al aumentar el número de determinaciones, ésta se ha vuelto significativa.

La causa de este aumento en volumen de la bilis vesicular podría deberse a varias causas, tales como cambios en la permeabilidad de la vesícula que le impidan concentrar la bilis hepática, y/o a una coleresis provocada por la vitamina A.

De cualquier manera, este hallazgo es el primero que puede ser atribuido a la acción de la vitamina A, aunque su importancia en la formación de los cálculos aún no este establecida.

El análisis de otros factores y componentes biliares, tales como el pH, la proteína y el calcio, no mostraron diferencias entre los animales que recibieron dieta básica y los alimentados con la dieta litogénica. El pH biliar de los jámsteres fue muy cercano a 8.0, es decir, fue más alcalino que neutro, lo cual favorece la precipitación de sales de calcio, pero a su vez solubiliza más a la bilirrubina; es probable que aunque el pH no fue afectado por la dieta litogénica, su ligera alcalinidad pudiera haber hecho al jámster más susceptible a la coleditiasis.

La proteína total en la bilis vesicular no se encuentra aumentada en los animales con cálculos; sin embargo, es posible que debido a la acción de la vitamina A, una determinada proteína se encuentre incrementada o disminuida, pudiendo ser un factor nucleante en el primer caso o un factor antinucleante en el segundo. Para establecer lo anterior se requeriría, inicialmente, analizar las proteínas biliares por medio de electroforesis.

El calcio biliar fue igual en ambos grupos, y es posible que el calcio iónico también sea similar en ambos grupos, ya que la proteína y el pH biliares tampoco fueron diferentes. No obstante, se sabe que los cálculos contienen sales de calcio, las cuales podrían formarse no por un incremento del catión sino por el incremento de uno o más aniones, tales como carbonato, fosfato, ácidos biliares y/o ácidos grasos.

Los presentes estudios han demostrado que ninguno de los metabolitos examinados se encuentran alterados cuantitativamente en la bilis; en el caso de la bilirrubina y las proteínas falta establecer si hay cambios cualitativos, como ya se ha mencionado.

Otros componentes de la bilis que será necesario estudiar son los lípidos biliares tales como los ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol, que aunque - han sido señalados como importantes en el desarrollo de los cálculos de colesterol, también podrían estar implicados en la colelitiasis pigmentaria del jámster, especialmente los ácidos biliares y los ácidos grasos de los fosfolípidos, los - cuales pueden formar sales insolubles de calcio. Otros aniones por estudiarse a este respecto, son el carbonato y el fosfato.

En el estudio de la colelitiasis pigmentaria del jámster aún no se ha establecido la importancia de la función vesicular en la formación de los cálculos.

En el presente trabajo se observó un incremento en el volumen biliar vesicular, el cual podría deberse a una deficiencia en la capacidad vesicular de concentrar la bilis, por lo que se requieren estudios encaminados a conseguir este objetivo, tales como la determinación de la contractilidad vesicular y la acción -- concentradora de la vesícula. El incremento del volumen biliar vesicular observado, también pudiera ser debido a un efecto coléretico directo o indirecto de la vitamina A, por lo que sería interesante estudiar el flujo de la bilis hepática - en este modelo.

En relación al crecimiento, del análisis de las curvas de incremento de crecimiento de los cuatro grupos podemos decir que el exceso de vitamina A contenido en la dieta litogénica tuvo un efecto negativo sobre este parámetro, ya que de los cuatro experimentos en tres de ellos el crecimiento del grupo que recibió la dieta litogénica fue menor; sin embargo, en el tercer experimento no hubo prácticamente diferencia en los dos grupos. En experimentos posteriores hemos observado que algunas veces hay reducción del crecimiento con la vitamina A, pero en otras éste es igual en el grupo control y en el litogénico; la causa de esta variabilidad -- aún no ha sido establecida.

E. Conclusiones:

De los presentes estudios se concluye lo siguiente:

1. La colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster dorado, no esta relacionada con alteraciones hematológicas que indiquen anemia o hemólisis.

2. Empleando la dieta para roedores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se requiere de un mínimo de alrededor de 15 000 UI% de vitamina A para producir una moderada frecuencia de colelitiasis en estos animales.

3. Aún con niveles plasmáticos normales de vitamina A, pueden presentarse cálculos biliares pigmentarios.

4. Las concentraciones hepáticas de vitamina A son directamente proporcionales a los niveles dietéticos de ella.

5. La concentración de bilirrubina biliar vesicular se encuentra reducida en los animales con colelitiasis pigmentaria, aunque la bilirrubina total en éstos fue muy similar a los del grupo control; posiblemente esta diferencia sea debida a un incremento del volumen biliar vesicular y no a una menor excreción hepática de bilirrubina en el grupo que recibió la dieta litogénica.

6. La colelitiasis pigmentaria en el jámster dorado no esta asociada a alteraciones del pH biliar, ni a cambios en las concentraciones biliares de proteína y calcio.

7. Una dieta litogénica con vitamina A, del orden de 25 000 UI%, no produce hipercalcemia en el jámster.

CUARTA PARTE.

RESUMEN Y BIBLIOGRAFIA.

1. Resumen:

El presente estudio reporta cuatro experimentos sobre colelitiasis pigmentaria inducida por la vitamina A en el jámster dorado, realizados con el objeto de buscar alteraciones producidas por ésta vitamina, que pudieran estar relacionadas con la colelitiasis misma. Este estudio consta de las siguientes partes:

Primera Parte: contiene una revisión actualizada sobre la colelitiasis en general, la cual incluye la descripción de los principales tipos de cálculos biliares, su epidemiología, así como los principales estudios que hasta el presente se han realizado sobre colelitiasis en diferentes animales de laboratorio.

Segunda Parte: comprende la revisión de los conocimientos actuales sobre la historia, química, metabolismo y funciones de la vitamina A, así como de las manifestaciones tóxicas producidas por la hipervitaminosis de este factor.

Tercera Parte: corresponde a la sección experimental, la cual comprende los objetivos, material y métodos, resultados, discusión y conclusiones de éste estudio. En los cuatro experimentos se utilizaron jámsteres dorados machos de la cepa ChCM recién destetados. Como dieta básica se utilizó el alimento para roedores elaborado por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

En el primer experimento se compararon los valores hematológicos de jámsteres alimentados con la dieta básica y con la litogénica. Se utilizaron 14 animales divididos en dos grupos, los cuales fueron alimentados durante 105 días con las siguientes dietas: Grupo A, Dieta Básica sólo (DB); Grupo B, DB + 25 000 UI% de acetato de vitamina A. Los resultados de este experimento mostraron que sólo los animales del grupo B exhibieron cálculos con una alta frecuencia (71.3%).

En la relación con el análisis hematológico, no existieron diferencias significativas entre los dos grupos, lo cual indica que la colelitiasis pigmentaria inducida por la vitamina A en el jámster dorado no se encuentra asociada con anemia o hemólisis.

En el segundo experimento se estudiaron diferentes niveles dietéticos de vitamina A para determinar su efecto sobre el status de vitamina A y la frecuencia de colelitiasis. Se establecieron 5 grupos de 15 animales cada uno, los cuales fueron alimentados durante 70 días con las siguientes dietas: Grupo 1, DB; Gru -

po 2, DB + 5000 UI% de vitamina A (acetato de retinol); Grupo 3, DB + 10000 UI% de vitamina A; Grupo 4, DB + 15000 UI% de vitamina A; Grupo 5, DB + 25000 UI% de vitamina A. Los resultados de este experimento mostraron que los niveles dietéticos de 15000 y 25000 UI% de vitamina A indujeron frecuencias similares de colelitiasis (40.0 y 42.9%, respectivamente), mientras que el nivel de 10000 UI% de vitamina A produjo una muy baja frecuencia de animales con cálculos; el nivel de 5000 UI% de vitamina A no tuvo acción litogénica. La vitamina A hepática mostró una concentración directamente proporcional al nivel dietético, mientras que los niveles plasmáticos de la vitamina se mantuvieron similares en todos los grupos, excepto en el grupo que recibió 25000 UI% de vitamina A, el cual exhibió una concentración plasmática más del doble que la del grupo control. Por otra parte, el peso promedio del hígado y del bazo fueron muy similares en todos los grupos.

El tercer experimento se realizó para analizar si existía un incremento en la bilirrubina biliar vesicular de los animales con colelitiasis. Se establecieron 2 grupos de animales, los cuales fueron alimentados durante 70 días con las siguientes dietas: Grupo A (n=6), DB; Grupo B (n=9), DB + 25000 UI% de vitamina A.

Los resultados de éste experimento mostraron que los jámsteres alimentados con la dieta litogénica exhibieron una menor concentración de bilirrubina; esta diferencia puede ser explicada por un aumento del volumen biliar vesicular de estos animales, ya que la bilirrubina biliar vesicular total fue similar en ambos grupos.

En el cuarto experimento se analizaron las concentraciones biliares de algunos componentes de los cálculos, tales como proteínas y calcio; asimismo, se determinó el pH de la bilis, ya que este puede afectar la solubilidad de varios componentes de la bilis. Se establecieron 2 grupos de animales, los cuales fueron alimentados durante 70 días con las siguientes raciones: Grupo I (n=12), DB; Grupo II (n=20), DB + 25000 UI% de vitamina A. Al final del estudio se colectó la bilis por punción de la vesícula biliar. Los resultados de este experimento respecto a la frecuencia de colelitiasis, mostraron que ninguno de los jámsteres -- del grupo I presentó cálculos, mientras que el 95.2% de los del grupo II sí los exhibieron. Los valores de proteína, calcio y pH biliares, así como la concentración de calcio plasmático no mostraron diferencias significativas en los dos grupos. El pH de la bilis de ambos grupos fue ligeramente alcalino, lo cual puede facilitar la precipitación de sales de calcio.

De los presentes estudios se concluye lo siguiente: 1. La colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster dorado, no está relacionada -

con alteraciones hematológicas que indiquen anemia o hemólisis; 2. Empleando la dieta para roedores de La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se requiere de un mínimo de alrededor de 15000 UI% de vitamina A para producir - una moderada frecuencia de colelitiasis en estos animales; 3. Aún con niveles -- plasmáticos normales de vitamina A, pueden presentarse cálculos biliares pigmentarios; 4. Las concentraciones hepáticas de vitamina A son directamente proporcionales a los niveles dietéticos de ella; 5. La concentración de bilirrubina biliar vesicular se encuentra reducida en los animales con colelitiasis pigmentaria, aun - que la bilirrubina total en estos fue muy similar a los del grupo control; posiblemente esta diferencia sea debida a un incremento del volumen biliar vesicular y - no a una mayor excreción hepática de bilirrubina en el grupo que recibió la dieta litogénica; 6. La colelitiasis pigmentaria en el jámster dorado no esta asociada a alteraciones del pH biliar, ni a cambios en las concentraciones biliares de proteina y calcio; 7. Una dieta litogénica con vitamina A, del orden de 25000 UI% de esta, no produce hipercalcemia en el jámster.

2. Bibliografía:

- 1.- Lagarriga, J.: Los cálculos humanos. *Naturaleza*, México 4: 19-21, 1973.
- 2.- Heaton, K.H.: Epidemiology of gallstones and suggested etiology. *Clin. Gastroenterol.*, 2: 67-83, 1973.
- 3.- Ganong, W.F.: *Fisiología Médica*. Ed. Manual Moderno, pág 418, 1985.
- 4.- Sherlock, S.: *Disease of the liver and biliary system*. 6th ed. Blackwell Scientific Publication. Oxford, 1981.
- 5.- Lenhinger, A.L.: *Bioquímica*. 2a ed. Omega S.A., Barcelona, 1980.
- 6.- Bouchier, I.A.D.: Gallstones formation. *Lancet*, 1: 711, 1971.
- 7.- Bouchier, I.A.D.: Debits and credits: a current account of cholesterol gallstones disease. *Gut*, 25: 1021-1028, 1984.
- 8.- Holzbach, T.R.: Recent progress in understanding cholesterol crystal nucleation as a precursor to human gallstone formation. *Hepatology*, 6: 1403-1406, 1986.
- 9.- Galliner, S. et al.: Evidence for nucleation defect in bile from gallstone patients. *Hepatology*, 4: 177S-179S, 1984.
- 10.- La Mont, J.T., Smith, F.B., y Moore, L.: Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Hepatology*, 4: 51S-56S, 1984.
- 11.- Holzbach, T.R.: Metastability behavior of supersaturated bile. *Hepatology*, 4: 155S-158S, 1984.
- 12.- Burnstein, J.M., Ilson, G., Petrunka, N.C., Taylor, R.D., y Strasberg, S.M.: Evidence for a potent nucleating factor in the gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterology*, 85: 801-807, 1983.
- 13.- Gallinger, S., Harvey, R.C., Strasberg, S.M.: Chelation of calcium does not affect cholesterol nucleation time in human gallbladder bile. *Hepatology*, 5: 969, 1985.
- 14.- Womack, N.A., Zeppa, R., y Irvin G.L.: The anatomy of gallstones. *Ann. Surg.*, 157: 670-686, 1963.
- 15.- Trotman, B.W., y Soloway, R.D.: Pigment gallstones disease: summary of the NIH-International Workshop. *Hepatology*, 2: 879-884, 1982.
- 16.- Sharper, A.G., y Patel, K.M.: Disease of the biliary tract in africans in Uganda. *East African. Med. J.*, 41: 246-250, 1964.
- 17.- Alanis, O.A., Uscanga, D.L., y Wolpert, E.: Litiasis biliar en México. Composición química de la bilis en personas normales y enfermos con cálculos biliares de colesterol. *Rev. Invest. Clin. (Mex)* 30: 41, 1978.

- 18.- Thornton, J.R., Emmete, P.M., y Heaton, K.W.: Diet and gallstones. *Gut*, 24: 2, 1983.
- 19.- Gilat, T., Feldman, C., y Halpern, Z. et al.: An increased familial frequency of gallstones. *Gastroenterology*, 84: 242-246, 1983.
- 20.- Sedaghat, A., Kesaniemi, Y.A., y Grundy, S.M.: Cholesterol crystals a crucial link in the formation of cholesterol gallstones. En: Paumgartner, G., Stiehl, A., y Gerok, W. (Eds.): Bile acids and cholesterol in health and disease. Falk Symposium No. 33. MTP Press Ltd., Boston, pp. 43-53, 1983.
- 21.- Alexander, M., y Portman, O.W.: Different susceptibilities to the formation of cholesterol gallstones in mice. *Hepatology*, 7: 257-265, 1987.
- 22.- Meyer, P.D., y Denbesten, L.: A comparison of methods for bile salt pool size measurements in the prairie dog gallstone model. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 156: 452-456, 1977.
- 23.- Holzbach, R.T.: Animal models of gallstone disease. *Hepatology*, 4: 191S-198S, 1984.
- 24.- Christensen, F., Prage, I., y Dam, H.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 13. Influence of highly unsaturated fats and certain minerals on gallstones production. *Z. Ernährungswiss*, 4: 186-192, 1964.
- 25.- Dam, H., y Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 9. Influence of different carbohydrate sources on gallstones formation diarrhea and growth. *Z. Ernährungswiss.*, 2: 91-102, 1961.
- 26.- Dam, H., y Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamster. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 30: 236-242, 1952.
- 27.- Prage, I., Christensen, F., y Dam, H.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 11. Relation between diet and composition of bladder bile. *Z. Ernährungswiss.*, 3: 59-78, 1962.
- 28.- Muroya, H., Suzue, R., y Hikasa, Y.: Stimulation of hepatic cholesterol biosynthesis by dietary glucose and its relation to cholesterol gallstones formation in the hamster. *Arch. Biochem. Biophys.*, 124: 12-17, 1968.
- 29.- Kritchevsky, D., y Klurfeld, D.M.: Gallstones formation in hamsters: effect of varying and vegetable protein levels. *Am. J. Clin. Nutr.*, 37: 802-804, 1983.
- 30.- Lagarriga, A.J.: Efecto del fenobarbital en la composición de la bilis del júnster. *Rev. Sanid. Milit. Mex.*, 28: 90, 1974.
- 31.- Thurley, S.D., Spady, D. K., y Dietschy, J.M.: Alteration of the degree of biliary cholesterol saturation in the hamster and rat by manipulation of the pools of preformed and newly synthesized cholesterol. *Gastroenterology*, 84: 253-264, 1983.
- 32.- Tandon, R.K., Srivastava, A.K., Khandenwal, B.L., y Mallela, S.P.: On bilirubin-copper complex in reference to pigment gallstones. NIH-International Workshop on Pigment Gallstones Disease. Filadelfia, Pensilvania, Abstracts, p. 1625, 1981.

- 33.- Trotman, B.W., Ostrow, J.D., y Soloway, R.D.: Pigment vs cholesterol cholelithiasis : comparison of stone and bile composition. *Amer. J. Dig. Dis.*, 19: 585-589, 1974.
- 34.- Soloway, D.R., Trotman, B.W., y Ostrow, J.D.: Pigment gallstones. *Gastroenterology*, 72: 167-182, 1977.
- 35.- Sander, J., Robins, J.M., y Patton, M.G.: Lipids of pigment gallstones. *Biochem. Biophys. acta.*, 712: 21-25, 1982.
- 36.- Junich, H.: Fisiología de los pigmentos biliares. En: Villalobos, J.J. (Ed.). *Gastroenterología*. 2a ed. Editorial Mendez Oteo, México, D.F., cap. 98, pp: 199-203, 1985.
- 37.- Ostrow, J.D., y Celic, L.: Bilirubin chemistry ionization and solubilization by bile salts. *Hepatology*, 4: 385-455, 1984.
- 38.- Stoll, M.S., Vicker, N., y Gray, C.H.: Concerning the structure of photobilirubin II. *Biochem.J.*, 201: 179-188, 1982.
- 39.- Ostrow, J.D.: The etiology of pigment gallstones. *Hepatology*, 4: 215S-222S, 1984.
- 40.- Moore, E.W.: The role of calcium in the pathogenesis of gallstones: Ca^{++} electrode studies of model bile salt solutions and other biologic systems. *Hepatology*, 4: 228S-243S, 1984.
- 41.- Masuda, H., y Nakayama, F.: Composition of bile pigment in gallstones and bile and their etiological significance. *J. Lab. Clin. Med.*, 93: 353-360, 1979.
- 42.- Tera, H.: Stratification of human gallbladder bile in vivo. *Acta. Chir. Scand*, 256: (Suppl): 1-80, 1960.
- 43.- Mc Donagh, A.F., Palma, A.L., Lighter, A.D.: Blue light and bilirubin excretion. *Science*, 208: 145-151, 1980.
- 44.- Maki, T.: Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: role of E.coli - glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. *Ann. Surg.*, 164: 90-100, 1966.
- 45.- Sutor, D.J., y Wilkie, L.I.: Calcium in bile and salts in gallstones. *Clin. Chim. Acta.*, 79: 119-127, 1977.
- 46.- Berman, M.D.: Influence of pH on the solubility of unconjugated bilirubin. *Gastroenterology*, 78: 1141, 1980.
- 47.- REge, R.V., y Moore, E.W.: Evidende for H^{+} secretion the in vivo canine gall bladder. *Gastroenterology*, 92: 281-289, 1967.
- 48.- Trotman, B.W., y Soloway, R.D.: Pigment vs cholesterol cholelithiasis: clinical and epidemiological aspects. *Am. J.Dig. Dis.*, 20: 735-740, 1975.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 49.- Nakayama, F.: Epidemiological features of pigment gallstones. NIH-International Workshop on Pigment Gallstone Disease. Filadelfia, Pensilvania, Abstracts, p. 1636, 1981.
- 50.- Masao, N., Hiroshi, T., Motoichi, S., y Yorinori, H.: Present features of gallstones in Japan. A collective review of 2144 cases. Am. J.Surg., 135: 788-790, 1978.
- 51.- Soloway, R.D., Takabayashi, A., Rios-Dalenz, J., Nakayama, F., Tandon, R.K., Trotman, B.W., y Henson, D.E.: Geographic differences in the operative incidence and type of pigment gallstones and the noncholesterol gallstones. NIH-International Workshop on Pigment Gallstone disease. Filadelfia Pensilvania, Abstracts, p. 1637, 1981.
- 52.- Okey, R.: Gallstones formation and intake of B vitamins in cholesterol fed guinea pig. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 51: 349-350, 1942.
- 53.- Wayne, W., La Monte, E.A., Brotschi, T.E., Scott y Lester, F.W.: Pigment gallstones formation in the cholesterol fed guinea pig. Hepatology, 5: 21-27, 1985.
- 54.- Trotman, B.W., y Soloway, R.D.: Pigment gallstones disease. summary of the National Institutes of Health-International Workshop. Hepatology, 2: 879-884, 1982.
- 55.- Fitzpatrick, W. K., Burdette, M.D., Huestis, R.R.: Cholelithiasis and spherocytosis in Peromyscus. Arch.Surg., 86: 897-903, 1963.
- 56.- Trotman, B.W., Seldon, E., Bernstein, K.E., Bove y Gary, D.W.: Studies on the pathogenesis of pigment gallstones in hemolytic anemia. J. Clin. Invest., 15: 1301-1308, 1980.
- 57.- Englert, E.: The dog diet-model of pigment gallstone formation (abstract). Hepatology Rapid Lit Rev., 11: 1702, 1981.
- 58.- Coyle, J.J., Hoyt, D.B., y Sedaghat, A.: Relationship of intestinal bypass operations and choletithiasis. Surg. Forum., 31: 139-141, 1980.
- 59.- Hofmann, A.F., Bokkenheuser, V.D., Hirsh, R.L. et al.: Experimental cholelithiasis in the rabbit induced by cholesterol feeding: effect of neomycin treatment on bile composition and gallstones formation. J.Lipid. Res., 9: 244-253, 1968.
- 60.- Dam, H.: Nutritional aspects of gallstones formation with particular reference to alimentary production of gallstones in laboratory animals. World Review of Nutrition and Dietetics., 11: 119-239, 1969.
- 61.- Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado (Mesocricetus auratus) alimentados con una dieta de mantenimiento. Poeyana No. 93, p. 19, 1971.
- 62.- Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado II. Influencia en la orquidectomía. Patologia (Mex) 11: 25-32, 1972.
- 63.- Granados, H.: Gallstones in the golden hamster. IV. The effect of supplementing a stock commercial ration with milk and carrots. XXVI Internat. Congr. Phy-

siol. Sci., New Delhi, Abstracts of Volunter Papers (Vol. XI). abstract 285 (p. 95), 1974.

64.- Granados, H.: cálculos biliares en jámster dorado. VIII. Acción litogénica de la mantequilla de leche de vaca. Patología (Mex.), 14: 67-72, 1976.

65.- Estrada, E., Soriano, M., Cárdenas, R., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XII. Comparación de la acción litogénica de la mantequilla de leche de vaca con la de seis aceites vegetales. X Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Resúmenes, resumen T-2, 1976.

66.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Gallstones in the Golden Hamster. XIV. Lithogenic action of lard. XXVII. Congr. Internat. Sci. Physiol., Paris, Res. des Comunic, Vol. XIII, Resume, p.816, 1977.

67.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Gallstones in the Golden Hamster. XIX. Comparison of the litogenic action of butter mixed with 3 different diets. XI Internat. Congr. Nutr., Río de Janeiro, Resumen Temas Libres, p. 259, Abstract 396, 1978.

68.- Granados, H., Cárdenas, R., Soriano, M., y Estrada, E.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XI. Acción de la testosterona en la colelitiasis producida por la mantequilla de la leche de vaca. X Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Resúmenes, resumen T-1, 1976.

69.- Granados, H., Cárdenas, R., Soriano, M., y Estrada, E.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XIII. Acción litogénica de leches procesadas por dos casas comerciales. Patología (Mex.), 15: 101-110, 1977.

70.- Cárdenas, R.: Estudio sobre la acción colelitogénica pigmentaria de la vitamina A en el jámster dorado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, 1978.

71.- Cárdenas, R.: Estudio sobre la litogenicidad de la vitamina A y carotenoides en el jámster dorado. Tesis de Mestría. Facultad de Ciencias, UNAM, 1979.

72.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Cálculos biliares en 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.

73.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXI. Acción potencializadora de la zanahoria en la colelitiasis pigmentaria producida por la mantequilla. XII. Congr. Latinoamer. Patol., Santo Domingo, Patología (Mex.), 17: 174, 1979.

74.- Cárdenas, R., Castillo, A.R., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXII. Acción potencializadora de la zanahoria en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XIII. Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., 44: 256, 1979.

75.- Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXV. Colelitiasis pigmentaria producida por la sacarosa, glucosa y fructuosa. V. Congr. Latinoamer. Nutr., Cholula, Puebla, México, Resúmenes, Resumen 46, 1980.

76.- Granados, H., Soriano, M., y Zamora, F.: Cálculos biliares en el jámster do-

rado. XXVII. Suceptibilidad de las hembras a la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XVI Congr. Nal. Gastroenterol., México D.F., Rev. Gastroenterol. Mex., 47: 277 (resumen), 1982.

77.- Granados, H., Zamora, F., y Soriano, M.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXVIII. Efecto de la ovariectomía en la colelitiasis producida por glucosa y vitamina A. XVII. Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Mex., 48: 267 (resumen), 1983.

78.- Granados, H.: Gallstones in the golden hamster. XVI. Prevention of pigment cholelithiasis by Drenohepar. VI World Congr. Gastroenterol., Madrid, Abstracts, p. 155, 1978.

79.- Granados, H., y Cárdenas, R.: Cálculos biliares en jámster dorado. XXIV. Prevención por el ácido dehidrocólico de la colelitiasis pigmentaria producida por la mantequilla y la vitamina A. ARch. Invest. Med. (Mex.), 14: 23-27, 1983.

80.- Granados, H., y Soriano, M.: Gallstones in the golden hamster. XXVI. Prevention of pigment cholelithiasis by "Polifat KA-02". XI Trienn. World Congr. Pathol., Jerusalem., Abstracts, p. 108, 1981.

81.- McCollum, E.V., y Davis, M.: The necessity of lipids in th diet during growth. J. Biol. Chem., 15: 167-175, 1973.

82.- Goodman, S.D.: Vitamin A Metabolism. Fed. Proc., 39: 2716-2722, 1980.

83.- Pike, R.L., y Brown, M.L.: Nutrition an integrated aproach. John Wiley and - Sons Inc, 1975.

84.- Goodman, D.S.: Vitamin A and retinoids: recent advances. Fed. Proc., 38: 2501-2503, 1979.

85.- Goodman, D.W., Huang, S.H., y Shiratori, A.: Mechanism of biosynthesis of vitamin A from beta-carotene. J. Biol. Chem., 241: 1929-1937, 1966.

86.- Dy Hui., Innterarity, T.L., y Mahley, R.W.: Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. J. Biol. Chem., 256: 5645-5655, 1981.

87.- Blaner, W.S., Dixon, J.L., Moriwaki, H., Martino, R.A., Stein, O., Stein, Y., y Goodman, D.: Studies on the in vivo transfer of retinoids from parenchymal to - stellate cells in rat liver. Eur. J. Biochem., 164: 301-307, 1987.

88.- Nutrition Reviews.: Uptake distribution and esterification of retinol in liver. 44: 216- 218, 1986.

89.- Goodman, D.S.: Vitamin and retinoids in health and disease. N. Engl. J. Med, 310: 1023-1031, 1984.

90.- Smith, F.R., y Goodman, D.S.: Retinol binding protein and the regulation of vitamin A transport. Fed. Porc., 38: 2504-2509, 1979.

91.- Nutrition Reviews.: Metabolism of vitamin A in pig kidney cells. 45: 122-124, 1987.

- 92.- Dunagin, P.E., Meadows, E.H., y Olson, J.A.: Retinoyl-beta-glucuronic acid a major metabolite of vitamin A in rat bile. *Science*, 148: 86-87, 1965.
- 93.- Frolik, 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.
- 94.- Frolik, C.A., Swason, B.N., Dart, L.L., y Sporn, M.B.: Metabolism of 13-cis-retinoic acid: identification of 13-cis-retinoyl and 13-cis-4-oxoretinyl-beta-glucuronides in rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 208: 344-352, 1981.
- 95.- Napoli, J.L., Khalil, H., and Mc Cormick, A.M.: Metabolism of 5,6-epoxiretinoic acid in vivo. *Biochemistry*, 21: 1942-1949, 1982.
- 96.- Haenni, R., Bigler, F.: Isolation and identification of 3 major metabolites of retinoic acid from rats feces. *Helv. Chim. Acta*, 60: 881-887, 1987.
- 97.- Haenni, R., Bigler, W., y Eglert, G.: Isolation and identification 3 urinary metabolites of retinoic acid in rats. *Helv. Chim. Acta*, 59: 2221-2227, 1976.
- 98.- Swason, B.N., Frolik, C.A., Zahharevitz, D.W., y Sporn, M.B.: Dose dependent kinetics of all-trans retinoic acid in rats. *Biochem. Pharmacol.*, 30: 107-113, 1981.
- 99.- Levitt, R.E., y Ostrow, J.D.: Hemolytic jaundice and gallstones. *Gastroenterology*, 78: 821-830, 1980.
- 100.- Maki, T., Matsushiro, T., Suzuki, N., et al.: Role of sulfated glycoproteins on gallstones formation. *Surg. Gyn. Obstet.*, 133: 937-945, 1971.
- 101.- La Mont, J.T., Smith, B.F., y Moore, J.R.: Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Hepatology*, 5: 51S-56S, 1984.
- 102.- Frame, B., Jackson, C.E., Reynolds, W.A., y Umphrey, J.E.: Hypercalcemia and skeletal effects in chronic hypervitaminosis A. *Ann. Int. Med.*, 80: 44-48, 1974.
- 103.- Soloway, R.D., Traotman, B.W., y Ostrow, D.: Pigment gallstones. *Gastroenterology*, 72: 167-182, 1977.
- 104.- Billing, B., Haslam, R., y Wald, D.: Bilirubin standards and the determination of bilirubin by manual and technicon autolaser. *Ann. Biochem.*, 6: 21-30, 1971.
- 105.- Michelsson, M.: Bilirubin determination in serum and urine. Studies on diazo methods and a new cooper azopigment method. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5: 1-80, 1961.
- 106.- Olson, J.A.: A simple dual assay for vitamin A and carotenoids in human liver. *Nutr. Rep. Internat.*, 19: 807-813, 1979.
- 107.- Thompson, 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.
- 108.- Van Roy, R.P.: Recent advances in the separation and analysis of diazo positive bile pigments. *Meth. Biochem. Anal.*, 22: 207-250, 1974.

- 109.- Lowry, L.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, P.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 110.- Fitton-Jackson, S.F., y Fell, H.B.: Epidermal fine structure in embryonic - chicken skin during a typical differentiation induced by vitamin A in culture. *Dev. Biol.*, 7: 394-419, 1963.
- 111.- Fuchs, E., y Green, H.: Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell*, 25: 617-625, 1981.
- 112.- Sherman, B.S.: The effect of vitamin A on epithelial mitosis in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, 37: 469-480, 1961.
- 113.- Zile, M.H., Emerick, R.J., y De Luca, H.F.: Identification of 13-cis-retinoic acid in tissue extracts and its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 20: 639-641, 1967.
- 114.- Ganguly, L., Sarada, K., Jayaram, M., Joshi, P.S., Das, R.C., Murthy, S.K., Thomas, J.A., y Bhargava, M.K.: On the systematic mode action of vitamin A. *World Rev. Nutr. Diet.*, 31: 59-64, 1978.
- 115.- Thompson, J.N., Howell, J.M., y Pih, A.J.: Vitamin A and reproduction in rats. *Proc. R. Soc. London ser. b*, 159: 510-535, 1969.
- 116.- Thompson, J.N., Howell, J.M., Pih, A.J., y McLaughlin, C.I.: Biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *Br. J. Nutr.*, 23: 471-485, 1969.
- 117.- Tepperman, J., Caldwell, F.T., y Tepperman, H.M.: Induction of gallstones in mice by feeding a cholesterol-cholic acid containing diet. *Am. J. Physiol.*, 206: 628-634, 1964.
- 118.- Sun, P.L., Cliff, T.J., Valerie, F.C.: Oleic acid induced cholelithiasis in the rabbit: conversion of dietary oleic acid to cholesterol as a cause of calcium-bile salt gallstones. *Hepatology*, 7(3): 529-534, 1987.
- 119.- Nakano, T., Yanagisawa, J., Nakayama, F.: Phospholipase activity in human bile. *Hepatology*, 8: 1560-1564, 1988.
- 120.- Hayes, R.C., y Mark, D.H.: Toxicity of the vitamins. En: *Toxicants occurring naturally in foods*. Nat. Acad. Sci., Washington, 1973.
- 121.- Pike, R.L., y Brown, M.L.: Nutrition and integrated approach. John Wiley & Sons, Inc., cap. 4, 1975.
- 122.- Hatchcock, J.N.: Nutrition toxicology and pharmacology. *Nutrition Reviews*, 34: 65-75, 1976.
- 123.- Russell, R.M., Boyer, J.L., Bagheri, S.A., y Hruban, A.: Hepatic injury from chronic hypervitaminosis A resulting in portal hypertension and ascites. *New. Engl. J. Med.*, 291: 435-440, 1974.
- 124.- Minuk, G.Y., Kelly, J.K., y Hwang, W.: Vitamin A hepatotoxicity in multiple family members. *Hepatology*, 8: 272-275, 1988.

- 125.- Leo, M.A., y Lieber, Ch. S.: Hypervitaminosis A: A liver lover's lament. Hepatology, 8: 412-417, 1988.
- 126.- Dam, H.: The biochemistry of fat-soluble vitamins. En: Progress in the chemistry of fats and other lipids. Pergamon Press Ltd., Londres, 1965.
- 127.- Hafez, E.S., y Dyer, I.A.: Animal growth and nutrition. Lea & Febiger, Philadelphia, 1969.
- 128.- Moore, T., y Wang, Y.L.: Hypervitaminosis A. Biochem. J., 39: 222-228, 1945.
- 129.- Di Palma, J.R., y Ritchie, D.M.: Vitamin A toxicity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 17: 133-148, 1977.
- 130.- 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.
- 131.- 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.
- 132.- Dingle, J.T., Glauert, A.M., Daniel, M., y Lucy, J.A.: Vitamin A and membranes of cells and intracellular particles. Biochem. J., 84: 76, 1962.
- 133.- Lucy, J.A., y Dingle, J.T.: Vitamin A and membrane systems. Biochem. J., 84: 611-621, 1962.
- 134.- Dingle, J.T., y Lucy, J.A.: Vitamin A, carotenoids and cell function. Biol. Rev., 40: 422-461, 1965.
- 135.- Kistler, A.: Retinoic acid induced cartilage resorption. Differentiation, 21: 168-174, 1982.
- 136.- Yaar, 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.
- 137.- 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.
- 138.- 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.
- 139.- De Luca, L.M.: Studies in mannosyl carrier fraction of retinol and retinoic acid in epithelial and mesenchymal tissues. J. Am. Acad. Dermatol., 6: 611-619, 1982.
- 140.- Bolmer, S.D., y Wolf, G.: Retinoic and phorbol esters alter release of fibronectin from enucleated cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6541-6545, 1982.
- 141.- Bolmer, S.D., y Wolf, G.: Stimulation of fibronectin production by retinoic

acid in mouse akin tumors. Cancer Res., 42: 4465-4472, 1982.

142.- Skare, K.L., Schnoes, H.K., y De Luca, H. F.: Biliary metabolites of all-trans retinoic acid in the rat: isolation and identification of a novel polar metabolite. Biochemistry, 21: 3308-3317, 1982.

143.- Jetten, A.M., De Luca, L.M., y Meeks, R.G.: Enhancement in apparent membrane microviscosity during differentiation of embryonal carcinoma cells induced by retinoids. Exp. Cell. Res., 138: 494-498, 1982.

144.- 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, 1986.

145.- 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.

146.- De Luca, L.M.: The direct involvement of vitamin A in glycosyl transfer reactions of mammalian membranes. Vitam. Horm., 35: 1-17, 1977.

147.- Lotan, R.: Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. Biochim. Biophys. Acta, 605: 33-91, 1980.

148.- De Luca, L.M., Creek, K., Moore, 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 the liver. Falk Symposium No. 34. MTP Press Ltd., Boston, pp. 33-49, 1983.

149.- Nutrition Reviews: Effect of vitamin A deficiency in rats on glycosylation of glycoproteins. 47: 56-57, 1989.

150.- Baltazar, B.L.: Estudio sobre los niveles de ácido 2,3-difosfoglicerico (2,3-DPG) en distintas especies de mamíferos, bajo condiciones normales. Relación de este y otros metabolitos afines con la anemia crónica inducida. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Bioquímica, 1982.