

00343

4

RECEIVED
BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
MAY 19 1965



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO SOBRE LA PREVENCION POR EL POLIFAT
KA-02 DE LA COLELITIASIS PIGMENTARIA
PRODUCIDA POR LA VITAMINA A EN EL
JAMSTER DORADO (Mesocricetus auratus).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA ANIMAL)
P R E S E N T A
MIGUEL ANGEL GALICIA GALICIA

DIRECTOR DE TESIS DR. RENE DE JESUS GARDENAS VAZQUEZ

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1965



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.

A DIOS

A la memoria de mi Padre
a quien siempre llevaré
en mi corazón.

Muy en especial a quien
me ha apoyado durante toda
mi vida, con mucho cariño
y agradecimiento:
a ti Mamá.

Con todo mi amor a la
persona que me ha llenado
de cariño, mi esposa:
Edith

A mis hermanas:
Georgina, Alma y Martha,

A Reyes, Ricardo, Elsa, Libia, a mis sobrinos y familiares.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. René Cardenas Vázquez, por su apoyo, atención, paciencia e interés que ha tenido conmigo no sólo en la realización de este trabajo, sino por siempre.

A los honorables miembros de mi jurado
Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Dr. Juan Cuauhtemoc Díaz Zagoya
Dr. Nahum Méndez Sánchez
H. en C. Juan Manuel Cervantes Sánchez
Dra. María Luisa Fanjul Peña
Dra. Alejandra Mainero del Paso

por sus generosas aportaciones al presente trabajo, muy en especial al Dr. Juárez Oropeza y al Dr. Díaz Zagoya por su asesoría y apoyo en los análisis preliminares de la cromatografía de gases, así como al QFB. Rodrigo Miranda y a la Química Patricia Elizalde por su valiosa ayuda en el análisis cromatográfico.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a la Bióloga Perla Estañol, por su apoyo en todo momento y, a todos aquellos (as) que directa o indirectamente me han brindado su ayuda.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias de esta Universidad, como Becario del Programa de Formación de Personal Académico de la U. N. A. M.

Contenido:	pag.
Resumen	2
Introducción	3
Clasificación de los cálculos biliares	4
Epidemiología	6
Patogénesis	7
Cálculos de colesterol	8
Cálculos pigmentarios	11
Modelos de colelitiasis pigmentaria	14
Colelitiasis pigmentaria en el jámster dorado	17
Objetivos	20
Material y Métodos	21
Resultados	30
Discusión	39
Conclusiones	45
Referencias	47

RESUMEN

En el jámster los cálculos biliares pigmentarios ricos en fosfato y calcio pueden ser inducidos cuando la vitamina A es adicionada a la dieta de mantenimiento a una dosis de 25 000 UI%. Esta colelitiasis pigmentaria es prevenida por la adición a la dieta del derivado de aceite de cártamo Polifat KA-02 (PKA), mientras que el aceite de cártamo, el Polifat S-08 (derivado del aceite de soya) y el Polifat US-2 (ácido oléico calidad USP) no tienen efecto sobre esta colelitiasis, en el presente estudio se realizaron 2 experimentos. El primero con el objeto de determinar el efecto de dos niveles de PKA sobre el flujo y composición de la bilis del jámster alimentado con la dieta litogénica, para establecer que efectos se asocian con la formación y con la prevención de los cálculos. El segundo para establecer el principio(s) activo del PKA. En el primer experimento se formaron 4 grupos de 13 jámsteres machos de 30 días de edad promedio, los cuales fueron alimentados durante 70 días con las siguientes dietas: Grupo 1, Nutricubos Purina para Roedores Pequeños pulverizados (Dieta básica: DB); Grupo 2, DB + 25 000 UI% de Acetato de Retinol (DL); Grupo 3, DL + 10% de PKA; Grupo 4, DL + 15% de PKA. En el segundo experimento se ensayaron 2 fracciones de PKA obtenidas por cocristalización con urea, para determinar su efecto sobre la colelitiasis y la composición biliar. Se formaron 5 grupos de 20 jámsteres machos de 71 días de edad promedio, los cuales fueron alimentados con las siguientes dietas durante 70 días: Grupo A, Nutricubos Purina para Roedores Pequeños pulverizados (Dieta básica: DB); Grupo B, DB + 25 000 UI% de Acetato de Retinol (DL); Grupo C, DL + 10% de PKA; Grupo D, DL + 6.6% de fracción enriquecida en ácidos grasos insaturados (PKA-I); Grupo E, DL + 3.4% de fracción enriquecida en ácidos grasos saturados (PKA-S). Al final de los períodos experimentales se colectó bilis hepática durante 2 horas a través de una cánula colocada en el colédoco. El análisis de los resultados mostró que la vitamina A produce coleseres asociada con incremento en la concentración biliar de fosfato inorgánico y disminución en las concentraciones de lípidos biliares. La adición de PKA, tanto al nivel de 15% como de 10%, en la dieta litogénica previno completamente la colelitiasis, lo cual se asoció con una concentración normal de fosfato inorgánico y valores más elevados de lípidos biliares que en los animales que sólo recibieron la vitamina A. De las dos fracciones ensayadas sólo PKA-I previno la colelitiasis, y afectó los parámetros biliares de forma similar al PKA completo.

INTRODUCCION

Un cálculo biliar es un cuerpo duro que se produce en la vesícula biliar o en las vías biliares intra o extrahepáticas, debido a que una sustancia normalmente presente en la bilis, tales como colesterol, pigmentos biliares, sales biliares, carbonato, fósforo o calcio, aumenta su concentración relativa o forma sales insolubles y se precipita; este precipitado se asocia con glicoproteínas de las vías biliares, principalmente de la vesícula biliar, hasta constituir un conglomerado al que se le combinan otras sustancias de la bilis.

La presencia de cálculos en la vesícula biliar puede pasar inadvertida durante muchos años, inclusive toda la vida, denominándose éstos como cálculos asintomáticos; sin embargo, los cálculos pueden volverse sintomáticos al provocar obstrucción de los conductos cístico o colédoco, causando ictericia obstructiva y colecistitis crónica o aguda, la cual puede llegar a causar empiema, gangrena y perforación de la vesícula. Asimismo, el carcinoma de vesícula se encuentra generalmente asociado a cálculos biliares y a colecistitis (1).

La composición de la bilis va a ser determinante para la formación de los cálculos, aunque otros factores también influyen, tales como alteraciones en el vaciamiento o concentración de la bilis por la vesícula e infección de las vías biliares.

La bilis es una secreción acuosa diluida producida por el hígado, la cual es posteriormente concentrada en la vesícula biliar por absorción de agua y electrolitos. Contiene principalmente lípidos, pigmentos biliares, proteínas y electrolitos. Los lípidos están constituidos por sales biliares, principalmente tauro y glico conjugados de los ácidos cólico y desoxicólico, lecitina y colesterol. La bilirrubina es el pigmento biliar más abundante, la cual se encuentra di y mono conjugada con

ácido glucurónico. Las proteínas están representadas por proteínas plasmáticas (en muy bajos porcentajes respecto al plasma), enzimas hepatocelulares, también en cantidades bajas, y proteínas exclusivas de la bilis, e.g. mucina e IGA. Aproximadamente 40 proteínas diferentes han sido encontradas en la bilis (2). Los principales aniones inorgánicos son el bicarbonato, el fosfato y el cloro, y los cationes son el sodio, el potasio y el calcio; también se encuentran pequeñas cantidades de hierro y cobre (3). Asimismo, se presentan numerosos metabolitos de sustancias endógenas, tales como hormonas esteroideas y tiroideas, vitaminas A y D, cianocobalamina y porfirinas, así como de sustancias exógenas, tales como antibióticos, colorantes y otras drogas (3).

La composición de la bilis es por lo tanto muy variable, sin embargo, la bilis cuya composición favorece la formación de cálculos biliares se denomina bilis litogénica.

CLASIFICACION DE LOS CALCULOS BILIARES:

Los cálculos biliares se clasifican de acuerdo a su composición química; de esta manera se distinguen 3 tipos (1,4,5):

A) Cálculos puros de colesterol: estos contienen este lípido hasta en un 98% de su peso; son cristalinos, radiados y translúcidos, de forma redondeada u ovoidea y de superficie lisa o nodular. En el hombre miden de 1 a 4 cm de diámetro. Generalmente son solitarios, aunque también los hay múltiples.

B) Cálculos mixtos de colesterol: son los más comunes, están constituidos por pigmentos biliares, sales de calcio y hasta un 70% de colesterol; son múltiples, de superficie dura y facetada, por lo general lisos y de color café claro u oscuro. Puesto que estos cálculos contienen altos niveles de colesterol, generalmente se considera su patogénesis y epidemiología semejante a la de los cálculos de colesterol.

C) Cálculos pigmentarios: compuestos por sales orgánicas e inorgánicas de calcio, principalmente bilirrubina. Estos cálculos se clasifican en 3 tipos:

1) Cálculos cafés: compuestos principalmente por bilirrubinato de calcio y sales de calcio de ácidos grasos, también presentan entre un 2 a 30% de colesterol; estos cálculos son múltiples, de color café a anaranjado, laminados y de consistencia blanda. Se presentan tanto en conductos intra como extrahepáticos, generalmente asociados con infección del tracto biliar. Epidemiológicamente estos cálculos son muy comunes en el mundo Oriental, especialmente en el medio rural. En Occidente se presentan en el 10% de pacientes que han sido sometidos a colecistectomía.

2) Cálculos negros: son múltiples, de consistencia dura y amorfos, contienen sales de calcio, principalmente bilirrubinato, seguido por carbonato y/o fosfato, así como bajos porcentajes de colesterol. A diferencia de los cálculos cafés, la bilirrubina se encuentra polimerizada, formando una red que se entrelaza con la matriz de glicoproteínas. Generalmente se ubican en la vesícula biliar y no se asocian a infección biliar, pero sí a edad avanzada, anemia hemolítica y cirrosis.

3) Cálculos de sales orgánicas e inorgánicas de calcio: son un grupo heterogéneo de cálculos pigmentarios, que se presentan con muy baja frecuencia. El componente principal es una sal de calcio que no es con la bilirubina, la cual puede ser de ácidos grasos, ácidos biliares, carbonato o fosfato. Se sabe muy poco acerca de este tipo de cálculos.

En todos los tipos de cálculos la matriz de éstos está constituida por mucina.

Los cálculos mixtos, que son los más comunes, presentan generalmente un centro constituido de sales orgánicas o inorgánicas de calcio, por lo cual se considera que la precipitación de estas sales favorece la precipitación del colesterol y la consolidación del cálculo. Más aún, un porcentaje elevado de cálculos mixtos muestran al cortarlos bandas periódicas de sales de calcio.

La patogénesis de los cálculos pigmentarios no ha sido establecida con claridad y no se tiene hasta la fecha un método no

invasivo para su eliminación, como ocurre en el caso de ciertos cálculos de cloesterol en donde la litotripsia y el tratamiento con ácido ursodesoxicólico juegan un papel importante en su tratamiento. Por lo que se hacen necesarios más estudios para profundizar en la patogénesis de este tipo de cálculos y para buscar mecanismos de eliminación y/o prevención.

EPIDEMIOLOGIA

Estudios epidemiológicos han revelado que existe una alta prevalencia de cálculos de colesterol en el mundo Occidental en comparación con el Oriente, donde los cálculos café de pigmento predominan. Sin embargo, la proporción de cálculos de colesterol se ha incrementado simultáneamente con la urbanización e industrialización, especialmente en Japón (6).

Entre el 10 y 20% de los norteamericanos padecen de colelitiasis en algún momento de su vida, de los cuales el 27% presentan cálculos negros de pigmentos (7). En España la prevalencia alcanza el 20% de los individuos mayores de veinte años (24% en mujeres y 16% en varones; 8).

En México, un estudio señala que el 14.3% de la población presenta cálculos, siendo más del 85% cálculos de colesterol puros y mixtos, mientras que el 15% corresponde a los pigmentarios (9).

Factores epidemiológicos asociados con los cálculos de colesterol y mixtos son: dieta, edad, sexo, herencia, raza, clase social y varias asociaciones clínicas, tales como obesidad, resección ileal, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa crónica inespecífica), tratamiento con agentes hipolipemiantes derivados del ácido fibrico, pancreatitis y diabetes (1, 4, 10, 11, 12).

Dietas hipercalóricas y/o altas en colesterol favorecen la formación de estos cálculos, especialmente las ricas en carbohidratos refinados (4, 13).

Se ha encontrado que dietas ricas en leguminosas (frijol y lentejas) aumentan la litogenicidad de la bilis, al mismo tiempo

que disminuyen la secreción de fosfolípidos (14).

Los cálculos de colesterol se presentan con mayor frecuencia en mujeres que en hombres en proporción 2:1, y aunque pueden presentarse en todas las edades son especialmente frecuentes en la década de los 40 años de edad (15,16). Asimismo, en mujeres que utilizan anticonceptivos orales la frecuencia de colelitiasis es mayor (17).

Familiares de pacientes con cálculos tienen una frecuencia mayor de colelitiasis, que aquellos que no lo son, por lo que factores hereditarios han sido implicados en la susceptibilidad a formar cálculos (18). La raza también es un factor importante, por ejemplo, mientras las tribus de indios norteamericanos Pima, Chipewa y Navajos presentan una altísima frecuencia de colelitiasis (48.6%), especialmente entre mujeres de 25 a 34 años (73%; 4), la raza negra en Estados Unidos es mucho menos susceptible a la colelitiasis (19), lo cual concuerda con la baja frecuencia de colelitiasis encontrada en África (15).

Los cálculos cafés de pigmentos se presentan casi exclusivamente en el lejano Oriente, particularmente en zonas rurales, se asocian con infección de las vías biliares y se forman en ductos intra y extrahepáticos, lo cual hace difícil su eliminación.

Los cálculos negros pigmentarios son más frecuentes en grupos de edad mayor de los 60 años, se asocian con enfermedades hemolíticas o con cirrosis, enfermedades en las que hay una mayor secreción de bilirrubina no conjugada hacia la bilis. La bilis que rodea a estos cálculos no se encuentra infectada como ocurre con los cafés de pigmento.

PATOGENESIS

La patogénesis de los cálculos de colesterol está mejor entendida que la de los cálculos pigmentarios (20). Sin embargo, se han reconocido similitudes en la formación de ambos tipos de cálculos. Las principales etapas en las patogénesis para ambos

tipos de cálculos son: a) Relativa hipersaturación de la bilis con la sustancia formadora del cálculo, b) nucleación de cristales o precipitación, c) retención de cristales o precipitado en la vesícula biliar y, d) crecimiento del cristal o conglomerado (11).

La hipersaturación se refiere al colesterol, a la bilirrubina o a algún anión orgánico (sales biliares o ácidos grasos) o inorgánico (carbonato o fosfato) en los cálculos de pigmentos (11).

Cálculos de colesterol.

El colesterol es insoluble en agua y requiere de un sistema de agregados lipídicos que lo transportan en la bilis y lo solubilizan para prevenir su precipitación (21). En la bilis el colesterol se transporta en dos formas, por micelas mixtas formadas por ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol, y por vesículas unilamelares, constituidas por una bicapa de fosfolípidos y colesterol. La capacidad de transporte de la bilis depende de las proporciones de ácidos biliares y fosfolípidos relativas al colesterol, así como de los tipos de ácidos grasos de los fosfolípidos.

La supersaturación de la bilis con colesterol se considera que es el requerimiento básico para la precipitación de este lípido y la formación del cálculo (21). Esta supersaturación de la bilis con colesterol usualmente se debe a secreción excesiva de colesterol y/o secreción reducida de ácidos biliares en la bilis. La excesiva secreción de colesterol produce irritación del epitelio vesicular y por lo tanto aumenta la secreción de mucus, asimismo este lípido es absorbido por la pared vesicular y se deposita en las membranas de las células musculares, provocando hipomotilidad vesicular, lo cual favorece la formación del cálculo.

Cuando el contenido de colesterol excede la capacidad de

¹ Martin C. Carey, comunicación personal, curso internacional "Conceptos Actuales en Gastroenterología", Hospital Central Militar, Ciudad de México, junio de 1995.

solubilización de la bilis (bilis saturada), éste deja la fase líquida de la bilis y forma inicialmente cristales líquidos y finalmente cristales sólidos de colesterol. Estos cristales se aglomeran cuando un agente nucleante como el mucus, las glicoproteínas, los pigmentos biliares, el calcio o traza de algún metal está presente, conduciendo a la formación del cálculo (20).

El transporte diferencial del colesterol entre micelas y vesículas es muy importante para la formación de los cálculos, ya que la precipitación del colesterol ocurre después de la agregación de vesículas ricas en colesterol. Los ácidos grasos dietéticos afectan de manera importante la composición y cantidad de fosfolípidos biliares, lo cual a su vez afecta tanto la secreción de colesterol como su transporte entre vesículas y micelas. En modelos de bilis supersaturadas con colesterol, la distribución de diferentes especies moleculares de lecitina entre vesículas y micelas mixtas influye en la fisicoquímica de la solubilidad del colesterol y se cree que esto puede afectar la formación de los cálculos, o inclusive prevenirlos (22). Estos estudios mostraron que la lecitina de las vesículas tiende a presentar una mayor proporción de ácidos grasos saturados en sn-1 y sn-2, mientras que las micelas mixtas presentan más ácidos grasos insaturados (22). La capacidad de transportar el colesterol aumenta con el incremento en insaturación de la lecitina biliar; así, hay entre un 60% y 100% de aumento en la solubilidad micelar aparente del colesterol y en la proporción molar colesterol/lecitina metaestable de vesículas con lecitina más insaturada (16:0 - 20:4), cuando se compara con la lecitina más saturada (16:0 - 18:1), la cual es más común en la bilis (22). Asimismo, la adición de fosfolípidos a muestras de bilis tomadas de pacientes con cálculos de colesterol, aumenta el tiempo de nucleación a valores controles (i.e., > 21 días), mientras que la adición de sales biliares conjugadas con glicina o taurina, en proporción tal que disminuyan el índice de saturación de colesterol en la misma proporción que la adición de fosfolípidos, no afecta significativamente el tiempo de nucleación (23). Este estudio sugiere que incrementar los fosfolípidos

biliares puede ser más efectivo para prevenir los cálculos de colesterol, que incrementar las sales biliares.

El análisis de bilis vesicular humana ha mostrado distribuciones similares de las especies de lecitina entre vesículas y micelas mixtas que los modelos de bilis (24). Las micelas se encuentran enriquecidas en especies conteniendo grupos acilo insaturados (e.g., 16:1-18:2, 18:1-18:2 y 18:1-18:3), mientras que las vesículas se hallan enriquecidas en ácidos grasos más saturados (e.g., 16:0-16:1, 16:0-18:1 y 18:0-18:1). Análisis multivariado separado para cada bilis mostró que la distribución de lecitinas entre vesículas y micelas estaba relacionado con el grado de insaturación tanto en sn-1 como en sn-2, y con el tamaño de la cadena en sn1, con insaturación en sn-1 y sn-2 las lecitinas tienden a transferirse hacia micelas.

No obstante lo anterior, en la comparación de bilis vesicular de sujetos normales con la de pacientes con cálculos de colesterol o pigmentarios no se identificó ninguna relación entre las especies de lecitina y la presencia de cálculos (25).

El suministro en la dieta de aceite de pescado, rico en ácidos grasos n-3, (11.3g/día por 5 semanas) a pacientes con cálculos de colesterol aumenta la proporción de ácidos eicosapentanoico y docosahexanoico de los fosfolípidos biliares, y disminuye la de linoléico y araquidónico; de igual manera, la proporción colesterol/fosfolípidos de la bilis se reduce, lo cual produce una reducción de 25% en el índice de saturación de colesterol (26); sin embargo, el tiempo de nucleación de la bilis no fue afectado. En otro estudio también se encontró una disminución en el índice de saturación de colesterol de la bilis de pacientes con cálculos, lo cual, a diferencia del estudio anterior, se asoció con un aumento en el tiempo de nucleación (27). Estos estudios muestran que la litogenicidad de la bilis puede ser afectada por el tipo de ácidos grasos de la dieta.

Cálculos de pigmento.

Los cálculos de pigmento contienen principalmente sales de calcio de bilirrubina, carbonato, fosfato y ácidos grasos en varias proporciones (28), la precipitación de estas sales sobre una matriz de glicoproteína-mucina se produce cuando exceden su solubilidad, supersaturando la bilis. Las sales de calcio están frecuentemente presentes en el centro de todos los tipos de cálculos biliares (29,30,31).

Aunque el calcio constituye parte importante de todos los cálculos pigmentarios existe controversia respecto a si la concentración de este catión se encuentra elevada en la bilis con cálculos. La mayoría del calcio en la bilis se encuentra asociado a macromoléculas, incluyendo micelas de sales biliares, y sólo menos del 20% se encuentra libre en forma ionizada y disponible para coprecipitar con aniones (32). Mientras que algunos autores indican incrementos significativos de calcio total y/o ionizado en humanos (33,34) y modelos animales con cálculos pigmentarios (33), otros señalan que no hay tal incremento y que lo que se incrementa es el anión con el que forma una sal insoluble o que se altera la acidificación de la bilis, presentándose valores de pH más elevados en pacientes con cálculos calcificados (32,33). Se ha sugerido que la diferencia de hallazgos se puede deber a incrementos temporales o intermitentes de la concentración de calcio total o ionizado, lo cual lleve a la formación o calcificación del cálculo, para regresar posteriormente a valores normales (31).

El contenido de bilirrubina en bilis es de gran importancia para la patogénesis de los cálculos de pigmento, la cual se encuentra en forma conjugada como diglucurónido y 2 isómeros del monoglucurónido. La bilirrubina conjugada es estable en presencia de concentraciones fisiológicas de calcio, mientras que la bilirrubina no conjugada fácilmente forma sales de calcio, por ello no es sorprendente que las sales de bilirrubina no conjugada predominen en los cálculos de pigmento (28,35). La bilirrubina que

puede formar sales de calcio es la bilirrubina no conjugada (BNC). La solubilidad de ésta es muy baja a valores de pH fisiológicos de la bilis (valores entre 6 y 8), así a pH 8 la solubilidad de la BNC es de $0.1 \mu\text{M}$, esto se debe a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares de los carboxilos de las cadenas propiónicas de la bilirrubina, que se encuentran protonados (36). Las sales biliares formadoras de micelas interactúan con la BNC aumentando su solubilidad hasta 1 mM a pH 8, pues favorecen las formas monoaniónicas y dianiónicas de la BNC, sin embargo en presencia de concentraciones de calcio de 4 a 12 mM la solubilidad por las sales biliares disminuye hasta 10 o $15 \mu\text{M}$, lo cual se encuentra en el rango de la máxima concentración de BNC en la bilis normal (36). Asimismo, las sales biliares también interactúan con iones de calcio, constituyéndose en "buffers" que reducen la proporción de cationes de calcio libres que puedan formar sales insolubles no sólo con bilirrubinato sino también con fosfato, carbonato y ácidos grasos en la bilis (36).

En la formación de los cálculos cafés de pigmento se ha sugerido que la infección bacteriana asociada con éstos trae como consecuencia la desconjugación de la bilirrubina por acción de la beta glucuronidasa bacteriana, así como la liberación de ácidos grasos por hidrólisis de los fosfolípidos por lipasas bacterianas, lo cual conduce a la formación de cálculos blandos con sales de calcio de bilirrubina y ácidos grasos. Estos cálculos tienden a formarse en los conductos biliares intra y extra hepáticos, por lo que su eliminación por métodos quirúrgicos es complicada, además de que tienden a ser recurrentes. Como ya se mencionó estos cálculos se presentan principalmente en Oriente, en Occidente son raros y se pueden formar en el colédoco después de haberse realizado colecistectomía.

Los cálculos negros de pigmento se producen cuando hay una excreción aumentada de bilirrubina total en la bilis, incrementándose la proporción de bilirrubina monoconjugada y no conjugada, lo cual favorece la formación de sales insolubles de bilirrubinato de calcio. El pigmento precipitado polimeriza para

formar una red de pigmento que otorga el color negro y la característica de gran insolubilidad de estos cálculos (29), los cuales se forman en la vesícula biliar y no se asocian con infección de la bilis.

Los cálculos negros de pigmento pueden presentar cantidades variables de carbonato y/o fosfato de calcio que van de 0 hasta 30 o 40% de la masa del cálculo (5). Los dos aniones inorgánicos carbonato y fosfato se encuentran en la bilis en equilibrio con sus formas protonadas. El equilibrio entre estas formas protonadas y no protonadas es sensible al pH, favoreciéndose la precipitación de estas sales de calcio a valores de pH más alcalino (28,33). La vesícula biliar acidifica la bilis secretando el ión hidrógeno, por lo que una alteración de esta secreción de H⁺ se considera como una causa de la formación de cálculos pigmentarios, y de la calcificación de cálculos de colesterol en humanos (32).

La espectroscopía de infrarrojo de los cálculos negros de pigmento indica que el fosfato de calcio está siempre presente como hidroxiapatita de calcio (28, 37). La hidroxiapatita se forma directamente a partir de fosfato de calcio amorfo (37); este proceso puede ser inhibido por varios factores, Williams y Sallis clasifican a los inhibidores de la formación de hidroxiapatita en dos clases, de acuerdo con su modo de acción: inhibidores tipo I, los que se unen a la superficie del embrión de hidroxiapatita, previniendo su crecimiento y los inhibidores tipo II que se unen a fosfato de calcio amorfo retardando su transformación (28, 37). En la bilis se ha encontrado que la precipitación de la hidroxiapatita es inhibida por bajas concentraciones (premicelares) de glicoenodeoxicolato (GCDC) y es prevenida (i.e., 100% inhibida) por concentraciones iguales o superiores a 2mmol/L (37). Estudios subsiguientes mostraron que de las sales biliares sólo las especies dihidroxiladas (ácidos quenodesoxicólico y desoxicólico) conjugadas con glicina previenen la precipitación de la hidroxiapatita, lo cual ocurre por competencia entre las sales biliares y los aniones de HPO₄⁻ para unirse a sitios en el embrión del cristal de hidroxiapatita (37), es decir, actúan como inhibidores de tipo I.

Se sugiere que hay numerosos sitios de unión en la hidroxiapatita pero sólo unos pocos son cruciales para inhibir su crecimiento (37). La unión de GCDC a la hidroxiapatita es promovida por el calcio y se presume que el incremento en la unión de las sales biliares es causado por exceso de calcio en la superficie del embrión de hidroxiapatita (37).

Por otro lado, se ha aislado de cálculos de colesterol y de pigmentos una pequeña glicoproteína biliar acidica, la cual se encuentra asociada con bilirrubina, que se une a carbonato de calcio e inhibe su precipitación in vitro. Sin embargo, se ha sugerido que in vivo esta proteína favorece la precipitación de carbonato de calcio a través de un proceso similar al de biomineralización en otros tejidos y órganos. En el proceso de biomineralización el depósito de pequeñas proteínas acidicas sobre un andamio de proteína de alto peso molecular (e.g. mucina) antecede y regula la precipitación y acreción de sales de calcio, con la subsecuente polimerización en estado sólido de bilirrubinato de calcio y otras sales (29,30). Proteínas acidicas de este tipo han sido encontradas en conchas de moluscos, perlas, dientes, huesos y cálculos renales y pancreáticos.

MODELOS DE COLELITIASIS PIGMENTARIA:

Existen un buen número de modelos de coleditiasis pigmentaria, entre los que se encuentran animales que desarrollan cálculos negros de pigmentos. Estos modelos pueden ser útiles para investigar las causas por las cuales la bilirrubina que constituye estos cálculos se polimeriza, asimismo, serían útiles en la búsqueda de mecanismos de prevención o solubilización. Otros son modelos de cálculos constituidos por otras sales orgánicas e inorgánicas de calcio; estos modelos pueden ser de utilidad en el estudio de las causas, mecanismos y factores que afectan la formación de sales de calcio, así como en la búsqueda de agentes quelantes del calcio en la bilis, pues en el hombre es frecuente la calcificación de los cálculos de colesterol, y todos

los cálculos pigmentarios contienen sales de este elemento.

a) Ratón albino: Trotman et al (38) publicaron sobre una cepa de ratón albino con anemia normoblástica, que desarrolla cálculos biliares 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 una frecuencia de colelitiasis el doble de la de los machos. Los animales con cálculos presentan una bilis vesicular con un pH más bajo y mayores concentraciones de bilirrubina total, calcio y ácidos biliares que los que no presentan cálculos; asimismo, la fracción ionizada de bilirrubina no conjugada, i.e., la que puede formar sal de calcio, es más elevada en animales con colelitiasis.

b) Ratón de Patas Blancas o Matorralero: en este animal se producen espontáneamente cálculos pigmentarios, en todas las edades, en ambos sexos, y más frecuentemente en ratones con esferocitosis. Se cree que factores hereditarios predisponen a estos animales a la formación de cálculos, pues este defecto no involucra sólo al gen recesivo responsable de la esferocitosis (39).

c) Perro de las Praderas: la resección intestinal distal produce cálculos pigmentarios en este animal; se cree que la interrupción de la circulación enterohepática de las sales biliares, causa un incremento en la proporción de bilirrubina/sales biliares, que provoca la precipitación de bilirrubinato de calcio (40). Asimismo, la alimentación de estos animales con alfalfa y maíz por 12 semanas produce cálculos compuestos por 45% de colesterol, 30% de pigmentos biliares y 25% de bilirrubinato de calcio en la mitad de los animales. La bilis vesicular presenta mayores concentraciones de calcio, fosfolípidos y colesterol, y el transporte de iones por el epitelio vesicular se encuentra alterado (41).

d) Cobayo: en este animal se producen cálculos pigmentarios ricos en fosfato de calcio, con una dieta semipurificada alta en colesterol y adicionada de riboflavina. El exceso de colesterol provoca hígado graso, esplenomegalia y severa anemia, pero la riboflavina es esencial para el desarrollo de los cálculos (42). Más recientemente se ha reportado la inducción de cálculos

pigmentarios en cobayos alimentados con una dieta de mantenimiento adicionada de 0.5% de colesterol. Estos cálculos parecen formarse debido a anemia hemolítica inducida por el colesterol (43). También se han producido cálculos pigmentarios en cobayos por resección yeyunoileal del 50 al 95% (44).

e) 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 C5 y el C6; en el hígado el colestanol es convertido a ácido alocólico, el cual al entrar en la circulación enterohepática es convertido en ácido alodesoxicólico, que al ser conjugado con glicina tiene una menor solubilidad que el ácido glicodesoxicólico por lo que se precipita en la bilis como una sal de calcio (45). Se ha encontrado que en el conejo, el ácido oléico, al nivel de 15% en la dieta, es transformado en colestanol, y por lo tanto también produce este tipo de cálculos pigmentarios (46). El antibiótico Kanamicina previene esta colelitiasis, lo cual indica que se requiere que el ácido alocólico sea transformado en alodesoxicólico por la flora intestinal (46).

f) Perro: se forman cálculos pigmentarios con dietas ricas en taurina y deficientes en proteínas, así como con dietas altas en carbohidratos, adicionadas de colesterol y con una baja proporción de proteínas. Los cálculos están constituidos por un residuo negro y mucoproteínas; el análisis del pigmento por NMR, demostró que es un polímero de bilirrubina. La bilis que rodea estos cálculos muestra un pH bajo, la bilirrubina y las sales biliares no conjugadas, así como la hexosamina se encuentran en concentraciones más elevadas que en la bilis de los animales controles (47). Asimismo, se han producido cálculos de pigmento en esta especie con una dieta alta en colesterol y deficiente en metionina. Estos cálculos se encuentran asociados con concentraciones biliares elevadas de calcio y bilirrubina no conjugada. Se ha encontrado que esta dieta produce un mayor flujo biliar, debido a un incremento en la fracción independiente de ácidos biliares (31).

COLELITIASIS PIGMENTARIA EN EL JAMSTER DORADO

Dam reportó que con su dieta sin grasas y alta en glucosa se produce un pequeño porcentaje de cálculos pigmentarios, el cual se incrementa cuando se substituye la glucosa con sacarosa, o con la adición de 2% de aceite de soya o de hígado de bacalao (48). Estos cálculos que morfológicamente semejan a los negros de pigmento humanos, están constituidos por fosfato de calcio, sales biliares conjugadas con glicina y un bajo porcentaje de pigmentos biliares.

También han sido producidos cálculos pigmentarios en el jámster por adición de colesterol y estrógenos a la dieta de mantenimiento; estos cálculos, compuestos de fosfato y bilirrubinato de calcio, colesterol y proteína, pueden ser prevenidos con ácidos ursodesoxicólico y quenodesoxicólico (49,50). La adición de lactosa disminuye la formación de cálculos, lo cual se asocia con la reducción de los lípidos del plasma, especialmente triacilgliceroles, la acumulación de colesterol hepático y una baja concentración de colesterol biliar (51).

El jámster alimentado con dieta alta en glucosa presenta una producción aumentada de mucina vesicular durante la primera semana antes de la formación del cálculo, el depósito inicial de los cristales de pigmento ocurre en: mucus, bilis o sobre la superficie interna de la vesícula biliar; el cálculo va creciendo por aglomeración de cristales pigmentados entrelazados en el mucus (52).

En 1971 en la Habana (Cuba), Granados observó que dietas para ratones, suministradas a jámsteres, producían cálculos de pigmento que no contenían colesterol, pero sí hidroxapatita. Estos cálculos se presentan con mayor frecuencia en machos que en hembras, y la orquidectomía disminuye apreciablemente esta coleditiasis (53). Continuando estas investigaciones, ya en el Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM, Granados y colaboradores han establecido la acción litogénica pigmentaria en el jámster, de la mantequilla de leche de vaca, de la vitamina A,

tanto como acetato de retinol como de ácido retinóico, y de carbohidratos refinados, tales como la sacarosa, glucosa y fructosa, cuando se adicionan a la dieta normal de roedores y se suministran a los animales por periodos de al menos 50 días (54,55). Las frecuencias de colelitiasis alcanzadas con estas dietas van de 50 a 100% de animales con cálculos. La patogenesis de esta colelitiasis aún no ha sido establecida.

Asimismo, en este laboratorio se han investigado compuestos que puedan prevenir esta colelitiasis, encontrándose que el ácido dehidrocólico, el derivado de aceite de cártamo Polifat KA-02, un extracto hidroalcohólico de "Gobernadora" (*Larrea tridentata*), el ajo (*Allium sativum*), el azul de metileno y el hidroxitolueno butilado previenen la colelitiasis producida por la Vitamina A (56, 57, 58, 59, 60, 61).

Entre estos factores, el Polifat KA-02 (PKA; producido por la compañía Aceites Polimerizados S:A., México, D.F.), es el único que no ha producido disminución del crecimiento de los animales, disminución que se considera un signo de toxicidad. El PKA es la mezcla de ácidos grasos libres del aceite de cártamo; es producido por hidrólisis ácida del aceite, seguida por destilación de los ácidos grasos. Puesto que el aceite de cártamo crudo no previene la colelitiasis (Polifat hidrogenado) es en el proceso de elaboración del PKA que adquiere la característica de prevenir la colelitiasis, quizás porque se produzca una sustancia responsable de la prevención, tal vez algún isómeros de ácidos grasos, o porque los ácidos grasos se separen de un agente que la impida (glicerol o lípidos no saponificables), o ambas cosas. Otros derivados de aceites vegetales tales como el Polifat US-2, rico en ácido oléico, y el Polifat S-08; derivado del aceite de soya, carecen de esta acción preventiva, por lo tanto esta característica es específica de PKA (62). En un estudio anterior se hidrogenó el PKA para determinar si los ácidos grasos insaturados son los responsables de la prevención; los resultados de este estudio mostraron que tanto el PKA normal como el hidrogenado (>99% de hidrogenación) previenen la colelitiasis (63). Sin embargo, el mecanismo de prevención por

el aceite hidrogenado parece ser diferente, ya que la hidrogenación o los niveles dietético suministrados produjeron alteraciones en la absorción intestinal, reflejadas en un aumento del 100% en la masa de heces de 24 horas, junto con una disminución notable del crecimiento, asimismo, los animales con PKA hidrogenado aunque no presentaron cálculos como tales, si presentaron unas formaciones gelatinosas, las cuales podrían corresponder a cálculos no completamente constituidos.

OBJETIVOS

General:

El objetivo del presente trabajo es el de estudiar el mecanismo por el cual el derivado de aceite de cártamo Polifat KA-02 (PKA) previene la colelitiasis pigmentaria del jámster, lo cual nos puede conducir no sólo a un mejor entendimiento de su modo de acción, sino a establecer la patogénesis de la colelitiasis producida por la vitamina A en el jámster.

Específicos:

- Dentro de las investigaciones hacia el establecimiento del principio(s) activo(s) del PKA, se realizará el fraccionamiento de éste por medio de cocristalización con urea para obtener una fracción rica en ácidos grasos saturados y otra en insaturados.

- Asimismo, se determinaran los efectos de la dieta litogénica sola y adicionada de PKA y sus fracciones, sobre la secreción y composición de la bilis del jámster, así como sobre la colelitiasis, para establecer qué efectos se asocian con la formación y con la prevención de los cálculos.

- Se buscará un nivel menor de PKA, que prevengan la colelitiasis, en base a este nivel y a la proporción de fracciones saturada e insaturada obtenidas, se determinará que niveles dietéticos de las fracciones conviene suministrarle a los animales.

HIPOTESIS

Puesto que la vitamina A produce cálculos biliares con alto contenido de hidroxapatita, las concentraciones de fosfato y calcio biliares deben encontrarse elevadas.

El PKA previene la colelitiasis por impedir el aumento en la concentración de fosfato y calcio biliares.

La fracción insaturada de PKA contiene el principio preventivo del PKA, ya que sus ácidos grasos insaturados sufren en las dobles ligaduras isomerización y conjugación durante la elaboración del PKA, uno o varios de los cuales son responsables de la acción preventiva.

MATERIAL Y METODOS

Los Nutricubos Purina para Roedores Pequeños fueron obtenidos de Purina, S.A, México D.F. La vitamina A (Acetato de Retinol, tipo 500) fue donada por Productos Roche, S.A., México, D.F. El Polifat KA-02 fue generosamente proporcionado por Aceites Polimerizados, S.A., México, D.F. La urea cristalina fue comprada en la Droguería Cosmopolita, México, D.F.

El pentobarbital fue Anestosal de Smith Kline, México, D.F., y el ácido ascórbico USP de Miles Laboratories Inc.

Acido clorhídrico (38%), ácido sulfúrico, ácido tricloro acético, benceno, bicarbonato, cloroformo, EDTA-Na, etanol absoluto, hidróxido de sodio, metanol, molibdato de amonio, peróxido de hidrógeno, sulfato de hidrazina y sulfato de sodio anhidro fueron grado analítico de J.T. Baker S.A. de C.V., Xalostoc, Edo. de México.

Acido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, bisulfito de sodio, NAD, sulfito de sodio, 3 Ó-hidroxiesteroide deshidrogenasa, el juego de reactivos para colesterol y el juego de reactivos para fosfatasa alcalina se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA.

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan y los juegos de reactivos para transaminasas y colesterol enzimático fueron de Merck-México, S.A., Naucalpan de Juárez, Edo. de México.

Fraccionamiento del PKA por cocrystalización con urea:

Este se realizó por lotes de 200 g como sigue (64): en un vaso de precipitados de 4 litros se calentaron 1.8 l de metanol, hasta iniciar ebullición, se agregaron 334 g de urea; una vez disuelta la urea se adicionaron 200 g de PKA. La mezcla se guardó en un garrafón ambar en la oscuridad durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se decantó el metanol de los cristales de urea, dejando escurrir los cristales durante 15 minutos. Los cristales de urea se disolvieron con 1 litro de una solución con

3.72 g de EDTA-Na, 1 g de ácido ascórbico y 5 ml de HCl (38%), a temperatura de 80-90°C. La fase acuosa se separó de la oleosa empleando un embudo de separación, dejando la oleosa en el embudo y efectuando 3 lavados sucesivos de la misma con 250 ml de la solución de EDTA-ácido ascórbico.

La fase oleosa ya separada se calentó a punto de ebullición, se decantó en caliente el aceite y se guardó en un vaso de precipitado, previamente pesado. Finalmente, se pesó la fracción obtenida de ácidos grasos saturados (PKA-S).

El metanol conteniendo los ácidos grasos insaturados se colocó en un matraz de bola de 2 l, se calentó en baño de agua y se destiló el a baja presión.

Una vez evaporado todo el metanol el residuo se lavó con 1 litro de la solución de EDTA-ácido ascórbico a temperatura de 25 a 30°C, se separó la fase oleosa y se lavó como en el caso anterior. La fase oleosa se recogió en un vaso de precipitados, se dejó reposar para que se separó el agua y posteriormente se decantó el aceite, el cual se dejó secar sobre Na₂SO₄ anhidro (20 g) hasta deshidratarse (aprox. 1 semana); finalmente se pesó la fracción obtenida de ácidos grasos insaturados (PKA-I).

Caracterización de Polifat KA-02 y sus fracciones:

Este análisis se llevó a cabo en el Departamento de Química Orgánica, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, con el asesoramiento de la Química Patricia Elizalde, como sigue: 20 mg de muestra se metilaron con BF₃ en metanol, se extrajo con benceno y el extracto se inyectó (20µl) en un cromatógrafo Varian modelo 3300 con columna de 5% de fenilacetil silicón de 15 m, un inyector Split-Splitless y un detector de ionización de flama. Los corrimientos se hicieron por 17 minutos con las siguientes condiciones:

Temperatura 100-200°C, aumentando 10°C por minuto.

Inyector a 200°C.

Detector a 250°C.

Diseño experimental:

En los dos experimentos realizados, se utilizaron jámsteres

dorados machos recién destetados de la cepa ChCM, la cual hasta hoy no ha producido mutantes de color del pelaje. Los miembros de cada camada fueron distribuidos en tal forma que participaran por igual en los distintos grupos. Se mantuvieron en jaulas experimentales de hierro galvanizado con piso de malla metálica, alimentados ad libitum con las diferentes dietas y agua corriente, suministradas en recipientes de hierro galvanizado. Los animales fueron pesados semanalmente para determinar sus curvas de crecimiento, como un parámetro de su estado de salud. Al final del período experimental los animales fueron puestos en ayuno por 12 h, anestesiados con pentobarbital i. p. (5 mg/100 gramos de peso corporal). En el primer experimento se les colocó una cánula de polietileno en el colédoco, mientras que en el segundo experimento se ligó el conducto cístico antes de canular el colédoco. En ambos experimentos se colectó bilis durante dos horas en tubos de polipropileno siliconizados de 2 ml de capacidad, previamente pesados, colocados sobre hielo. Las muestras de bilis se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Después de colectada la bilis, los jámsteres fueron sangrados por punción cardíaca con jeringas de 3 ml y agujas de 25G. Aún bajo anestesia, fueron sacrificados por fractura de la nuca, y las necropsias se llevaron a cabo inmediatamente después.

El suero fue separado de los componentes celulares de la sangre por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min en una centrífuga Adams-Dynac CT-1350 con cabezal de columpio. El suero fue mantenido entre 4 y 0°C hasta el momento del análisis. El hígado fue disecado, pesado y almacenado a -20°C para la determinación del contenido de vitamina A hepática.

Primer Experimento:

Se utilizaron 52 jámsteres machos de 30 días de edad promedio, divididos en cuatro grupos iguales y alimentados durante 70 días con las dietas que se muestran en la tabla 1.

TABLA 1
DIETAS DEL PRIMER EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	COMPONENTE (g/kg)			ENERGIA kcal/kg
	PURINA ¹	PKA	VITAMINA A ²	
1 Basica (DB)	1 000	-	-	3 254
2 DB + 25000 UI% retinol (DL)	999.5	-	0.5	3 253
3 DL + 10%PKA	889.5	100	0.5	3 859
4 DL + 15% PKA	849.5	150	0.5	4 160

¹ Nutricubos Purina pulverizados.

² Tipo 500 de Productos Roche, con 500 000 UI/g

En este experimento se determinó, en suero, la actividad de las enzimas transaminasa glutámica-pirúvica (TGP), transaminasa glutámica-oxalacética (TGO), y de fosfatasa alcalina para evaluar función hepática. En bilis se determinó colesterol, fosfolípidos, sales biliares y fósforo total, y en hígado vitamina A.

Segundo Experimento:

Se formaron 5 grupos de 20 jámsteres machos de 71 días de edad promedio, los cuales fueron alimentados durante 70 días con las dietas que se indican en la tabla 2.

TABLA 2
DIETAS DEL SEGUNDO EXPERIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	COMPONENTE (g/Kg)					ENERGIA kcal/kg
	PURINA ¹	PKA	PKA-I	PKA-S	VIT. A ²	
A DIETA BASICA (DB)	1 000	-	-	-	-	3 254
B DB + 25000 UI% retinol (DL)	999.5	-	-	-	0.5	3 253
C DL + 10% PKA	889.5	100	-	-	0.5	3 859
D DL + 6.6%PKA-I	933.5	-	66	-	0.5	3 653
E DL + 3.4%PKA-S	965.5	-	-	34	0.5	3 460

¹ Nutricubos Purina pulverizados.

² Tipo 500 de Productos Roche, con 500 000 UI/g

En este experimento se determinaron, en hígado, vitamina A, en bilis, colesterol, fosfolípidos, sales biliares, fósforo inorgánico y fósforo total, y en suero fósforo inorgánico.

Flujo biliar: se determinó gravimétricamente, es decir, por diferencia entre el peso del tubo antes y después de colectada la bilis, considerándose una densidad de $1 \mu\text{g} = 1 \mu\text{l}$. El valor obtenido se divide entre el tiempo en minutos y el peso del hígado del animal, resultando así el flujo biliar en $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gramo}$ de hígado.

Análisis de muestras:

Vitamina A hepática: la determinación del contenido de vitamina A hepática se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de Olson (65), de la siguiente manera: cada

hígado fue pesado en una balanza analítica modelo Mettler A30, colocado en una caja de petri de 60 X 15 mm, picado finamente y mezclado homogéneamente. Se tomó una alícuota de 0.5 g, la cual se colocó en un vial de 60 X 25 mm con tapón de rosca; se le agregó 1 g de sulfato de sodio anhidro y se maceró con una varilla de vidrio hasta obtener una mezcla de consistencia pastosa; inmediatamente después se adicionaron 5 ml de cloroformo. Los viales fueron tapados y mantenidos a 0°C durante toda la noche. Una alícuota de 25 microlitros del extracto cloroformico se diluyó con 3 ml de etanol absoluto en una celda de cuarzo de 3 ml de capacidad por 1 cm de paso, y se leyó la absorbancia a 380, 330 y 280 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQII. Finalmente el contenido de vitamina A en el hígado se calculó con la siguiente fórmula:

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

$$\mu\text{g retinol/g hig} = A_{330} \text{ corr.} \times \text{factor de dilución}/0.1835$$

L- Alanina: 2 oxoglutarato amino transferasa o transaminasa glutámica-pirúvica (GPT): esta enzima fue determinada por el método de Reitman y Frankel (66), con juego de reactivos Merck-México, S.A. (México, D.F.) de la siguiente manera: en un tubo de 100 X 13 mm fueron colocados 0.25 ml de la solución amortiguadora sustrato, la cual contenía 100 mM de amortiguador de fosfato de sodio a pH 7.4, 200 mM de DL-alanina y 2 mM de alfa-cetoglutarato; se incubó por 5 minutos a 37°C; posteriormente se agregaron 0.05 ml de suero continuándose la incubación por 30 minutos. Inmediatamente después se añadieron 0.25 ml de una solución de 1.5 mM de 2,4-dinitrofenilhidracina y se mantuvo 20 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este período se agregaron 2.5 ml de NaOH 0.4 N y se determinó la absorbancia a 546 nm entre 5 y 30 minutos después de agregar el NaOH. Las determinaciones se hicieron por duplicado y se leyeron contra un blanco consistente de la misma mezcla a la cual se agregó el suero después de la solución de 2,4-dinitrofenilhidracina.

L-Aspartato: 2-Oxoglutarato amino transferasa o transaminasa glutámica-oxalacética (GOT): esta enzima fue determinada por el método de Reitman y Frankel (66) y fue igual al método para GPT,

excepto que se emplearon sólo 0.1 ml de suero y la solución amortiguadora/sustrato contenía 100 mM de L-Aspartato en vez de 200 mM de DL-alanina.

Fosfatasa Alcalina: esta enzima se determinó mezclando 2 ml de sustrato de fosfatasa alcalina (timolftaleína monofosfato) con 0.05 ml de suero, se incubó durante 10 minutos a 37°C; posteriormente se adicionó 1 ml de reactivo alcalino y se leyó la absorbancia a 590 nm (Método Hycel, 67)

Fósforo total en bilis: 10 μ l de bilis se digieren con 0.2 ml de H₂SO₄ 10 N durante 2 horas a 150-160°C, después se agregan dos gotas de H₂O (30%) y se mantiene por 1 hora a 150-160°C. En la muestra digerida se determina fósforo inorgánico por la reacción de Fiske-Subbarow modificado por Barlett (68), la cual consiste en adicionarle 0.75 ml de agua desionizada, 0.2 ml de 5% de molibdato de amonio tetrahidratado y 0.05 ml de solución reductora (consistente en 10 mg de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 120 mg de sulfito de sodio y 600 mg de bisulfito de sodio en 5 ml de agua desionizada). En seguida se pone en agua hirviendo durante 10 minutos, se enfría a temperatura ambiente, y se determina su absorbancia a 700 nm leyéndose contra agua. Se prepara una curva patrón de 1 a 3 μ g de Pi, con una solución de KH₂PO₄ con 80 μ g Pi/100 ml.

Fósforo inorgánico en bilis y en suero: se utilizaron 80 μ l de bilis o de suero diluido 1:2, los cuales fueron mezclados con 20 μ l de ácido tricloroacético al 45%. Se dejaron reposar 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. Se tomaron 25 μ l del sobrenadante y se agregaron 200 μ l de H₂SO₄ 10 N y se determinó fósforo como se indicó en el método de fósforo total.

Fosfolípidos: se determinaron como fósforo orgánico de la siguiente manera: 0.1 o 0.05 ml de bilis fueron extraídos con 2.1 ml de cloroformo-metanol (2:1) y 1 ml de agua desionizada, agitando en vortex por 30 segundos; se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se colocan 0.4 ml del extracto cloroformico en tubos de 75 X 8 mm (por duplicado); y se

evapora el disolvente.

La muestra evaporada se digiere y se determina fósforo por la reacción de Fiske-Subbarow, de igual manera como en la sección de fósforo total (68).

Sales biliares: se empleó una modificación de los métodos de Turley y Dietschy (69) y de Coleman *et al* (70) como a continuación se indica: 50 μ l de bilis se diluyeron con 450 μ l de metanol. Se colocan 0.1 ml de bilis:metanol en tubos de 10 ml por triplicado (2 para muestra y 1 para blanco). A los 3 tubos de cada muestra se les agrega lo siguiente: 1.5 ml de Tris-HCl pH 9.5, 1 ml de 1M de sulfato de hidrazina pH 9.5 y 0.3 ml de 1 mM de NAD neutralizado con bicarbonato. A los tubos de muestra se les agrega 0.1 ml de una solución de 3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa en 10 mM Tris-1 mM de EDTA pH 7.2 (2U/ml). Al tubo blanco se le agrega 0.1 ml de Tris EDTA pH 7.2 en vez de la enzima. Se incuban por una hora a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 340 nm contra un blanco de reactivos.

Colesterol: en el Primer Experimento se empleó un juego de reactivos Merckotest Colesterol Enzimático (71), el cual se basa en la oxidación del colesterol por la colesterol oxidasa para producir colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno, que a su vez reacciona con yoduro de potasio para producir yodo, el cual se determina fotometricamente a 365 nm. El cálculo de la concentración de colesterol se hizo utilizando el factor indicado por el fabricante. En el Segundo Experimento se empleó el juego de reactivos Sigma Cholesterol (72), el cual se basa también en la oxidación del colesterol y producción de peróxido de hidrógeno, pero este último se hace reaccionar con 4-aminoantipirina y p-hidroxibenzeno-sulfonato para producir el colorante quinoneimina, que se determina fotometricamente a 500 nm; para el cálculo de la concentración de colesterol se trató una solución estandar de colesterol de 200mg/dl (Sigma Cholesterol Calibrator) igual que la muestra.

Análisis estadístico:

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de análisis de varianza (ANOVA) y Bonferroni para comparación múltiple

con un nivel α de 0.05, así como por Chi-cuadrada, considerándose también significativo un valor α de 0.05. Se empleó el programa de computo PRIMER versión 1.0 (McGraw-Hill Inc., 1988) para el análisis.

RESULTADOS

Primer Experimento

En este experimento se utilizaron 2 niveles de Polifat KA-02 (PKA) para establecer un nivel dietético inferior que protegiera contra la colelitiasis producida por la vitamina A.

Los resultados respecto a la frecuencia de colelitiasis se presentan en la Tabla 3, en la cual se muestra que el grupo con dieta normal no presentó ningún animal con cálculos. Por otra parte, la dieta litogénica (Grupo 2) produjo un alto porcentaje de animales con cálculos (100%), con un peso promedio de los cálculos de 0.600 mg/animal, mientras que el PKA, tanto al nivel de 10 como de 15% (Grupos 3 y 4) previno completamente la formación de cálculos producidos por la vitamina A.

TABLA 3
FRECUENCIA DE CALCULOS BILIARES, PESO DEL HIGADO Y
VITAMINA A HEPATICA EN EL PRIMER EXPERIMENTO

GRUPOS Y DIETAS	ANIMALES CON CALCULOS	PESO % DEL HIGADO	VITAMINA A HEPATICA	
			µg/g híg	mg/ híg
1 DIETA BASICA (DB)	0/13	2.98 ± 0.17 (n = 12)	162 ± 19 (n = 10)	0.49 ± 0.07 (n = 10)
2 DB + 25000 UI% retinol (DL)	13/13*	3.13 ± 0.13 (n = 13)	1776 ± 157* (n = 9)	5.74 ± 0.70* (n = 9)
3 DL + 10% PKA	0/13*	3.60 ± 0.34 ^{ab} (n = 12)	1363 ± 133 ^{ab} (n = 10)	5.70 ± 0.68* (n = 10)
4 DL + 15% PKA	0/13*	5.30 ± 0.52 ^{abc} (n = 13)	1285 ± 73 ^{ab} (n = 9)	5.67 ± 0.64* (n = 9)

* P<0.05 vs Grupo 1; ^a P<0.05 vs Grupo 2; ^b P<0.05 vs Grupo 3

En relación con el peso porcentual del hígado en el Primer

Experimento (Tabla 3), los grupos que recibieron PKA presentaron una significativa hepatomegalia (Grupos 3 y 4 vs Grupo 1), la cual fue proporcional a la dosis; sin embargo, la apariencia macroscópica del hígado fue normal, tanto en color como en textura.

Por otro lado, la concentración de vitamina A hepática en los grupos que recibieron PKA fue significativamente menor que la del grupo con dieta litogénica (Grupos 3 y 4 vs Grupo 2), sin embargo, debido a la hepatomegalia de los grupos 3 y 4, la vitamina A hepática total no fue diferente a la del Grupo 2 (Tabla 3).

En cuanto a las enzimas empleadas para determinar función hepática, la Tabla 4 muestra que los valores para la enzima fosfatasa alcalina fueron muy similares en los cuatro grupos.

TABLE 4
VALORES SERICOS DE TRANSAMINASAS Y FOSFATASA
ALCALINA EN EL PRIMER EXPERIMENTO

GRUPOS Y DIETAS	FOSFATASA ALCALINA U	GOT mU/ml	GPT mU/ml
1 DIETA BASICA (DB)	8.06 ± 0.93 (n = 9)	41.9 ± 10.6 (n = 11)	31.5 ± 12.4 (n = 10)
2 DB + 25 000 UI% retinol (DL)	9.11 ± 1.70 (n = 7)	43.7 ± 8.7 (n = 10)	40.6 ± 13.6 (n = 9)
3 DL + 10% PKA	7.58 ± 1.80 (n = 9)	51.3 ± 19.2 (n = 10)	36.1 ± 25.6 (n = 9)
4 DL + 15% PKA	8.17 ± 1.90 (n = 8)	66.3 ± 18.5 ^a (n = 8)	55.5 ± 24.1 (n = 8)

^a P<0.05 vs Grupo 1; ^b P<0.05 vs Grupo 2

Por otra parte, el valor para la TGO fue significativamente mayor que el valor del grupo control sólo en el grupo que recibió 15% de PKA (Grupo 4 vs Grupo 1), mientras que en los demás grupos,

aunque presentaron valores promedio de TGO y TGP mayores que el control, éstos no fueron significativamente diferentes.

En relación a los parámetros biliares, estos se presentan en la Tabla 5, la cual muestra que la vitamina A *per se* (Grupo 2) produjo una significativa coleresis que fue acompañada por una marcada baja en las concentraciones de lípidos biliares, tanto de colesterol, como de sales biliares y fosfolípidos (Grupo 2 vs Grupo 1).

TABLA 5
FLUJO BILIAR, COLESTEROL Y SALES BILIARES
EN EL PRIMER EXPERIMENTO

GRUPOS Y DIETAS	FLUJO BILIAR μl/min/g h	COLESTEROL mg/dl	SALES BILIARES mM	FOSFO LÍPIDOS mg Pi/dl
1 DIETA BASICA (DB)	1.57 ± 0.46 (n = 10)	32.8 ± 10.4 (n = 10)	15.4 ± 4.1 (n = 10)	9.5 ± 1.9 (n = 10)
2 DB + 25000 UI% retinol (DL)	2.81 ± 0.49 ^a (n = 11)	7.24 ± 4.6 ^a (n = 11)	7.6 ± 2.6 ^a (n = 10)	3.3 ± 1.7 ^a (n = 11)
3 DL + 10% PKA	1.82 ± 0.33 ^b (n = 11)	18.1 ± 8.9 ^a (n = 12)	8.9 ± 1.5 ^a (n = 10)	6.3 ± 1.2 ^b (n = 12)
4 DL + 15% PKA	1.49 ± 0.58 ^b (n = 11)	26.1 ± 12.1 ^b (n = 11)	12.4 ± 3.4 ^a (n = 9)	8.3 ± 1.9 ^b (n = 11)

^a P<0.05 vs Grupo 1; ^b P<0.05 vs Grupo 2

Por otra parte, el PKA adicionado a la dieta litogénica contrarrestó el efecto colerético de la vitamina A en forma dosis dependiente (Grupos 3 y 4 vs Grupo 2), retornando el flujo a valores cercanos a los de los controles con el nivel de 15%; asimismo, el PKA incremento todos los lípidos biliares también en forma directa al nivel dietético y regresando a valores casi normales con el nivel de 15% (Grupo 4 vs Grupo 1), aunque las concentraciones de colesterol y sales biliares con el nivel de 10%

de PKA se incrementan ligeramente, éstas no fueron significativas, pero sí, la de fosfolípidos (Grupo 3 vs Grupo 2).

Respecto al fosfato biliar, la Tabla 6 muestra que, como ya mencionamos, el fosfato orgánico biliar, constituido por los fosfolípidos (estos datos son los mismos de la Tabla 5, los cuales se presentan aquí de nuevo para mejor comparación), disminuye con la vitamina A y se incrementa con PKA, mayormente con el nivel de 15% (Grupos 3 y 4 vs Grupo 2); lo mismo ocurre para el fosfato total, pero sólo es significativo con el nivel de 15% de PKA (Grupo 4 vs Grupo 2). Sin embargo, la disminución en fosfato total inducido por la vitamina A es mucho menor que el efecto sobre los fosfolípidos. Debido a lo anterior, la diferencia entre fosfato orgánico y fosfato total, la cual es una aproximación del contenido de fosfato inorgánico, se elevó a poco más del doble en los animales que recibieron la dieta litogénica sola (Grupo 2 vs Grupo 1), mientras que adición de PKA a la dieta litogénica produjo valores similares a los del Grupo control (Grupo 3 y 4 vs Grupo 1).

TABLE 6
FOSFATOS BILIARES EN EL PRIMER EXPERIMENTO

GRUPOS Y DIETAS	FOSFATO TOTAL mg Pi/dl	FOSFATO ORGANICO mg Pi/dl	TOTAL-ORGANICO mg Pi/dl
1 DIETA BASICA (DB)	12.4 ± 1.8 (n = 10)	9.5 ± 1.9 (n = 10)	2.9 ± 2.2 (n = 10)
2 DB + 25000 UI% retinol (DL)	9.5 ± 1.7 ^a (n = 10)	3.3 ± 1.7 ^a (n = 11)	6.3 ± 2.3 ^a (n = 10)
3 DL + 10% PKA	9.1 ± 1.9 ^a (n = 10)	6.3 ± 1.2 ^b (n = 12)	2.7 ± 2.1 ^b (n = 10)
4 DL + 15% PKA	11.2 ± 3.0 ^b (n = 10)	8.3 ± 1.9 ^b (n = 11)	2.9 ± 1.8 ^b (n = 10)

^a P<0.05 vs Grupo 1; ^b P<0.05 vs Grupo 2

Respecto al crecimiento, se observa en la Figura 1, la cual presenta las curvas de crecimiento de los cuatro grupos, que los animales que recibieron PKA (Grupos 3 y 4) exhibieron un crecimiento menor al de los animales alimentados con la dieta normal y litogénica (Grupos 1 y 2, respectivamente), pero la diferencia en peso final sólo es significativa para el grupo que recibe el mayor nivel de PKA (Grupo 4 vs Grupos 1 y 2).

Segundo Experimento.

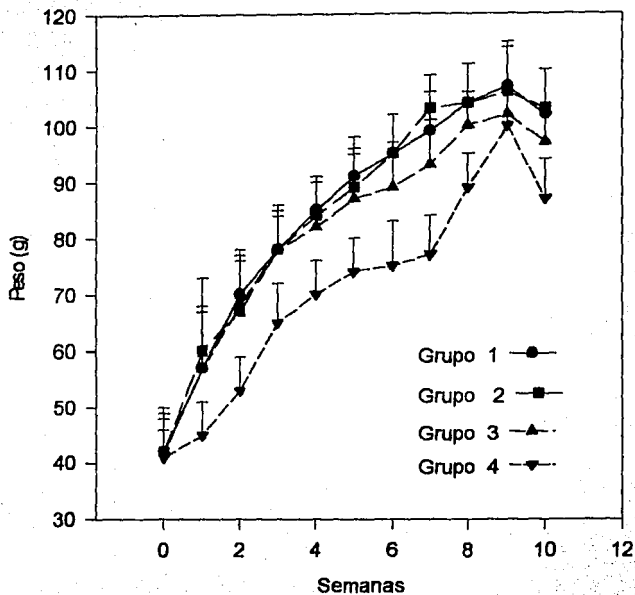
En este experimento se suministró el nivel dietético menor ensayado de PKA que protege contra la formación de cálculos, i. e. 10%; con base en este nivel se suministraron las partes proporcionales de las fracciones ricas en ácidos grasos saturados e insaturados, con el objeto de establecer sus efectos sobre la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A.

El fraccionamiento de PKA dió 70% de fracción enriquecida en ácidos grasos insaturados (PKA-I) y 30% de fracción rica en ácidos grasos saturados (PKA-S). El análisis de PKA y sus fracciones por cromatografía de gases (Tabla 7) mostró que en la fracción PKA-I se incrementó la proporción de ácido linoléico, mientras que se disminuyó la de oléico y esteárico, y carecía de palmítico; esta fracción era de apariencia similar al aceite de cártamo a temperatura ambiente. La fracción PKA-S aumentó en más de 25% su proporción de ácido oléico, asimismo aumentó el ácido esteárico, el palmítico y extrañamente también el linolénico, esta fracción tenía una apariencia de manteca a temperatura ambiente.

En relación al efecto de estas fracciones de PKA sobre la frecuencia de colelitiasis, en la Tabla 8 se puede observar que la dieta litogénica produjo, al igual que en el experimento anterior, un alto porcentaje de animales con cálculos (90%); mientras que el PKA al nivel de 10% previnó completamente la formación de cálculos. De las fracciones ensayadas, sólo la insaturada (PKA-I) protegió totalmente contra la formación de cálculos, no así la fracción saturada (PKA-S), que exhibió 70% de animales con cálculos,

FIGURA 1

Crecimiento en el Primer Experimento



diferencia que no es estadísticamente diferente del grupo con dieta litogénica (Grupo B).

TABLA 7
 COMPOSICION PORCENTUAL DE POLIFAT KA-02
 Y SUS FRACCIONES

ACIDO GRASO	PKA	PKA-I	PKA-S
Palmítico	0.6	0	0.9
Esteárico	2.7	0.5	9.3
Oleico	51.5	42.6	79.7
Linoleico	41.4	54.1	5.3
Linoléico	3.1	2.3	4.3

En cuanto al peso promedio de los cálculos éste fue mayor en el grupo con dieta litogénica (Grupo B), el cual presentó 0.600 mg/animal con cálculos, en tanto que el grupo con fracción saturada (Grupo E) promedió 0.393 mg/animal con cálculos, prácticamente 2/3 del valor del grupo litogénico.

Respecto al peso porcentual del hígado (Tabla 8), los grupos que recibieron el PKA completo y la fracción PKA-I presentaron una ligera hepatomegalia (Grupos C y D vs Grupo A), no obstante la apariencia del hígado fue normal. Los animales con la fracción PKA-S (Grupo E) tuvieron un peso porcentual del hígado mayor que los controles pero esta diferencia no fue significativa.

Por otro lado, al igual que en el experimento anterior, la concentración de vitamina A hepática en el grupo que recibió 10% de PKA fue menor que la del grupo con dieta litogénica, pero esta diferencia no fue significativa (Grupo C vs Grupo B), sin embargo, debido a la hepatomegalia la vitamina A hepática total fue mayor que la del Grupo B (Tabla 8). Los animales que recibieron PKA-I presentaron la concentración hepática de vitamina A más baja de los que se suplementaron con la vitamina (Grupo D vs Grupo B), pero la

hepatomegalia provocó que la vitamina A hepática total no fuese diferente de la de los animales con dieta litogénica. El grupo con PKA-S (Grupo E) exhibió una concentración de vitamina similar al grupo con dieta litogénica, pero la vitamina A hepática total fue significativamente superior (Grupo E vs Grupo B).

TABLA 8
FRECUCENCIA DE CALCULOS BILIARES, PESO DEL HIGADO Y
VITAMINA A HEPATICA EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO

GRUPOS Y DIETAS	ANIMALES CON CALCULOS	PESO % DEL HIGADO	VITAMINA A HEPATICA	
			µg/g híg	mg/ híg
A DIETA BASICA (DB)	0/20	2.90 ± 0.19 (n = 14)	221 ± 35 (n = 14)	0.68 ± 0.11 (n = 14)
B DB + 25.000 UI% retinol (DL)	18/20*	3.06 ± 0.32 (n = 16)	1523 ± 298* (n = 16)	4.94 ± 0.90* (n = 16)
C DL + 10% PKA	0/20*	4.85 ± 0.43** (n = 16)	1301 ± 236* (n = 16)	6.36 ± 0.10** (n = 16)
D DL + 6.6% PKA-I	0/19*	4.33 ± 0.47** (n = 16)	1107 ± 185** (n = 16)	4.71 ± 0.67** (n = 16)
E DL + 3.4% PKA-S	14/20*	3.26 ± 0.42* (n = 16)	1665 ± 285** (n = 16)	5.86 ± 0.84** (n = 16)

* P<0.05 vs A; ** P<0.05 vs B; * P<0.05 vs C y D; * P<0.05 vs C y E

Respecto al flujo biliar, en la Tabla 9 se muestra que la significativa coleresis producida por la vitamina A (Grupo B vs Grupo A), es prevenida por 10% de PKA (Grupo C vs Grupo B), confirmando el hallazgo del Primer Experimento. De las dos fracciones de PKA ensayadas sólo PKA-I (Grupo D) disminuyó la coleresis inducida por la vitamina, aunque no tan pronunciadamente como el PKA completo, diferencia que no es estadísticamente

significativa (Grupo D vs Grupo B), mientras que los animales que recibieron la dieta litogénica adicionada de la fracción PKA-S (Grupo E) exhibieron la misma coleresis que los que recibieron la dieta litogénica sola (Grupo B).

De igual manera, la concentración de lípidos biliares (Tabla 9) fue significativamente disminuida por la vitamina A (Grupo B vs Grupo A), mientras que la adición de PKA completo y de la fracción insaturada a la dieta litogénica incrementaron significativamente las concentraciones de colesterol y fosfolípidos (Grupos C y D vs Grupo B), mientras que la de sales biliares fue ligeramente aumentada por PKA y PKA-I, pero no fue estadísticamente significativa en ninguno de los dos grupos cuando se comparan con el grupo litogénico (Grupo B).

TABLA 9
FLUJO BILIAR, COLESTEROL Y SALES BILIARES
EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO

GRUPOS Y DIETAS	FLUJO BILIAR $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g hig}$	COLESTEROL mg/dl	SALES BILIARES mM	FOSFO LÍPIDOS $\text{mg Pi}/\text{dl}$
A DIETA BASICA (DB)	1.25 ± 0.32 (n = 10)	24.2 ± 5.2 (n = 10)	11.6 ± 3.8 (n = 11)	9.5 ± 3.1 (n = 12)
B DB + 25 000 UI% retinol (DL)	1.85 ± 0.48^a (n = 11)	15.4 ± 2.6^a (n = 11)	5.7 ± 1.8^a (n = 11)	2.7 ± 1.5^a (n = 12)
C DL + 10% PKA	1.21 ± 0.26^b (n = 13)	21.2 ± 4.3^b (n = 12)	7.2 ± 1.3^b (n = 14)	6.5 ± 1.7^b (n = 14)
D DL + 6.6% PKA-I	1.43 ± 0.43 (n = 11)	22.5 ± 4.4^b (n = 11)	5.9 ± 1.7^b (n = 11)	5.2 ± 1.5^b (n = 13)
E DL + 3.4% PKA-S	1.85 ± 0.44^a (n = 13)	17.9 ± 4.1^a (n = 14)	6.14 ± 2.7^a (n = 14)	3.6 ± 1.9^a (n = 12)

^a P<0.05 vs A; ^b P<0.05 vs B; ^c P<0.05 vs A y C

Por otro lado, el efecto sobre los lípidos biliares de la adición de PKA-S a la dieta litogénica (Grupo E), no fue significativamente diferente al de la dieta litogénica sola (Grupo B).

En cuanto a las concentraciones de fosfatos biliares, los resultados se muestran en la Tabla 10, en la cual se puede observar un incremento en el fosfato inorgánico en el grupo con dieta litogénica (Grupo B vs Grupo A), sin embargo, el fosfato total no es diferente del control, debido a que la concentración de fosfato orgánico (i.e. fosfolípidos, Tabla 9) disminuyen muy significativamente.

TABLA 10
FOSFATOS BILIARES Y FOSFATO INORGANICO SERICO
EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO

GRUPOS Y DIETAS	FOSFATOS BILIARES		FOSFATO SERICO mg/dl
	INORGANICO mg/dl	TOTAL mg/dl	
A DIETA BASICA (DB)	5.2 ± 1.5 (n = 12)	13.7 ± 2.5 (n = 11)	8.2 ± 1.5 (n = 13)
B DB + 25 000 UI% retinol (DL)	8.5 ± 2.0 ^a (n = 12)	13.3 ± 2.4 (n = 11)	8.7 ± 2.2 (n = 12)
C DL + 10% PKA	4.7 ± 0.8 ^b (n = 14)	13.1 ± 2.4 (n = 12)	8.8 ± 2.2 (n = 12)
D DL + 6.6% PKA-I	5.1 ± 0.9 ^b (n = 11)	11.2 ± 4.2 (n = 10)	9.7 ± 3.5 (n = 12)
E DL + 3.4% PKA-S	8.3 ± 2.1 ^c (n = 12)	12.5 ± 1.6 (n = 11)	7.8 ± 1.9 (n = 13)

^a P<0.05 vs A; ^b P<0.05 vs B; ^c P<0.05 vs A, C y D

El incremento en fosfato inorgánico fue contrarrestado por el PKA y PKA-I (Grupos C y D vs Grupo B), mientras que la fracción

PKA-S no alteró significativamente el efecto de la vitamina A. A pesar de los cambios en fosfato inorgánico biliar provocados por la vitamina A, PKA y PKA-I, la concentración sérica de fosfato inorgánico no fue significativamente diferente entre los 5 grupos.

Respecto al crecimiento, éste se observa en la Figura 2, en la cual se presentan las curvas de crecimiento de los 5 grupos; en este parámetro sólo hubo diferencia significativa al comparar el peso final del grupo que recibió PKA-I (Grupo D) con el del control (Grupo A).

DISCUSION

La hipervitaminosis A produjo un elevado porcentaje de animales con cálculos (100 y 90%, en el primero y segundo experimentos, respectivamente), confirmando los resultados previos (55). Estos cálculos pigmentarios producidos por la vitamina A no contienen colesterol, pero sí 10% de fósforo y 20% de calcio (73), muy probablemente constituyendo hidroxapatita, que es la forma en que se presentan las sales de fosfato de calcio en cálculos similares de jámster y humanos (28, 55, 74).

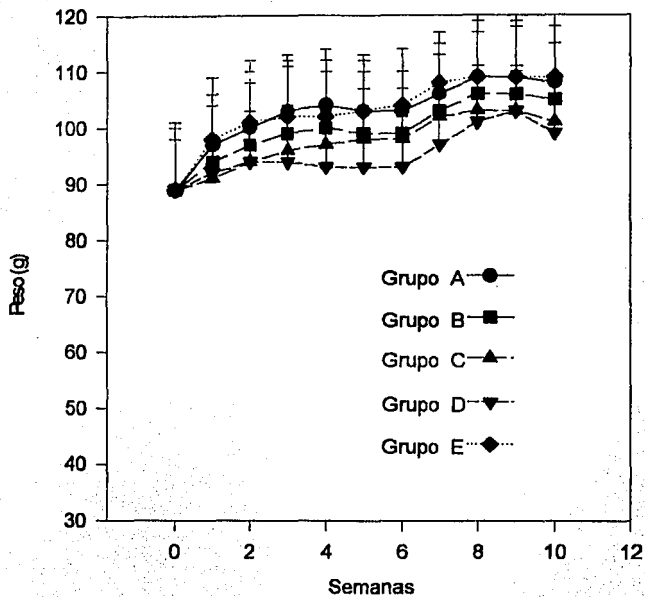
Por otro lado, esta coleditiasis pigmentaria del jámster no está asociada con alteraciones en los parámetros hematológicos que pudieran indicar hemólisis (75), lo cual ha sido publicado que ocurre en la hipervitaminosis A (76), y tampoco provoca incremento en la bilirrubina biliar (75).

En el primer experimento se ensayaron 2 niveles de PKA, demostrándose que el PKA tanto al nivel de 10% como de 15% en la dieta previene completamente la coleditiasis pigmentaria producida por la vitamina A. Es probable que niveles menores de PKA puedan prevenir la coleditiasis.

El ensayo de los 2 niveles nos permitió comparar el efecto de estos sobre parámetros hepáticos y biliares. Así, aunque ambos niveles previnieron completamente la coleditiasis, hubo varios efectos que fueron dependientes de la dosis, tales como la hepatomegalia, la concentración de vitamina A hepática, las

Figura 2

Crecimiento en el Segundo Experimento



transaminasas séricas, el flujo biliar y los lípidos biliares.

La hepatomegalia provocada por el PKA, que fue mayor con el nivel de 15%, es un signo de toxicidad, el cual probablemente sea debido a la acumulación de grasa (77), sin embargo, falta corroborar esto histológicamente. Otra indicación de alteración hepática debida al PKA, fue el hallazgo de un incremento en el nivel sérico de TGO, que aunque ligero alcanzó a ser significativo con el nivel de 15%. Por otro lado, la vitamina A sola en el nivel dietético empleado no parece ser hepatotóxica, pues no produjo alteraciones ni en el peso del hígado, ni en las enzimas séricas ensayadas.

La hepatomegalia dosis dependiente provocada por el PKA parece a su vez ser la causa de la menor concentración de vitamina A, pues la vitamina A hepática total no fue diferente en los grupos que recibieron suplemento dietético de ésta. Esto también indica que el efecto del PKA sobre la colelitiasis no se relaciona con alteraciones en la absorción y el almacenamiento de la vitamina.

En relación al flujo biliar y los lípidos biliares, la vitamina A incrementó el primero y disminuyó los segundos. Este efecto fue contrarrestado por el PKA, también de forma dosis dependiente. El incremento en el flujo biliar, junto con una disminución en las concentraciones de lípidos biliares sugiere que la vitamina A produce un incremento en el flujo biliar independiente de sales biliares.

Puesto que los cálculos pigmentarios del jámster contienen un elevado porcentaje de fosfato, en el primer experimento se determinó fosfato biliar total, el cual, contrariamente a lo esperado, se encontró ligera pero significativamente reducido en el grupo que recibió vitamina A, al compararlo con el grupo control; lo mismo ocurrió con 10% de PKA adicionado a la dieta litogénica, y solo con 15% de PKA se tuvieron concentraciones similares a las del grupo control. El fosfato total comprende al fosfato lipídico, constituido en bilis casi exclusivamente por fosfolípidos, y al fosfato no lipídico, constituido en bilis principalmente por fosfato inorgánico, y en menor grado por fosfato ligado a proteínas

y a metabolitos hidrosolubles (e.g. productos intermediarios de la glicólisis). Por lo anterior, la diferencia entre fosfato total y fosfato lipídico es una estimación indirecta del fosfato inorgánico, el cual, como se esperaba, resultó significativamente elevado en los animales que recibieron la dieta litogénica, regresando a valores normales en los que recibieron la dieta litogénica adicionada de PKA tanto al nivel de 15 como de 10%. Esto sugiere que este incremento en fosfato no lipídico es la causa o al menos una de las causas de la formación de los cálculos pigmentarios. Asimismo, el incremento en fosfato no lipídico pudo provocar el mayor flujo biliar, por aumento de la secreción independiente de sales biliares. Este tipo de coleresis provocó la dilución de las sales biliares, lo cual favorece la precipitación de fosfato de calcio y otras sales de calcio, ya que las sales biliares ayudan a mantener baja la actividad de iones de calcio (78), y el ácido glicoquenodesoxicólico inhibe *in vitro* la precipitación de hidroxapatita (79). En el segundo experimento se determinó directamente fosfato inorgánico, confirmándose el incremento de éste por la vitamina A, y contrarrestándose este efecto con 10% de PKA.

En este trabajo no se determinó la concentración de calcio biliar, debido a que en ese tiempo no se contaba en el laboratorio con un método para realizarlo. Sin embargo, en estudios subsecuentes (73), se ha encontrado que el calcio biliar se encuentra ligera (20%) pero significativamente aumentado en los jámsteres que reciben la dieta litogénica a base de vitamina A, mientras que el incremento en fosfato inorgánico es 2 y hasta 3 veces mayor que el incremento en calcio.

Acerca del origen de este incremento en fosfato biliar, podemos decir que existen varias posibilidades, a saber: el fosfato puede provenir de reabsorción ósea, la cual ha sido observada en la hipervitaminosis A (80); esta posibilidad se encuentra más o menos descartada ya que no se encontraron elevadas en el suero ni la fosfatasa alcalina ni el fosfato inorgánico, y en el estudio de este laboratorio antes mencionado (73) no se encontró ningún

incremento en la excreción urinaria de calcio y fosfato, que es la principal vía de excreción de estos electrolitos. Otras posibilidades son que se eleve la poza de fosfato inorgánico en el hígado, y/o que se incremente la actividad del transportador hepático de fosfato (81), la primera por alteraciones en el metabolismo y la segunda además de lo anterior, por reducción en la fluidez de la membrana del hepatocito provocada por la vitamina A (82). Para comprobar o excluir estas hipótesis es necesario analizar el recambio de fosfato inorgánico hepático, quizás en hígado perfundido y empleando fosfato marcado radiactivamente, asimismo, se puede estudiar la actividad del transportador in vitro. Por último, el exceso de fosfato biliar podría también deberse a hidrólisis de los fosfolípidos en el tracto biliar, debido a una mayor secreción de fosfatasa en bilis, como la fosfatasa alcalina, la cual se asocia con micelas mixtas (83). Es de hacer notar que la disminución en la concentración de fosfolípidos provocada por la vitamina A es mayor que la de sales biliares y colesterol. Esta hipótesis puede ser comprobada estudiando la actividad hidrolítica in vitro de bilis de jámsteres con dieta litogénica.

Respecto al mecanismo preventivo del PKA, como ya dijimos, este no parece estar relacionado con alteraciones en la absorción o almacenamiento de la vitamina A. Una acción antinucleante de la hidroxipatita en la bilis no es muy probable, aunque indirectamente favorece esta acción al incrementar la concentración de sales biliares. Más probable parece ser un efecto sobre la concentración de fosfato inorgánico, la cual disminuye hasta valores similares a los de los controles. Esta reducción puede ser debida a que disminuya la poza de fosfato inorgánico o la actividad del transportador de éste. Por ser un aceite rico en ácidos grasos insaturados podría aumentar la fluidez de la membrana y/o afectar la actividad del transportador. Por otra parte, el PKA podría estar afectando la secreción de fosfatasa a la bilis, a través de alteraciones en la fluidez de la membrana, reduciendo la posible hidrólisis de fosfolípidos.

Asociada con la disminución en la concentración de fosfato inorgánico producida por el PKA, se observó una reducción en la coleresis inducida por la vitamina A, y un aumento en la concentración de lípidos biliares, lo cual apoya la sugerencia de que la coleresis es del tipo independiente de sales biliares y provocada por la elevación del fosfato biliar.

En relación con el principio activo del PKA, en el Segundo experimento se hizo un primer acercamiento al problema. Siendo el PKA un destilado de ácidos grasos, liberados por hidrólisis ácida del aceite de cártamo, la primera pregunta es si el principio activo se encuentra en la fracción de ácidos grasos saturados o insaturados.

Debido a que el aceite de cártamo completo no previene la colelitiasis (63, 84), es probable que durante el proceso de elaboración se pueda producir en las dobles ligaduras un isómero trans o conjugado de los ácidos grasos, que sea el responsable de la prevención de la colelitiasis, o que simplemente el suministro de ácidos grasos libres pudiera ser la causa. Sin embargo, anteriormente en este laboratorio se ensayaron el derivado de aceite de soya, Polifat S-08, que tiene una composición similar al aceite de cártamo, aunque con menor proporción de linoléico, y el Polifat US-2, el cual contiene de 70 a 75% de ácido oléico (62). El ensayo de estos aceites en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A mostraron que ninguno de los 2 afectaban la frecuencia de animales con cálculos. Por lo que la acción preventiva parece exclusiva del PKA. En otro estudio previo, se hidrogenó el PKA intentando abolir su acción preventiva; sin embargo, el PKA hidrogenado, el cual es casi 100% ácido esteárico, previno la colelitiasis, aunque el mecanismo parece ser diferente, ya que suministrado al nivel de 15%, casi no es absorbido, produce heces muy voluminosas, disminuye el crecimiento muy significativamente y produce en la vésicula biliar unas formaciones gelatinosas, como precursoras de cálculos o cálculos que no se llegan a consolidar (63).

Por lo anterior, en el presente trabajo se buscó disminuir el

nivel empleado de PKA, y se fraccionó por cocrystalización con urea. En este método la urea al cristalizar de una solución saturada atrapa en los cristales moléculas hidrocarbonadas rectas, es decir sin o con un sólo doble enlace o con dobles enlaces en posición trans (85). Este procedimiento nos dió una fracción que denominamos saturada (PKA-S) enriquecida en ácido oléico y en menor proporción con esteárico y palmítico, y otra denominada insaturada (PKA-I), enriquecida en ácido linoléico y con menor proporción de ácido oléico. El ácido linoléico, a pesar de ser altamente insaturado, se encontró en la fracción saturada; esto quizás se deba a que durante el proceso de elaboración de PKA este ácido sufra mayor isomerización trans.

El ensayo de las fracciones obtenidas por cocrystalización sobre la colelitiasis producida por la Vitamina A mostró que sólo la insaturada tuvo un efecto protector, mientras que la saturada careció de este. La fracción insaturada produjo prácticamente los mismos efectos, arriba discutidos, sobre la frecuencia de colelitiasis y los parámetros biliares que el nivel de 10% de PKA. Por lo tanto el principio activo del PKA se encuentra asociado con la fracción insaturada, y es probable que el responsable sea el ácido linoléico o un isómero de este producido durante la elaboración del PKA. Se hace entonces necesario ensayar el efecto de este ácido graso puro sobre la colelitiasis. También es probable que se requiera de una mezcla determinada de ácidos grasos libres, la cual se logra en PKA y en la fracción insaturada de éste, por lo que se debe continuar analizando esta fracción, quizás por destilación fraccionada a baja presión o por cristalización a bajas temperaturas.

La fracción saturada no alteró significativamente los efectos producidos por la vitamina A, sin embargo, esta fracción se suministró en menor porcentaje que PKA-I. Las dosis de las fracciones saturada e insaturada del PKA adicionadas a la dieta litogénica, se establecieron con base al rendimiento que resultaba de fraccionar el Polifat KA-02. Así, de cada fraccionamiento se obtenía en promedio 2/3 de fracción insaturada y 1/3 de fracción

saturada, y puesto que el porcentaje preventivo de PKA ensayado fue de 10%, se suministró 6.6% de PKA-I (aprox. 2/3) y 3.4% de PKA-S (aprox. 1/3). Consideramos poco probable que incrementar el porcentaje de esta fracción en la dieta litogénica a 6.6% conduzca a la prevención de la colelitiasis, ya que con los porcentajes de 3.4% de PKA-S y 6.6% de PKA-I no ocurre un efecto dosis dependiente como el observado entre 15 y 10% de PKA.

Asimismo, PKA-I redujo la concentración de fosfato inorgánico a valores similares a los producidos por 10% de PKA, mientras que PKA-S prácticamente no afectó el incremento en este parámetro provocado por la vitamina A.

En relación al crecimiento, los resultados del primer experimento mostró un menor crecimiento final sólo en el grupo que recibió 15% de PKA, esta disminución es probablemente debida a un rechazo de la dieta por los animales al inicio del experimento, ya que como se puede ver en la Figura 1, fue al inicio donde el peso de estos animales disminuyó, para después mantener una curva similar del de los otros grupos, pero inferior en alrededor de 13 gramos. En el segundo experimento sólo el grupo con PKA-I mostró un crecimiento final significativamente inferior al de los otros grupos, aunque la diferencia es mínima en la décima semana, y no existía en la novena semana. No obstante, durante la mayor parte del experimento el crecimiento de este grupo fue el menor. Es probable que la fracción de PKA-I concentrara productos de oxidación del PKA y/o sufriera algo de oxidación durante la preparación de la fracción, y que estos compuestos sean los responsables de la ligera disminución del crecimiento.

CONCLUSIONES

1. La colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster dorado se asocia con un incremento en el flujo y en la concentración de fosfato inorgánico biliares, así como con una reducción en la concentración de lípidos biliares.

2. El Polifat KA-02 al nivel de 10% en la dieta previene completamente la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster dorado.

3. Al nivel de 6.6% en la dieta, la fracción del Polifat KA-02 enriquecida en ácidos grasos insaturados obtenida por cocrystalización con urea, previene totalmente la colelitiasis, no así la fracción enriquecida en ácidos grasos saturados suministrada al nivel de 3.4%.

4. Tanto el Polifat KA-02 completo como la fracción enriquecida en ácidos grasos insaturados, previenen el efecto de la vitamina A sobre la concentración biliar de fosfato inorgánico.

REFERENCIAS

1. Sherlock, S.: Diseases of the liver and biliary system. 6th ed. Blackwell Scientific Publication. Oxford, 1981.
2. Reuben, A.: Biliary proteins. Hepatology, 4:46S-50S, 1984.
3. Smith, R.L.: The excretory function of bile. Chapman & Hall. London pp 9-15, 1973.
4. Goldstein, L.I. and Schonfield, L.J.: Gallstones: Pathogenesis and medical treatment. Adv. Intern. Med., 20: 89-119, 1975.
5. Trotman, B.W. and Soloway, R.D.: Pigment gallstone disease: summary of the National Institutes of Health-International Workshop. Hepatology, 2: 879-884, 1982.
6. Ravnborg, L., Teilum, D. and Pedersen, R.: Gallbladder stones classified by chemical analysis of cholesterol content. Scand. J. Gastroenterol. 25(7): 720-724, 1990.
7. Trotman, B.W. and Soloway, R.D.: Pigment vs cholelithiasis: Clinical and epidemiological aspects. Am. J. Dig. Dis., 20:735, 1975.
8. Moreno, S.: Tratamiento médico de la colelitiasis. I Parte: Acidos biliares. Rev. Esp. Enf. Digest., 77: 159-164, 1990.
9. Méndez-Sánchez N., Jessurum J., Ponciano-Rodríguez G., Uribe M., Hernández-Avila M.: Prevalence of gallstone disease in mexican population. Dig. Dis. Sci., 38: 680, 1993.

10. Bateson, M.C., Maclean, D., Ross, P.E. and Bouchier, I.A.D.: Clofibrate therapy and gallstone induction. Dig. Dis., 23: 632-628, 1978.
11. Jorgensen, T.: Gallstones: An epidemiological investigation. Dan. Med. Bull., 37: 336-346, 1990.
12. Tanno, N., Koizumi, M. and Goto, Y.: The relationship between cholelithiasis and diabetes mellitus. Tohoku J. Exp. Med., 154: 11-20, 1988.
13. Thornton, J.R., Emmete, P.M., and Heaton, K.W.: Diet and gallstone. Gut, 24: 2, 1983.
14. Nervi, F., Covarruvas, C., Bravo, P., Velásco, N., Ulloa, N., y Cruz, F., Faba, M., Severn, C., Del Pozo, R., Antezana, C., Valdivieso, V. and Arteaga, A.: Influence of legume intake on biliary lipids and cholesterol saturation in young Chilean men. Gastroenterology, 96: 825-830, 1989.
15. Heaton, K.W.: Epidemiology of gallstones and suggested etiology. Clin. Gastroenterol., 2: 67-83, 1973.
16. Roda, E., Morselli, A.M., Sama, C., Festi, D. and Barbara, L.: Epidemiology of gallstone disease. En: Biliary lithotripsy. Ferruci, J.T., Delius, M. y Burhens, H.T. (Eds.) Eds. Publisher Inc. Chicago. pp 121-138, 1989.
17. Bennion, L. J. and Grundy, S.M.: Risk factors for the development of cholelithiasis in man. N. Engl. J. Med., 299: 1221-1227, 1978.
18. Gilat, T., Feldman, C., and Halpern, Z.: An increased familial frequency of gallstones. Gastroenterology, 84: 242-246, 1983.
19. Tyroler, H.A., Glueck, J.C.H., Christensen, B.: Plasma high density lipoprotein cholesterol comparisons in black and white population. Circulation, 62: 99-107, 1980.
20. Tandon, K.R. and Anand, C.A.: Dietary factors in the pathogenesis and management of gallstones. J. Assoc. Phys. India, 37: 337-339, 1989.
21. Paumgartner, G. and Sauerbruch, T.: Gallstones: pathogenesis. Lancet, 338: 1117-1121, 1991.
22. Cohen, E.D. and Carey, C.M.: Acyl chain unsaturation modulates distribution of lecithin molecular species between mixed micelles and vesicles in model bile. Implications for particle structure and metastable cholesterol solubilities. J. Lipid Res., 32: 1291-1302, 1991.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

23. Jünger, D., Lang, T., Huber, P., Lange, V. and Paumgartner, G.: Effect of phospholipid and bile acids on cholesterol nucleations time and vesicular micellar cholesterol in gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. J. Lipid Res. 34: 1457, 1993.
24. Booker, L.M., LaMorte, W.W., Ahrendt, A.S., Lillemue, D.K. and Pitt, A.H.: Distribution of phosphatidylcholine molecular species between mixed micelles and phospholipid-cholesterol vesicles in human gallbladder bile: dependence on acyl chain length and unsaturation. J. Lipid Res. 33: 1485-1492, 1992.
25. Hay, D. W. et al: Molecular species of lecithins in human gallbladder bile. J. Lipid Res. 34: 759, 1993.
26. Berr, F., Holl, J., Jungst, D., Fischer, S., Richter, O.W., Seifferth, B. and Paumgartner, G.: Dietary N-3 polyunsaturated fatty acids decrease biliary cholesterol saturation in gallstone disease. Hepatology, 16: 960-967, 1992.
27. Tyerney, S., Ahrendt, S.A., FoxTalbot, K., Booker, M. L., Pitt, H. A., LaMorte, W.W., Lillemo, K.D.: Fish oil reduces biliary cholesterol and prolongs nucleation of human gallbladder bile. Gastroenterology, 104: A380, 1993.
28. Crowther, S.R. and Soloway, D.R.: Pigment gallstone pathogenesis: From Man to Molecules. Seminars in liver disease, 10: 171-180, 1990.
29. Okido, M., Shimizu, S., Ostrow, J.D., and Nakayama, F.: Isolation of a calcium-regulatory protein from black pigment gallstones: Similarity with a protein from cholesterol gallstone. Hepatology, 15: 1079-1085, 1992.
30. Kestell, F.M., Sekijima, J., Lee, P.S., Park, Z.H., Long, M. and Kaler, W.E.: A calcium-binding protein in bile and gallstones. Hepatology, 16: 1315-1321, 1992.
31. Dawes, G.L. and Rege, V.R.: Secretion of biliary calcium is increased in dog with pigment gallstones. Dig. Dis. Sci., 37: 1523-1530, 1992.
32. Gleeson, D., Hood, A.K., Murphy, M.G. and Dowling, H.R.: Calcium and carbonate ion concentrations in gallbladder and hepatic bile. Gastroenterology, 102: 1707-1716, 1992.
33. Dawes, G.L. and Rege, V.R.: Calcium and calcium binding in human gallstone disease. Arch. Surg., 125: 1606-1609, 1990.
34. Rudnicki, M., Jorgensen, T. and Thode, J.: Increased activity of ionised calcium in gallbladder bile in gallstone disease. Gut, 33: 1404-1407, 1992.

35. Van Erpecum, J.K., Van Berge Henegouwen, P.G. and Stolk, J.F.: Bile acid and phospholipid fatty acid composition in bile of patients with cholesterol and pigment gallstones. Clin. Chim. Acta, 199: 295-304, 1991.
36. Ostrow, J.D.: The etiology of pigment gallstones. Hepatology, 4: 215s-222s, 1984.
37. Qiu, S.M., Soloway, D.R., and Crowther, S.R.: Interaction of bile salts with calcium hydroxyapatite: Inhibitors of apatite formation exhibit high-affinity pre-micellar binding. Hepatology, 16: 1280-1289, 1992.
38. Trotman, B.W., Berstein, S.E., Bove, K.E. and Wirt, G.D.: Studies on the pathogenesis of pigment gallstones in hemolytic anemia. J. Clin. Invest., 15: 1301-1308, 1980.
39. Fitzpatrick, W.K., Burdette, M.D., Huestis, R.R.: Cholelithiasis and spherocytosis in *Peromyscus*. Arch. Surg., 86: 897-903, 1963.
40. Pitt, H.A., Lewinski, M.A., Muller, E.L., Porter-Fink, V. and Denbesten, L.: Ileal resection-induced gallstones: altered bilirubin and cholesterol metabolism. Surgery, 96: 154-157, 1984.
41. Strichartz, S.D., Abedin, M.Z., Safarian, E.K. and Roslyn, J. J.: Pigment gallstone formation and altered ion transport. Am. J. Surg., 157: 163-167, 1989.
42. Okey, R.: Gallstone formation and intake of B vitamins in cholesterol fed guinea pigs. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 51: 349-350, 1952.
43. Wayne, W., La Monte, E.A., Brotschi, T.E., Scott and Lester, F.W.: Pigment gallstones formation in the cholesterol fed guinea pig. Hepatology, 5: 21-27, 1985.
44. Coyle, J.J., Hoyt, D.B. and Sedaghat, A.: Relationship of intestinal bypass operations and cholelithiasis. Surg. Forum, 31: 139-141, 1980.
45. Hofmann, A.F., Bokkenheuser, U.D. and Hirsh, R.L.: Experimental cholelithiasis in the rabbit induced by cholesterol feeding: effect of neomycin treatment on bile composition and gallstones formation. J. Lipid. Res., 9: 224-253, 1968.
46. Sun, P.L., Cliff, J.J., Valerie, F.C.: Oleic acid induced cholelithiasis in the rabbit: conversion of dietary oleic acid to cholestanol as a cause of calcium-bile salt gallstones. Hepatology, 7: 529-534, 1987.
47. Englert, E.: The dog diet-model of pigment gallstone formation

(abstract). Hepat. Rap. Lit. Rev., 11: 1702, 1981.

48. Dam, H.: Nutritional aspects of gallstones formation with particular reference to alimentary production of gallstones in laboratory animals. World Rev. Nutr. Diet., 11: 119-239, 1969.

49. Cohen, I. B., Setoguchi, T., Mosbach, H. E., McSherry, K. C., Stenger, J. R., Kuroki, S. and Soloway, D. R.: An animal model of pigment cholelithiasis. Amer. J. Surg., 153: 130-138, 1987.

50. Malavolti, M., Fromm, H., Ceryak, S. and Shehan, L. K.: Effects of bile acid depletion and of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acids on biliary protein secretion in the hamster. Life Sci., 46: 1727-1737, 1990.

51. Hayes, C. K., Stephan, Z. F., Pronazuk, A., Lindsey, S. and Verdon, C.: Lactose protects against estrogen-induced pigment gallstones in hamsters fed nutritionally adequate purified diets. J. Nutr., 119: 1726-1736, 1989.

52. Malet, F. P., Deng, Q. S., and Soloway, D. R.: Gallbladder mucin and cholesterol and pigment gallstone formation in hamsters. Scand. J. Gastroenterol., 24: 1055-1060, 1989.

53. Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado II. Influencia en la orquidectomía. Patología (Méx), 11: 25-32, 1972.

54. Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. VIII. Acción litogénica de la mantequilla de leche de vaca. Patología (Méx), 14: 67-72, 1976.

55. Cárdenas, R., Jaime, M. E., Guzmán, L. and Granados, H.: Gallstones in the golden hamster. XXXVI. Pigment cholelithiasis produced by retinoic acid. Arch. Invest. Méd. (Méx), 22: 209, 1991.

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

57. Granados, H. y Soriano, M.: Prevención de la colelitiasis pigmentaria por el "Polifat KA-02" en el jámster dorado. XIV Congr. Nal. Gastroenterol. México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx. 45: 327 (resumen), 1980.

58. Granados, H., Cárdenas, R. y Rodríguez, A.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXII. Acción preventiva de Gobernadora (Larrea tridentata) en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. Reun. Internac. Conmemor. 45 Aniv. Hosp. Centr. Milit., México, D.F., Rev. Sanid. Milit. (Méx), 41: 264 (resumen), 1987.

59. Granados, H., Cárdenas, R., Soriano, M. y Villa, J.: Cálculos biliares en el jámster dorado (*M. a. auratus*). XXXIV. Acción preventiva del ajo (*Allium sativum*) en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XXII Congr. Nal. Gastroenterol., Puebla, Pue., Rev. Gastroenterol. Méx., 53: 373(resumen), 1988.
60. Granados, H. y Cárdenas, R.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXIII. Acción preventiva del azul de metileno en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XXI Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx. 52: 302 (resumen), 1987.
61. Cárdenas, R., Galicia, M. A., Jaime, M.E. y Granados, H.: Cálculos biliares en el jamster dorado. XXXIX. Prevención por el hidroxitolueno butilado de la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XXIV Congr. Nal. Gastroenterol., Acapulco, Gro., Rev. Gastroenterol. Méx. 55(4): 431 (resumen), 1990.
62. Jaime, M.E., Cárdenas, R. y Granados, H.: Calculos biliares en eljamster dorado. XXXVIII. Comparación de la acción preventiva del polifat KA-02 con la de otros derivados de aceites vegetales. XXIII Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 54(4): 321(resumen), 1989.
63. Cárdenas, R., García, F., Jaime, M. E. y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado (*M. a. auratus*). XXXV. Efecto de la hidrogenación del Polifat KA-02 sobre su acción preventiva de la colelitiasis pigmentaria. Archiv. Invest. Méd. (Méx), 20: 343-348, 1989.
64. Brown, J. B. and Kolb, K.D.: Applications of low temperature crystallization in the separation of the fatty acids and their compounds. Prog. Chem. Fats and Other Lip., 3, 1995.
65. Olson, J.A.: A simple dual assay for vitamin A and carotenoids in human liver. Nutr. Rep. Internat. 19: 807, 1979.
66. Reitman, S. and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamate oxalacetate and glutamate piruvate transaminases. Amer. J. Clin. Path., 28: 56-63, 1957.
67. Bodansky, O. y Schwartz: Fosfatasa ácida y alcalina, Métodos en Investigación Médica, vol 9:79-98, 1961.
68. Bartlett, G.R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234: 466, 1959.
69. Turley, S.D., Dietschy, J. M.: Reevaluation of the 3 α hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. J. Lipid Res. 19: 924, 1978.

70. Colemah, R., Iqbal, S., Godfrey, P. and Billington, D.: Membranes and bile formation. Biochem. J. 178: 201-208, 1979.
71. R.J. and M. Henry: Clinical Chemistry. 2a. Ed. Harper and Row Publisher, New York 1974.
72. Allain, C.A., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W. and Fu, P.C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin. Chem., 20:470, 1974.
73. Cárdenas, R., Estañol, P. and Galicia M. A.: Pigment cholelithiasis induced by vitamin A and its prevention by butylated hydroxytoluene. Arch. Méd. Res., en prensa.
74. Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster alimentado con una dieta de mantenimiento. Poseyana (Cuba); 93: 1-19, 1971.
75. Cárdenas, R., Zamora, F. y Granados, H.: Cálculos biliares en el jamster dorado: XLIX. Valores hematológicos en animales con cálculos pigmentarios producidos por la vitamina A. XVIII Congr. Nal. Gastroenterol., Guadalajara, Jal., Rev. Gastroenterol. Méx., 45 (4): 319 (resumen), 1984.
76. Dingle, J. T., Glavert, A.M., Daniel, M. and Lucy, J. A.: Vitamin A and membranes of cells and intracellular particles. Biochem. J., 84:76, 1962.
77. Kuang, Ch.Ch. (Ed.). Fatty acids in foods and their health implications. Marcel Dekker Inc., New York, pp 890, 1992.
78. Moore, E.W.: The role of calcium in the pathogenesis of gallstones: electrode studies of model bile salt solutions and the biological system. Hepatology, 4: 288s, 1984.
79. Qiu, S. M., Wen, G., Hirakawa, N., Soloway, R. D., Hong, N. K. and Crowther, R. S.: Glycochenodeoxycholic acid inhibits calcium phosphate precipitation in vitro by preventing the transformation of amorphous calcium phosphate to calcium hydroxyapatite. J. Clin. Invest., 88: 1265, 1991.
80. Feng Li, X., Hughes, D. B., Hopkins, R., Russell, M. R., Jee, S. S., Bankson, D. and Jian Li X.: The effects of chronic vitamin A excess on bone remodeling in aged rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1991: 103-107, 1989.
81. Ghishan, K. F., Rebeiz, R., Honda, T. and Nakagawa, N: Characterization and expression of a novel Na-inorganic phosphate transporter at the liver plasma membrane of the rat. Gastroenterology, 105: 519-526, 1993.

82. Kim, C.H., Leo, M.A., Lowe, N., Lieber, C.H.S.: Effect of vitamin A and ethanol on liver plasma membrane fluidity. Hepatology, 8: 735-41, 1988.

83. Accatino, L., Pizarro, M., Solis, N., Koenig, C.S.: Características de la asociación de ectoenzimas de la membrana canalicular de los hepatocitos con micelas mixtas y estructuras lipídicas de la bilis humana. Rev. Gastroenterol. Méx. 59: 110, 1994.

84. Granados, H. y Soriano, M.: Potencialización por algunos aceites vegetales de la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jamster dorado. XV Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F. Rev. Gastroenterol. Méx., 46: 275 (resumen), 1981.

85. Murray, K.E.: Low pressure fractional distillation and its use in the investigation of lipids. Prog. Chem. Fats and Other Lip., 3: 244-271, 1955.