

9
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE GOBERNADORA (*Larrea tridentata*)
SOBRE LA COLELITIASIS DE COLESTEROL EN EL
HAMSTER DORADO (*Mesocricetus auratus*).**

T E S I S

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

SILVIA ARTEAGA HERNANDEZ

DIRECTOR: RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVÓNIMA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Efecto de Gobernadora (Larrea tridentata) sobre la colelitiasis de colesterol en el Hámster Dorado (Mesocricetus auratus).

realizado por Silvia Arteaga Hernández

con número de cuenta 8824209-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
Propietario	M. en C. Segundo Morán Villota
Propietario	M. en C. Armando Gómez Campos
Suplente	Dra. Alejandra Mainero del Paso
Suplente	M.V.Z. Mario Javier Soriano Bautista

René de Jesús Cárdenas Vázquez
Excmo. honorario V.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



Consejo Departamental de Biología

F. A.
M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ

DEPARTAMENTO
DE BILOGIA

A mis padres

y

a Carlos

Agradecimientos

Quisiera dar a conocer la ayuda de algunas personas a quienes quedo especialmente agradecida. Al Dr. René Cárdenas por supuesto, por brindarme la oportunidad, sus conocimientos su paciencia y su valiosa dirección. También a la Biol. Perla Estañol por su ayuda y compañerismo, así como a la Biol. Rocío Bernal. Al personal a cargo del Bioterio de la Facultad de Ciencias por su colaboración, a la M. en C. Abigail Aguilar del Herbario del Centro Médico S.XXI por su ayuda con la parte taxonómica y etnobotánica, a la Biol. Josefina Herrera del laboratorio de Química de esta Facultad por la parte fitoquímica, así como a todas las personas que gentilmente participaron en la encuesta, a todos gracias por su colaboración. Asimismo, agradezco al M. en C. Armando Gómez, al M. en C. Segundo Morán, al M. V. Z. Mario Soriano y a la Dra. Alejandra Mainero, las sugerencias para mejorar el trabajo. Finalmente a la Biol. Verónica Cruz por su siempre valiosa amistad y por todo su apoyo, gracias.

CONTENIDO

1 Resumen	3
2 Introducción	4
3 Antecedentes	6
3.1 Colesterol	6
3.1.1 Biosíntesis	6
3.1.2 Metabolismo	8
3.2. Colelitiasis	21
3.2.1 Clasificación de los cálculos biliares	22
3.2.2 Colelitiasis de colesterol	23
3.2.3 Patogénesis	25
3.2.4 Tratamiento	29
3.2.5 Colelitiasis del hámster	32
3.3 Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>)	38
3.3.1 Clasificación	38
3.3.2 Descripción	39
3.3.3 Distribución geográfica	40
3.3.4 Fitoquímica	42
3.3.5 Usos	46
4 Objetivos	49
4.1.1 General	49
4.2.2 Particulares	49
5 Materiales y Métodos	50
5.1.1 Obtención de la planta y encuesta	50
5.1.2 Preparación de extractos	50
5.1.3 Pruebas químicas del extracto alcohólico	51
5.1.4 Animales	52

5.1.5 Dietas	52
5.1.4 Diseño experimental	53
5.1.5 Análisis de muestras	55
5.1.6 Análisis estadístico	59
6 Resultados	60
6.1 Encuesta sobre Gobernadora	60
6.2 Efecto de los extractos de Gobernadora en la colitis de colesterol del hámster	63
7 Discusión	69
8 Conclusiones	75
9 Apéndice	76
10 Referencias	77

RESUMEN

En el presente trabajo se muestran los resultados de un experimento en el que se utilizó el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), como modelo para estudiar el efecto de dos extractos de Gobernadora (alcohólico y acuoso), sobre la colelitiasis de colesterol. Los extractos fueron adicionados al 0.5 y 1.0% respectivamente a una dieta litogénica libre de grasas y alta en glucosa, administrada durante 62 días experimentales. Los resultados mostraron que con la dieta litogénica sola 75% de los animales presentaron colelitiasis (9/12), mientras que en el grupo que recibió la misma dieta adicionada de 0.5% de extracto alcohólico la frecuencia de cálculos (1/9) disminuyó significativamente. Por otra parte, en el grupo con el extracto acuoso se encontraron cálculos en 8 de un total de 12 hámsteres. La bilis de los hámsteres con dieta litogénica mostró una elevada concentración de colesterol respecto del grupo control, pero no hubo diferencias significativas en las concentraciones de sales biliares y fosfolípidos. El efecto preventivo del extracto alcohólico se asoció con un porcentaje molar de colesterol significativamente inferior al del grupo con dieta litogénica, pues aunque las concentraciones de lípidos biliares no fueron significativamente diferentes entre ellos, en el grupo con extracto alcohólico la concentración de colesterol tendió a bajar y las de sales biliares y fosfolípidos a subir. Por otra parte, ambos extractos redujeron el colesterol sérico. La prevención de la colelitiasis por el extracto alcohólico de Gobernadora probablemente se deba a su contenido de ácido nordihidroguayarático (NDGA), un potente antioxidante. Dentro del mismo estudio se realizaron encuestas en diferentes mercados de la ciudad de México, acerca del uso de la planta medicinal, al parecer el uso predominante es contra la esterilidad, se mencionó su empleo también en enfermedades reumáticas, para aliviar las enfermedades renales, dolor e inflamación principalmente. Con menor frecuencia mencionaron el padecimiento de nuestro interés, la colelitiasis. En cuanto al uso, coincidieron en tomar el hervor de un puño de hojas y talluelos en un litro de agua y tomarlo en ayuno, como agua de uso común o tres tazas al día. Los principales lugares de abastecimiento son San Luis Potosí y Zacatecas. En la respuesta específica de su empleo para cálculos biliares más del 50% respondió afirmativamente.

2 INTRODUCCION

La litiasis biliar en nuestro país es una enfermedad común. Se ha reportado una prevalencia de 14.3% en la población, siendo más frecuente en el sexo femenino que en el masculino (Méndez, 1993). Además de que los costos para el sector salud por tratamiento de esta enfermedad son elevados.

Actualmente existen grandes progresos en el área de la investigación biomédica acerca de la fisiología y el tratamiento de la coleditiasis, sin embargo, aún falta por conocer el mecanismo exacto por el que se genera. Respecto a su tratamiento existen varios métodos, que son generalmente invasivos, además de costosos.

El presente trabajo es una contribución en las investigaciones relacionadas con el tratamiento de la litiasis biliar, particularmente en el tratamiento con medicina tradicional. Sin duda es una opción menos usual, al menos dentro del área médico-quirúrgica, pero que justamente sugiere otra alternativa de estudio, pese al gran debate que existe, no sólo en esta enfermedad, respecto a la utilización de plantas medicinales en la terapéutica.

Desde hace tiempo se conoce a la Gobernadora por poseer diversas propiedades curativas contra varias enfermedades, entre las cuales se incluye, el tratamiento de los cálculos biliares y renales (Díaz, 1976). En un estudio previo de este Laboratorio se encontró que esta planta previene la coleditiasis pigmentaria del hámster, sin embargo, puesto que más del 85% de los pacientes presentan cálculos de colesterol, se decidió poner a prueba a la Gobernadora en la prevención de este tipo de coleditiasis.

En este trabajo existe una vinculación experimental-etnobotánica que permite indagar de una manera diferente los conocimientos de la medicina tradicional tan importante en nuestro país, lo cual puede enriquecer nuestros puntos de vista sobre la investigación biomédica y a la vez rescatar de alguna manera estos conocimientos. Considero que la investigación biomédica no debería concebirse aislada del contexto biológico y cultural. Por tal motivo se consideró de importancia entablar comunicación con personas familiarizadas de éstos conocimientos médico-etnobotánicos, para obtener información y considerarla dentro de la investigación.

La presentación de este trabajo está organizada de la siguiente manera: inicialmente se tratan los principales aspectos de la biosíntesis y metabolismo del colesterol. Posteriormente se hace mención de la fisiopatología de la colelitiasis humana y del hámster, en el cual se han utilizando diferentes dietas para inducir la colelitiasis. Después se presenta la sección experimental que incluye la metodología seguida para las diferentes partes del estudio, los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y las conclusiones de este estudio.

Los resultados obtenidos señalan que la Gobernadora podría ser una buena opción para el tratamiento de los cálculos biliares de colesterol. Sin embargo, se requieren de más estudios para localizar el principio(s) activo y analizar su farmacología, con el objetivo de obtener un compuesto eficiente y seguro para el tratamiento de la colelitiasis, y que por su condición natural sería renovable y de bajo costo, que además daría una mayor utilidad a esta abundante planta de México.

Este trabajo está como todos susceptible a la crítica, a ampliarse y enriquecerse con nuevas aportaciones teóricas y prácticas que permitan continuar con el proceso de investigación a fin de obtener resultados más fecundos para la biología experimental y la medicina conjuntamente.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección del Dr. René Cárdenas Vázquez.

El presente trabajo fue presentado en el Congreso Nacional de Gastroenterología (Arteaga *et al.* 1995) y parcialmente en el Segundo Congreso Nacional de Etnobiología (Arteaga *et al.* 1996).

3 ANTECEDENTES

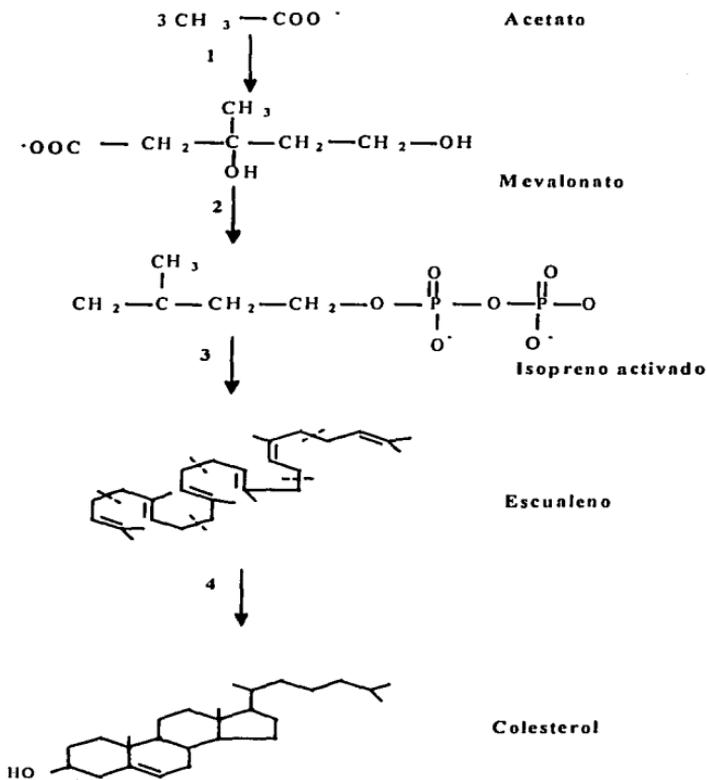
3.1 Colesterol

3.1.1 Biosíntesis

El colesterol es el lípido más conocido de la naturaleza, por el hecho de estar asociado a enfermedades humanas, especialmente las cardiovasculares. Por otro lado juega un papel crítico en la estructura de membranas celulares y además es materia prima para la síntesis de hormonas esteroideas y ácidos biliares. La mayoría de los animales sintetizan suficiente colesterol, sin embargo, muchos insectos y el cefalópodo *Sepia* son incapaces de sintetizar suficiente, por lo que requieren un esteroide dietético, generalmente colesterol (Prosser, 1973). En los vertebrados todos los tejidos pueden sintetizarlo a partir del acetato. La síntesis en los diferentes tejidos varía mucho, siendo el hígado y el intestino los sitios más importantes (Boyd, 1975). La síntesis está influenciada por el transporte de colesterol, la entrada a las células mediante receptores y el que se consume en la dieta.

En el proceso de formación del colesterol a partir de Acetil-CoA se pueden reconocer cuatro etapas, las cuales consisten a su vez de varias reacciones enzimáticas (Fig. 1). En la primera etapa tres unidades de acetato se condensan para formar un intermediario de seis carbonos, el mevalonato. La segunda involucra la conversión de mevalonato a unidades activadas de isopreno, y en la tercera se polimerizan seis unidades de isopreno para formar la cadena lineal de treinta carbonos del escualeno. Finalmente, en la cuarta etapa la ciclización del escualeno forma cuatro anillos que constituyen el núcleo de los esteroideas, además de otros cambios como oxidaciones y eliminación o migración de grupos metil, que llevan al producto final, el colesterol (Lehninger, 1993-b). El paso limitante en la síntesis del colesterol es la reducción irreversible del beta-hidroxi-beta-metilglutaril-CoA a mevalonato, por medio de la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa.

Figura 1. Biosíntesis del colesterol.



3.1.2 Metabolismo

i) Digestión y absorción de colesterol y lípidos de la dieta:

Las grasas de la dieta están constituidas por los triglicéridos, fosfolípidos, ésteres de colesterol y ésteres de vitaminas liposolubles, los cuales deben ser hidrolizados por esterasas a ácidos grasos, monoacil glicerol, colesterol y vitaminas libres antes de que puedan ser absorbidos por el intestino. En los adultos el proceso de digestión de grasas es muy eficiente y la hidrólisis de triglicéridos es realizada casi completamente en el intestino delgado por lipasa pancreática, la de fosfolípidos por fosfolipasa A2, la de ésteres de colesterol por colesterol éster hidrolasa y la de otros lípidos por otras esterasas, todas de origen pancreático.

La digestión proteolítica en el estómago sirve para liberar lípidos de las partículas alimenticias donde están generalmente asociadas con proteínas como complejas lipoproteínas. La mezcla de aceite y agua que entra al intestino proveniente del estómago es modificada por la bilis y el jugo pancreático. La bilis suministra sales biliares, las cuales en el hombre son principalmente los ácidos cólico y quenodesoxicólico formados a partir del colesterol en el hígado, y el desoxicólico formado a partir de ácido cólico por bacterias intestinales (Gurr and Harwood, 1991). Estas sales biliares, las cuales se encuentran conjugadas con glicina y taurina, son detergentes que permiten la emulsificación de las grasas. El jugo pancreático aporta, como ya dijimos, enzimas que catalizan la hidrólisis de ácidos grasos de triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol. La lipasa pancreática ataca moléculas de triglicéridos, en la superficie de las partículas de la emulsión, pero antes de la lipólisis la enzima debe ser activada por la colipasa en la superficie de la partícula, para permitir la interacción. Así, sales biliares, colipasa y lipasa pancreática interactúan en un complejo ternario, el cual también contiene iones de calcio que son necesarios para la actividad lipolítica completa.

Como progreso de la digestión, las grandes partículas de la emulsión disminuyen de tamaño y pasan a agregados moleculares llamados micelas mixtas. Los principales

componentes son monoglicéridos, lisofosfolípidos, colesterol, vitaminas liposolubles y ácidos grasos, los cuales dejan la superficie de las partículas lipídicas para ser incorporadas a micelas. Las sales biliares son responsables de la formación de micelas. La presencia de sales biliares permite incorporar a las micelas moléculas no polares muy insolubles como el colesterol y las vitaminas liposolubles, ayudando a su absorción.

El primer paso en la absorción de grasas es pasar del lumen intestinal al interior del enterocito, por difusión simple. La absorción de lípidos en el hombre ocurre principalmente en el yeyuno. Los principales tipos moleculares que pasan a través del borde piloso de la membrana del enterocito son los monoglicéridos y ácidos grasos no esterificados de cadena larga. Las sales biliares por sí mismas no son absorbidas en el duodeno, pero pasan al íleon donde son absorbidas y recirculadas por la sangre portal hacia el hígado y a la bilis para regresar al duodeno, lo cual se denomina como circulación enterohepática.

Los productos absorbidos son re-esterificados en los enterocitos. Para que exista una buena absorción en los enterocitos es esencial mantener un gradiente de difusión interno de productos de lipólisis. Los ácidos grasos entran a la célula, se unen a la proteína Z, y luego viene la re-esterificación de ácidos grasos absorbidos a monoacilglicerol y monoacilfosfatidilcolina para dar triglicéridos y fosfolípidos. Los ácidos grasos primero se activan a ésteres formando acil-CoA.

La absorción de colesterol es más lenta y menos completa que la de otros lípidos, cerca de la mitad del que se absorbe, es perdido durante la descamación de las células. La mayoría de la porción absorbida es esterificada vía la reacción reversa de la colesterol esterasa o por la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT). Esta última enzima es inducida por altas concentraciones de colesterol dietético.

Durante la absorción de grasas, la actividad biosintética del enterocito es dedicada a empaquetar los lípidos absorbidos y re-esterificados en una forma estabilizada para su transporte en el medio acuoso de la sangre. El retículo endoplásmico rugoso es el sitio de síntesis de partículas con fosfolípidos y apolipoproteínas, las cuales dan la cubierta, que estabiliza las gotas de lípidos conteniendo también colesterol y

triglicéridos. Estas partículas incrementan su tamaño y se fusionan en el aparato de Golgi para constituir los quilomicrones, que pasan al espacio extracelular por exocitosis, llegan al ducto linfático del villus y vía linfática desembocan a la circulación sanguínea a la altura del conducto linfático torácico.

Los quilomicrones son la principal ruta para el transporte de ácidos grasos de cadena larga, mientras que los de cadena media (menos de 12 carbonos) y corta son absorbidos en forma no esterificada pasando directamente a la sangre portal y son metabolizados por beta-oxidación en el hígado.

ii) Transporte en el plasma

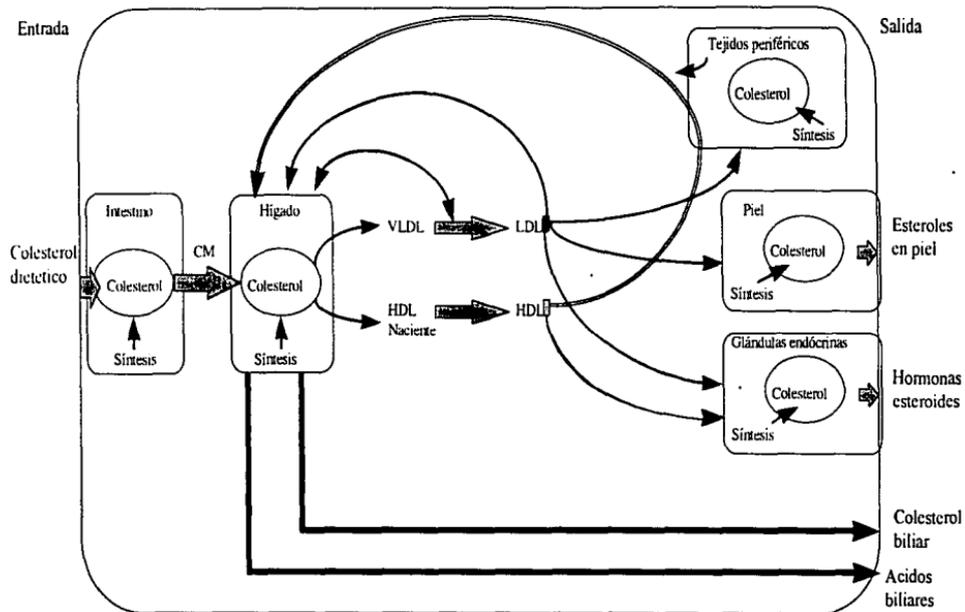
El colesterol y otros lípidos se transportan en el medio acuoso del plasma sanguíneo con una cubierta de compuestos anfífilos: proteínas y fosfolípidos, que constituyen las lipoproteínas que difieren en su composición química, propiedades físicas y funciones metabólicas, pero su papel común es el de transportar lípidos entre los tejidos para el necesario suministro e intercambio entre diferentes células. Las lipoproteínas varían en la proporción de proteínas y lípidos de la partícula, así como en las proporciones de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol esterificado y no esterificado, además presentan un alto grado de organización estructural. La composición influye en la densidad de las partículas, y hay una fuerte relación entre la función biológica y la densidad que tienen. Las lipoproteínas se han clasificado de acuerdo a su densidad en quilomicrones: lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL). La porción proteica de las lipoproteínas realiza dos principales funciones, por un lado dan un medio de solubilización a las partículas de lípido y mantienen su integridad estructural, por otro son importantes para identificar la lipoproteína y dirigir su metabolismo hacia vías específicas, interaccionando con receptores específicos de la superficie celular presentes en las células del parénquima de muchos órganos (Havel, 1986).

Como ya se mencionó, el colesterol dietético junto con el endógeno que ha sido secretado en bilis y otras secreciones, es absorbido y mezclado con una poza adicional de colesterol que ha sido sintetizado localmente, para ser esterificado e incorporado a

las partículas de quilomicrones nacientes (Stange, 1985). Los quilomicrones son las lipoproteínas más grandes y de menor densidad y su función es transportar lípidos de origen exógeno. Sus principales componentes son triglicéridos, pequeñas cantidades de fosfolípidos y proteínas, suficientes para cubrir la superficie. El núcleo lipídico también contiene, además de ésteres de colesterol, sustancias liposolubles absorbidas con las grasas dietéticas, como las vitaminas A, E y K, así como carotenoides y posiblemente contaminantes ambientales tales como trazas de pesticidas. Las proteínas son apoproteínas A-I y B-48 (Davidson, 1987), y una vez que entran a la linfa adquieren apo E y C por la interacción con HDL (Imazumi, 1978), lo que impide su captación por el hígado, así mismo contienen apo C-II, que activa la enzima lipoprotein lipasa (LPL) que hidroliza muchos de los triglicéridos del núcleo, liberando grandes cantidades de ácidos grasos libres que se metabolizan o almacenan en los tejidos adyacentes. Al mismo tiempo pierde componentes superficiales como colesterol no esterificado, fosfolípidos y apo A y C (Fielding, 1978). Debido a la disminución en la proporción de apo C y E, estos remanentes de quilomicrones son reconocidos por el hígado y eliminados de la circulación (Havel, 1980). De esta manera los triglicéridos absorbidos de la dieta llegan al tejido muscular y adiposo, mientras el colesterol de la dieta y la bilis es captado por el hígado (Fig. 2).

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), como los quilomicrones contienen predominantemente triglicéridos y colesterol, pero de origen endógeno, y su función es transportarlos del hígado hacia los tejidos. También contienen fosfolípidos y proteínas específicas. El principal sitio de síntesis de VLDL es el hígado, aunque algunas son producidas en los enterocitos. La partícula VLDL se origina en el retículo endoplásmico liso y adquiere fosfolípidos y apoproteínas del retículo endoplásmico rugoso. A diferencia de los quilomicrones nacientes, que adquieren apoC y apoE sólo en el plasma, las VLDL reciben su complemento completo de apoproteínas B-100, C y E en el hepatocito o el enterocito (Turley y Dietschy, 1988). Los triglicéridos acarreados por VLDL son hidrolizados por LPL, quedando solo remanentes (o IDL, i.e. lipoproteínas de densidad intermedia) que absorbe el hígado, sin embargo, las IDL

Figura 2. Principales pasos en la absorción, síntesis, transporte y excreción de colesterol entre diferentes compartimentos del cuerpo.



pueden ser metabolizadas todavía más, quedándoles solo apoproteína B y la mayor parte del colesterol, convirtiéndose así en lipoproteínas de baja densidad (Faergeman, 1975). Así, las LDL son derivadas de las VLDL por una serie de pasos degradativos que eliminan triglicéridos, resultando una serie de partículas que contienen una progresivamente más baja proporción de triglicéridos y correspondientemente más rica en colesterol y fosfolípidos, además de conservar apoB, que es importante en el reconocimiento de LDL por la célula, pues esta debe interactuar con receptores en la superficie de la célula antes que la partícula de LDL pueda ser internalizada y metabolizada. Dependiendo de la especie, una proporción variable de colesterol derivada de la poza de colesterol hepático incorporado a VLDL termina circulando en el plasma como fracción de LDL, ésta proporción depende de la cantidad de VLDL que se esté sintetizando o por la fracción de esta última que es convertida en LDL. Datos recientes sugieren que este proceso puede determinar el contenido de apo E en las VLDL sintetizadas (Yamada, 1986). En el hombre una gran proporción de VLDL es metabolizado a LDL (Havel, 1986). Las LDL contienen solo apo B-100, y muchos tejidos tienen receptores de LDL reconociendo apo B y/o E (Basu, 1978), captándolas por endocitosis para sus necesidades metabólicas. Una vez formado el complejo receptor-LDL es internalizado por endocitosis y sus partes componentes degradadas por enzimas lisosomales. Los receptores LDL están regulados de acuerdo a la cantidad de LDL que llega. Normalmente, una alta concentración de LDL plasmático disminuye el número de receptores, mismos que se incrementan bajo condiciones en las que LDL son reducidas. Además de este proceso que constituye cerca del 65% de la captación, existe un mecanismo independiente de receptores para la captación de LDL a los tejidos, aunque es menos eficiente y hasta ahora es pobremente entendido. Las LDL son las principales acarreadoras de colesterol plasmático en el hombre, aunque este no es el caso para todas las especies de mamíferos. En el hámster las LDL son excepcionalmente ricas en triglicéridos (32%), con el colesterol plasmático distribuido igualmente entre alfa-(HDL) y β -(LDL, VLDL) lipoproteínas (Hoosier, 1987). Recientemente se ha publicado que alrededor del 70% del colesterol plasmático se encuentra en HDL (Zhang, *et al.* 1994). Cada

partícula de lipoproteína contiene la misma masa de apoproteína B, pero cada una difiere con respecto a la cantidad de lípido unido.

Dentro de las células, los ésteres de colesterol son hidrolizados por colesteryl éster hidrolasa. La incorporación de colesterol a la membrana de retículo endoplásmico sirve para inhibir la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), la enzima limitante en la biosíntesis de colesterol. (Ginsberg, 1977). De esta manera un abundante suministro de colesterol plasmático es capaz de suprimir su biosíntesis endógena y asegurar que cantidades excesivas no se acumulen. La importancia de esta vía de homeostásis del colesterol es resaltada en la hipercolesterolemia familiar, una enfermedad en la cual hay un defecto genético que resulta en la escasez de receptores LDL e implica enfermedades vasculares.

Una de las funciones principales de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), es llevar el excedente de colesterol no esterificado, que se encuentre en los tejidos periféricos y lipoproteínas plasmáticas, hacia el hígado para metabolizarlo, entre otras cosas para la síntesis de ácidos biliares. Las HDL se sintetizan en el hígado, las cuales son discoidales y contienen principalmente colesterol no esterificado, fosfolípidos y apo A-I y E (Green, 1978).

Al salir del hígado y entrar al plasma sanguíneo, las HDL adquieren componentes superficiales adicionales: fosfolípidos, colesterol y apoproteínas por transferencia de quilomicrones y VLDL durante su catabolismo por la enzima lipoproteína lipasa. En el plasma, una subfracción de HDL que contiene apoA1 y apoD (ésta última, única de HDL; Gurr, 1991), se asocia específicamente con la enzima lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), que es sintetizada en el hígado y secretada al plasma con la función de esterificar con un ácido graso de fosfatidilcolina al colesterol libre que se encuentre en la superficie de HDL, los cuales se transfieren al centro de la partícula; esta redistribución de lípidos en las HDL discoidales las convierte en esféricas y maduras. Las moléculas de colesterol y de ésteres de colesterol se intercambian fácilmente entre lipoproteínas plasmáticas y entre lipoproteínas y membranas celulares. Este cambio es frecuentemente mediado por proteínas de transferencia (proteínas que transfieren ésteres de colesterol) similares a las proteínas que transfieren fosfolípidos.

LCAT, por consumo de colesterol, promueve su transporte neto de células no hepáticas y de otras lipoproteínas hacia las HDL (Gurr, 1991).

Los mecanismos de eliminación de HDL plasmático son complejos, puede ser que aquellas que contengan gran cantidad de apo E se unan a receptores hepáticos de LDL y a otros tejidos como glándulas adrenales, ovarios y testículos utilizándolo como sustrato para hormonas esteroides (Andersen, 1978). Sin embargo, la principal vía es la transferencia de fracciones a otras lipoproteínas, como ésteres de colesterol a LDL y VLDL (Nestel, 1979). (Fig.3).

De esta manera el hígado tiene al menos tres fuentes de colesterol: 1. Colesterol dietético, biliar y sintetizado en el intestino, que llega en quilomicrones, 2. Colesterol sintetizado en otros tejidos acarreado por HDL, LDL o VLDL y 3. Síntesis hepática de colesterol. (Fig. 4). Este colesterol hepático tiene varios destinos: 1) Síntesis y secreción de lipoproteínas, 2) Secreción de colesterol a la bilis y 3) Síntesis de ácidos biliares, secretados a la bilis. Salvo ciertas condiciones fisiológicas, asociadas a estados específicos de enfermedad, ante alguna variación en la absorción o producción del colesterol, es posible asumir que la poza metabólicamente activa de colesterol permanece esencialmente constante (Turley y Dietschy, 1988).

iii) Excreción biliar de colesterol

La cantidad de colesterol libre en las membranas intrahepáticas no puede ser muy alto, por lo que el acúmulo de colesterol debe evitarse, esto se logra por varios mecanismos: empleándolo para la síntesis de ácidos biliares, mediante la secreción del colesterol en las VLDL, una vez que ha sido esterificado por la enzima acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT), y por secreción de colesterol libre en la bilis. Asimismo, una pequeña parte del colesterol hepático es almacenado como gotas de ésteres de colesterol (Turley, 1982).

La secreción biliar de colesterol bajo condiciones normales, parece depender principalmente de la actividad de ACAT y de la secreción de VLDL, más que de la síntesis de ácidos biliares o de la captación de colesterol por el hepatocito (Nervi,

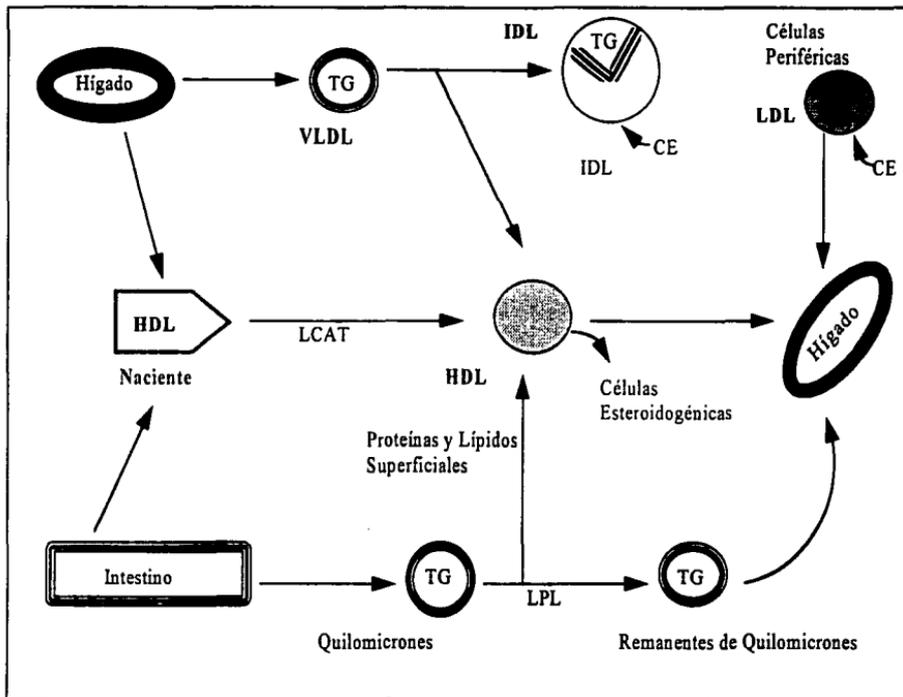


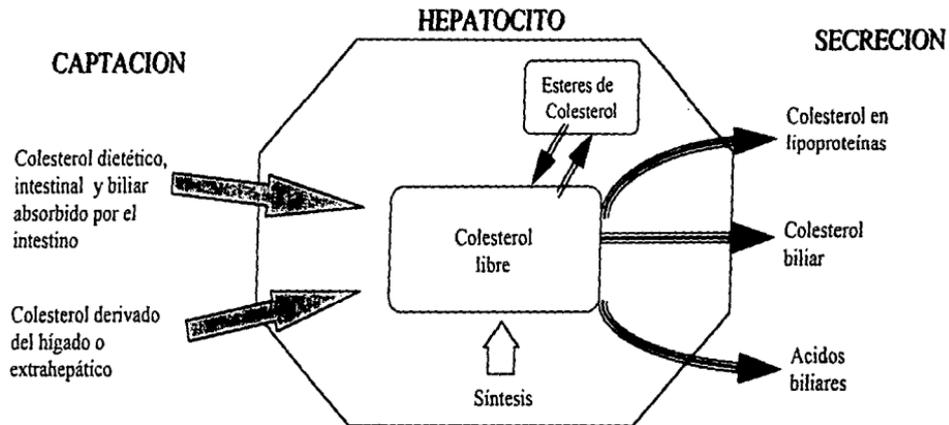
Figura 3. Metabolismo de Lipoproteínas

1984). Estudios en ratas han mostrado que la estimulación de la secreción de VLDL por fructosa en la dieta, disminuye la secreción de colesterol en la bilis, sin embargo cuando se suministra la resina colestípol, el cual liga y elimina los ácidos biliares en el intestino, estimulando así su síntesis, la secreción de colesterol se mantiene constante, asimismo, el aumento en la secreción biliar de colesterol provocado por la diosgenina, es contrarrestado estimulando la secreción de VLDL con la fructosa (Nervi, 1988). Esto también parece indicar que existen dos compartimentos de colesterol libre, uno para la síntesis de sales biliares y otro para la secreción de VLDL y colesterol biliar.

Las aportaciones de colesterol al hígado tienden a elevar el colesterol libre hepático, pero normalmente no parecen afectar de manera importante la secreción biliar de colesterol, excepto bajo ciertas circunstancias. Inicialmente se pensó que la síntesis excesiva de colesterol era la causa de una mayor secreción biliar de éste, pues pacientes con colelitiasis mostraban bilis sobresaturada y una elevada actividad de HMG-CoA reductasa (Salen, 1975). Posteriormente se comprobó que la contribución de la síntesis *de novo* de colesterol a la secreción de este lipido es solo del 10 al 20% (Robins, 1985). Turley y Dietschy (1979) demostraron en la rata, que no existe necesariamente una relación entre los dos parámetros. Sin embargo, en la obesidad parece ser que la secreción de colesterol está aumentada por una mayor síntesis del colesterol (Angelin, 1982). Asimismo, el hámster, en el cual se producen cálculos de colesterol por medio de una dieta rica en carbohidratos refinados y sin ácidos grasos esenciales, la actividad de HMG-CoA reductasa hepática se encuentra muy elevada, lo cual se asocia con un aumento de 7 veces en la secreción biliar de colesterol, sin embargo, solo el 4.8% de ese colesterol es del recién sintetizado (Spady, *et al.* 1983).

Respecto al colesterol dietético transportado al hígado por los remanentes de quilomicrones, no hay evidencia concluyente de que sea el que directamente regula la secreción biliar de colesterol (Dam, 1971-a; DenBesten, 1973). En varios modelos animales de colelitiasis, la formación de cálculos se logra por un alto nivel dietético de colesterol, lo cual produce una bilis sobresaturada (Cárdenas, 1991-a). Los resultados

Figura 4. Fuentes hepáticas de colesterol



de estos modelos son difíciles de interpretar, pues las dietas exceden por mucho los niveles normales de colesterol. Así, a menos que se suministren excesivas cantidades de colesterol en la dieta, el hígado puede compensar completamente un incremento dietético de éste por suprimir su síntesis o aumentar su catabolismo, sintetizando sales biliares (Turley, 1982), dicha conversión de colesterol a sales biliares está limitada por la enzima 7-alfa-hidroxilasa (Ginsberg, 1977).

La captación hepática de lipoproteínas es una fuente importante de colesterol para el hígado; sin embargo, no se conoce con exactitud la proporción de colesterol biliar que estas aportan. No obstante, durante el ayuno deben ser la principal fuente de colesterol biliar, pues bajo esta circunstancia la secreción de colesterol se mantiene normal, a pesar de que la síntesis y absorción de colesterol están suprimidas o muy reducidas. Así mismo, durante el ayuno hay un descenso en el colesterol plasmático, lo cual sugiere una mayor utilización del colesterol de lipoproteínas para la secreción biliar (Turley, 1979).

Se han propuesto dos modelos para explicar el transporte de colesterol desde el retículo endoplásmico hasta el canaliculo biliar (Marzolo, 1990). En ambos modelos se postula la formación, en el retículo endoplásmico, de vesículas unilamelares ricas en colesterol, las cuales son precursoras de los lípidos biliares (colesterol y fosfolípidos). En el primer modelo denominado de fusión y brote, estas vesículas son transportadas directamente o a través del aparato de Golgi hasta la membrana canalicular, con la cual se fusionan, para después brotar hacia el canaliculo. El segundo modelo es el de exocitosis, en el cual las vesículas son transportadas en vacuolas originadas en el aparato de Golgi, y por exocitosis pasan al canaliculo.

Por otra parte, existe un efecto inductor o disparador por ácidos biliares de la secreción biliar de colesterol no esterificado y fosfolípidos, es decir, que a mayor secreción biliar de sales biliares se produce una mayor secreción de colesterol y fosfolípidos. Esta inducción se da después de la secreción de los ácidos biliares al canaliculo biliar (hipótesis intracanalicular), y no en el hepatocito (hipótesis intracelular) (Verkade, *et al.* 1995). De acuerdo a la hipótesis intracanalicular, una vez secretados hacia el canaliculo las sales biliares interaccionan con vesículas para formar

micelas mixtas o con la membrana canalicular, favoreciendo de cualquier manera la secreción de colesterol y fosfolípidos. Asimismo, se ha observado que ciertos ácidos biliares sulfatados y ciertos aniones orgánicos inhiben la secreción biliar de fosfolípidos y colesterol, sin afectar la secreción de ácidos biliares. El grado de inhibición correlaciona con su concentración biliar, y solo aniones orgánicos relativamente hidrofílicos tienen la capacidad de desacoplar la secreción de lípidos biliares de la secreción de sales biliares, al parecer por medio de una interacción con las sales biliares en el canaliculo (Kuipers, 1987). El mecanismo de transporte y secreción de estas vesículas hacia el canaliculo no ha sido establecido, sin embargo, se ha publicado sobre una proteína canalicular denominada *mdr2* en ratón, la cual es esencial para la secreción de fosfolípidos biliares, pero no para la de ácidos biliares (Smith, *et al.* 1993). Se cree que esta proteína es una translocasa de fosfolípidos de la parte interna a la externa de la membrana canalicular, lo cual es esencial para que se de una evaginación de la membrana que permita la fusión y brote o la exocitosis. Los ratones homocigos para una mutación del gen de *mdr2* no secretan ni fosfolípidos ni colesterol en la bilis.

De la interacción en el canaliculo biliar de las vesículas de fosfolípidos y colesterol con las sales biliares se formarán micelas mixtas, constituidas por colesterol, sales biliares y fosfolípidos, donde las partes hidrofóbicas de las moléculas se colocan hacia el interior y las hidrofílicas hacia el exterior. De esta manera se mantiene al colesterol en "solución".

Estudios *in vitro* demostraron que en soluciones modelo de bilis diluidas con altas concentraciones de colesterol (i.e., sobresaturada), el colesterol es solubilizado en vesículas unilamelares de fosfolípidos, en vez de micelas mixtas esféricas o discoidales, sugiriendo que estas vesículas podrían participar como acarreadores de colesterol biliar en bilis sobresaturada (Mazer, 1983). La presencia de vesículas unilamelares de 40 a 120 nm de diámetro fue posteriormente demostrada en bilis hepática humana y de rata por medio de filtración en gel y ultracentrifugación (Sömjen, 1985), apoyando todo esto las teorías mencionadas sobre la secreción de colesterol.

3.2 COLELITIASIS

La colelitiasis es una enfermedad en la cual se produce uno o varios cuerpos duros en la vesícula biliar o en las vías biliares intra o extrahepáticas, por precipitación de una sustancia normalmente presente en la bilis, la cual aumenta su concentración relativa y 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 biliares puede pasar inadvertida durante muchos años, inclusive toda la vida, denominándose éstos como cálculos asintomáticos (Attili *et al.* 1995); 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 hasta gangrena y perforación de la vesícula, o causar empiema; la obstrucción del cístico puede también causar daño a la vesícula debido a la bilis retenida. Asimismo, el carcinoma de vesícula se encuentra generalmente asociado a cálculos biliares y colecistitis. (Sherlock, 1981).

La composición de la bilis es 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.

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. La bilis secretada por el hígado se denomina hepática y contiene de 1 a 4% de sólidos, mientras que la almacenada en la vesícula se denomina vesicular y contiene 5 a 16% de sólidos. (Smith, 1973). Los sólidos de la bilis son principalmente lípidos, pigmentos biliares, proteínas y electrolitos. Los lípidos están constituidos por sales biliares (0.6 a 2.4 mg/dl en bilis hepática), principalmente tauro y glico conjugados de ácidos cólico y quenodesoxicólico, lecitina (100 a 575 mg/dl) y colesterol (120 mg/dl). La bilirrubina es el principal pigmento biliar (20 a 200 mg/dl), la cual se encuentra di y mono conjugada con ácido glucurónico. Las proteínas (2 a 500 mg/dl) están representadas por proteínas plasmáticas, que se encuentran en muy bajos porcentajes

respecto a su concentración en 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 (Reuben, 1984).

Los principales aniones inorgánicos son bicarbonato y cloro, y los cationes sodio, potasio y calcio; también se encuentran pequeñas cantidades de hierro y cobre. En general las concentraciones de electrolitos en la bilis hepática son similares o ligeramente inferiores a las del plasma. Además de los componentes señalados, en la bilis también se presentan numerosos metabolitos de sustancias endógenas, tales como hormonas esteroideas, y tiroideas, vitaminas A y D, cianocobalamina y porfirinas, así como exógenas, tales como antibióticos, colorantes y otras drogas. (Smith, 1973). La composición de la bilis es por lo tanto muy variable, sin embargo, la bilis cuya composición favorezca la formación de cálculos biliares se denomina bilis litogénica. Así pues, la función de la bilis es dual, por un lado lleva sales biliares que son necesarias para una buena digestión y absorción de los lípidos de la dieta, y por otro es un vehículo de excreción de sustancias endógenas y exógenas.

3.2.1 Clasificación de los cálculos biliares:

Los cálculos biliares se clasifican de acuerdo a su composición química; de esta manera se distinguen tres tipos principales de cálculos (Sherlock 1981, Trotman 1982):

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 nodulada; miden en el hombre 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 con 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 Oriente, 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 bicarbonato 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 en ausencia de infección biliar. Se asocian con 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 en el hombre. El componente principal es una sal de calcio que no es bilirrubina, la cual puede ser de ácidos grasos. En todos los tipos de cálculos la matriz de éstos está constituida por mucina.

3.2.2 Colelitiasis de colesterol:

La colelitiasis de colesterol, dentro de la cual se incluye la mixta, es mucho más frecuente en el mundo occidental que en Oriente y África. Los países con las más elevadas frecuencias de este tipo de colelitiasis son Chile y Suecia, en donde el 33 y 20% de la población, respectivamente, presentan cálculos de colesterol (Roda *et al.* 1989). En E.U. se ha estimado que cerca de 20 millones de personas padecen

colecistitis, y de estas aproximadamente 70% presentan cálculos de colesterol (Heaton, 1973; Trotman, 1975). En los países orientales la colecistitis pigmentaria es más frecuente que la de colesterol, sin embargo, la occidentalización de las costumbres, como ocurre en las zonas urbanas del Japón, provocan un incremento en la colecistitis de colesterol y una disminución de la pigmentaria. Por el contrario, África está casi exenta de colecistitis (Heaton, 1973). Para Latinoamérica hemos señalado la alta frecuencia en Chile; en un estudio en Bolivia se encontraron sólo cálculos de colesterol en un alto porcentaje (Soloway, 1977). En México, un estudio reciente señala que 14.3% de la población presenta cálculos biliares, de los cuales, más de la mitad se presentan en mujeres (Méndez *et al.* 1993), y en cuanto a su composición, se conoce que más del 85% de cálculos son de colesterol puros y mixtos (Méndez *et al.* 1995).

La frecuencia de colecistitis es influida por varios factores, tales como la dieta, edad, sexo, obesidad, herencia, raza, clase social y varias asociaciones clínicas como la hipertrigliceridemia, terapia con estrógenos, multiparidad, anticonceptivos orales, etc. (Diehl, 1991).

Las dietas hipercalóricas, altas en carbohidratos refinados, colesterol y ácidos grasos de cadena corta como las grasas animales se han asociado con una mayor frecuencia de colecistitis (Thornton, 1983; Dam, 1969). La fibra dietética también es importante para mantener una bilis menos saturada de colesterol (Kritchewsky, 1988). Se ha encontrado que dietas ricas en leguminosas (frijol y lentejas) aumentan la litogenicidad de la bilis y disminuyen la secreción de fosfolípidos biliares, pero al mismo tiempo tienen un efecto hipocolesterolémico (Nervi, 1989). Más recientemente, se observó con una dieta de frijol y glucosa que a pesar del aumento en la concentración de colesterol no se formaron cálculos (Cárdenas *et al.* 1995). De tal modo es evidente que la dieta puede ser un factor en el desarrollo de la colecistitis. Por otro lado, el ayuno se ha asociado con un aumento en la litogenicidad de la bilis por aumento de la secreción de colesterol relativa a ácidos biliares, así como la disminución de la secreción de fosfolípidos (Goldstein, 1975). Los ácidos grasos

saturados e insaturados de la dieta afectan la secreción biliar de colesterol y la coleditiasis.

Los cálculos de colesterol se presentan en todas las edades, sin embargo, son mucho mas frecuentes en la década de los cuarentas (Heaton, 1973), siendo las mujeres mas propensas que los hombres a desarrollar coleditiasis a cualquier edad (Méndez *et al.* 1993), especialmente con antecedentes de embarazo (Roda, 1989) o uso de anticonceptivos orales (Bennion, 1978).

La raza afecta la frecuencia de coleditiasis, así, las poblaciones de indios americanos, tales como Pima, Chipewa y Navajos presentan una altísima frecuencia de coleditiasis (48.6%) (Goldstein, 1975). En Estados Unidos, la población méxico-americana presenta una prevalencia de coleditiasis intermedia entre los indios americanos y la población anglosajona (Hanis, 1985), mientras que la raza negra es la menos susceptible a la coleditiasis (Tyroler, 1980), lo cual concuerda con la baja frecuencia de coleditiasis encontrada en Africa (Heaton, 1973).

La obesidad se asocia con mayor frecuencia de coleditiasis. Se ha correlacionado el colesterol biliar con el grado de obesidad; asimismo, la síntesis de colesterol es proporcional al peso corporal (Goldstein, 1975). Por otro lado se presenta un alto riesgo de formar cálculos con una rápida reducción de peso por medios dietéticos (Broomfield, 1988). Otras enfermedades que se asocian con mayor frecuencia de coleditiasis de colesterol son la pancreatitis y la diabetes, (Sherlock, 1981; Tanno, 1988).

3.2.3 Patogénesis

La patogénesis de la coleditiasis de colesterol es indudablemente multifactorial; en la que participan eventos hepáticos y vesiculares, puesto que la vesícula es el sitio más común de formación del cálculo. Diferencias en los efectores de la cristalización tales como varias proteínas pronucleantes, o proteínas inhibitoras y el grado de sobresaturación del colesterol biliar. La producción de una bilis sobresaturada de

colesterol es el principal requisito para la precipitación de éste y su consolidación en la vesícula; esta saturación puede ser debida a una secreción excesiva o a una reducción de sales biliares y fosfolípidos (Carey, 1984; Hoffmann, 1988; Holzbach, 1985), los cuales mantienen el colesterol en solución.

Las diferentes sales biliares tienen distinto efecto sobre la cantidad de colesterol secretado, siendo más efectivas las más hidrofóbicas, que son las más detergentes (Bilhartz, 1988). No obstante, bajo diferentes circunstancias puede haber tanto una disminución en la secreción de sales biliares con una constante secreción de colesterol, o una elevada secreción de colesterol con una secreción constante de sales biliares (Stone, 1985). Una proporción significativa de pacientes con cálculos de colesterol, presentan un aumento en la secreción de colesterol y una secreción normal de sales biliares y fosfolípidos (Nilsell, 1985).

Carey y Small (1978-a) determinaron empleando soluciones modelo de bilis, la solubilidad máxima del colesterol en micelas mixtas, para un amplio intervalo de concentraciones de lípidos totales y diversas proporciones de fosfolípidos y sales biliares. Basado en estos estudios Carey (1978-b) publicó sus tablas críticas para la determinación del Índice de Saturación de Colesterol. De acuerdo a lo anterior, se observó que la bilis de pacientes con cálculos siempre se encuentra sobresaturada de colesterol. Sin embargo, el cálculo del índice de saturación de colesterol para predecir la litogenicidad de la bilis, no considera que una proporción variable de colesterol y fosfolípidos es transportado por partículas no micelares, tales como vesículas unilamelares, y por lo tanto un elevado índice (>0.8) a menudo no se encuentra asociado con colelitiasis, de hecho la presencia de bilis sobresaturada con colesterol es frecuente en sujetos sanos. No obstante de manera general los pacientes con cálculos tienen índices de saturación de colesterol más elevados que las personas sin cálculos.

En la patogénesis de los cálculos biliares de colesterol, se ha establecido que la agregación de vesículas unilamelares para formar vesículas multilamelares es importante para permitir la formación de cristales de colesterol monohidratado, que es la primera etapa en la precipitación del colesterol (Harvey, 1987; Holzbach, 1990); sin embargo, solo la agregación de vesículas sobresaturadas con el esterol (i.e., con una

elevada proporción de colesterol/fosfolípidos) permite la cristalización de éste. El cálculo biliar se forma por la adición y crecimiento de los cristales precipitados, a los cuales se les puede o no agregar sales de calcio, dando lugar a los cálculos radiopacos y radiolúcidos.

De lo anterior se desprende el concepto de tiempo de nucleación definido como el tiempo de aparición de cristales de colesterol en una muestra de bilis incubada a 37°C. La nucleación del colesterol es un complejo proceso que involucra fusión, agregación o ruptura de vesículas enriquecidas de colesterol (Harvey and Upadhy, 1995). El tiempo de nucleación, o duración de la bilis en fase metaestable, es decir, el tiempo en que se mantiene el colesterol en la bilis sin formar cristales a concentraciones relativas en las cuales normalmente lo hace, es el mejor criterio para determinar la litogenicidad de la bilis. El tiempo de nucleación es más rápido en bilis vesicular que en bilis hepática, debido a la mayor concentración de la primera (Van Erpecum *et al.* 1990). Las diferencias en el tiempo de nucleación del colesterol en la bilis vesicular entre pacientes con (1 a 5 días) y sin cálculos (más de 10 días), con la misma saturación de la bilis parece ser debida a la presencia y proporción relativa, de factores capaces tanto de inhibir como de promover la nucleación del colesterol, i.e., factores nucleantes y antinucleantes. Entre los factores que se ha demostrado inhiben la nucleación se encuentran ciertas proteínas biliares sensibles a pronasa (Holzbach, 1984-b), y más específicamente apo A-I y A-II (Kibe, 1984). También proteínas biliares de 16, 28 y 74kD ligadas por lecitinas, son capaces de unirse a cristales de colesterol, modificando su morfología e inhibiendo su crecimiento (Busch *et al.* 1993).

Entre los agentes que se sabe promueven la nucleación están la mucina (Gallinger, 1985; Levy, 1984), cuya secreción por el epitelio de la vesícula biliar se incrementa antes y durante la formación de los cálculos hasta siete veces, actuando como un nido para la formación de los cálculos (Pemsingh, 1987; Malet *et al.* 1989). Asimismo, la haptoglobina a concentraciones fisiológicas mostró ser un potente promotor de la cristalización del colesterol, el mismo efecto pero más moderado, presentó la IgM, también a concentraciones fisiológicas; pacientes con cálculos de colesterol presentan

una mayor concentración biliar de estas proteínas (Yamashita *et al.* 1995). Ciertas glicoproteínas solubles también son agentes pronucleantes (Groens, 1988; Yamashita, *et al.* 1995), así como el calcio (Kibe, 1985). Cabe mencionar que las proteínas pronucleantes se hallan principalmente en vesículas, donde pueden contribuir directamente a la formación de cristales (Lipsett, 1993; Pattinson, 1991).

Así, mientras que un prerrequisito para la nucleación de colesterol es la presencia de vesículas ricas en colesterol, su estabilidad puede en última instancia ser determinada por el balance entre la presencia o ausencia de promotores e inhibidores de la nucleación (Busch *et al.* 1995).

Otro factor que puede contribuir de manera importante a la formación de los cálculos es la deficiente función motora de la vesícula biliar. La estasis vesicular provoca la estratificación de la bilis, pues en el fondo de esta se acumula bilis más concentrada y densa que la recién llegada del hígado, asimismo se depositan sedimentos en el fondo, tales como mucoproteínas, sales de calcio, pigmentos biliares, células epiteliales descamadas, bacterias (Swidsinski *et al.* 1995) y/o residuos por reflujo intestinal (Holzbach, 1983 y 1984-a). Los hábitos sedentarios y el ayuno (Schlierf, 1981) producen una mayor estratificación y permanencia de la bilis en la vesícula biliar, lo cual ayuda en la nucleación de colesterol. Además, defectos en el vaciamiento vesicular provocan que esta bilis concentrada y los sedimentos acumulados no se evacúen, lo cual propicia la formación de cálculos. El acúmulo de sedimentos en la vesícula puede llegar a constituir un lodo biliar, que puede ser antecedente a los cálculos. Se han propuesto varios mecanismos por los cuales se ve alterada la contractilidad de la vesícula; puede ser debido a una insuficiente secreción de colecistocinina para estimular adecuadamente la contracción vesicular (Thompson, 1982), o a un reducido número o menor afinidad de los receptores vesiculares de la hormona (Fridhandler, 1983) o a una menor concentración de proteínas necesarias para la contracción (Li, 1987). La hipomotilidad de la vesícula biliar se ha encontrado en pacientes con colelitiasis (Fisher, 1982; Promeranz, 1985). En un estudio se observó el efecto colestático de una dosis alta de ácido quenodesoxicólico, dando lugar a un incremento en proteínas biliares que favorecerían la nucleación (Malavolti *et*

al. 1990). También los pacientes diabéticos, los cuales son susceptibles a la formación de cálculos, presentan un defecto de la motilidad de la vesícula (Stone, 1988). En relación con la obesidad, hay publicaciones contradictorias respecto a la motilidad vesicular y la presencia de colelitiasis (Vezina, 1990; Stone, 1992). Sin embargo, la alta susceptibilidad en la formación de cálculos encontrada en obesos, durante una rápida reducción de peso por medio de dietas bajas en calorías, puede ser facilitada por una estimulación disminuida del vaciamiento vesicular observado en estas condiciones, además del aumento en la secreción biliar de colesterol (Schlierf, 1981).

3.2.4 Tratamiento

Actualmente se emplean diversos tratamientos para la litiasis biliar; sin embargo, el tratamiento quirúrgico por colecistectomía sigue siendo el más empleado, debido a su baja morbimortalidad y a que es un tratamiento casi siempre definitivo. Sus inconvenientes son, que es un procedimiento invasivo mayor, en el que hay riesgo, aunque bajo, de una lesión iatrogénica de las vías biliares, se realiza bajo anestesia general, provoca días de incapacidad y tiene un costo elevado para el paciente. A la técnica clásica se han sumado dos variantes como son la colecistectomía por mini laparotomía y por laparoscopia, procedimientos que mejoran las cifras de morbimortalidad, con menores molestias postoperatorias para el paciente, mas rápida recuperación y breve estancia hospitalaria (Frimberger, 1989). Recientemente se ha publicado que la colecistectomía se asocia con riesgo de cáncer del colon, dado que se incrementa la formación de ácidos biliares secundarios por bacterias intestinales, especialmente de DCA (Kullak-Ublick *et al.* 1995).

En el tratamiento de la coledocolitiasis con alto riesgo quirúrgico y en los cálculos residuales después de colecistectomía, la esfinterotomía endoscópica es el tratamiento de elección (Dowsett, 1988).

En la búsqueda de tratamientos no invasivos, se ha empleado la disolución de los cálculos por medio de ácidos biliares y de solventes orgánicos. Más recientemente, la fragmentación por medio de ondas de choque extracorpóreas (litotripsia) de los cálculos permite que éstos sean evacuados directamente o más fácilmente disueltos (Sackmann, 1988).

Los ácidos biliares empleados para disolver cálculos son el ácido quenodesoxicólico y su 7-beta epímero y el ácido ursodesoxicólico principalmente. Con la administración de ácidos biliares se busca aumentar la proporción de sales biliares y disminuir la de colesterol en la bilis, para conseguir la solubilización del exceso de colesterol presente en el cálculo. El primero en utilizarse fue el ácido quenodesoxicólico (Danzinger *et al.* 1972), el cual es un ácido biliar primario que constituye entre el 20 y el 30% de las sales biliares en la bilis humana normal. La administración oral de quenodesoxicólico (15mg/kg/día) provoca la disminución en la secreción biliar de colesterol, (sin cambiar la secreción de ácidos biliares, y posee la capacidad de mantener una proporción casi constante de colesterol/lecitina biliar en presencia de una secreción reducida de sales biliares, como ocurre durante el ayuno, con lo cual se forma una bilis menos saturada (Einarsson, 1983). Asimismo el ácido quenodesoxicólico inhibe la HMG-CoA reductasa hepática (Coyne, 1976), sin embargo, esta inhibición no parece ser la causa de la menor secreción de colesterol. La bilis enriquecida con ácido quenodesoxicólico y no saturada de colesterol, al entrar en contacto con la superficie del cálculo, solubiliza el colesterol en micelas mixtas, en un proceso de micelación semejante al que ocurre cuando el colesterol es secretado en vesículas unilamelares (Igimi and Carey, 1981). Sin embargo, no todos los cálculos se disuelven con este tratamiento, se ha estimado que su eficacia es del 60% en cálculos radiolúcidos, además de que una vez interrumpido el tratamiento hay una elevada recurrencia de cálculos. Se ha estimado también que los cálculos de gran tamaño (mayores a 5 mm de diámetro) por tener una exposición reducida a la bilis insaturada vesicular inducida por el AQDC, no responden al tratamiento, así como los cálculos de colesterol con cubiertas calcificadas radioopacas. El tratamiento con ácido quenodesoxicólico provoca ciertos efectos nocivos, así un 25 a 30% de pacientes

desarrollan diarrea e incrementan en aproximadamente 10% el colesterol LDL, también se presenta un 30% de lesiones hepáticas, además del costo elevado del tratamiento (Sleisenger and Fordtran, 1985).

El ácido ursodesoxicólico se encuentra en muy pequeñas cantidades en la bilis humana, pero es abundante en algunas especies animales, tales como el oso y la nutria. Este ácido es más hidrofílico y menos detergente que el quenodesoxicólico, por lo que al aumentar su proporción en la bilis por administración oral (8 a 10mg/kg/día), es menos efectivo para solubilizar las grasas de la dieta, por lo que el colesterol dietético se absorbe menos; así mismo, el ácido ursodesoxicólico disminuye la secreción biliar de colesterol en mayor grado que el ácido quenodesoxicólico, en parte por ser más hidrofílico (Ward, 1984). El ursodeoxicólico disuelve los cálculos por un mecanismo diferente al quenodesoxicólico. Por ser más hidrofílico y menos detergente, el ursodeoxicólico forma micelas menos estables, las cuales al entrar en contacto con la superficie del cálculo pierden fosfolípidos sobre el cálculo. El colesterol del cálculo pasa a la capa de fosfolípidos como cristal líquido. Cuando la capa se satura con el colesterol se desprende de la superficie del cálculo y constituye vesículas unilamelares (Igimi and Carey, 1981; Park *et al.* 1984). La disolución del cálculo por el ursodeoxicólico es más rápida que con el quenodesoxicólico debido a que es mayor el área de interacción entre la capa de fosfolípidos y el cálculo, que entre éste y la micela mixta, además de que las vesículas unilamelares tienen mayor capacidad para transportar al colesterol (Roda, 1995). El ursodeoxicólico tiene también otras ventajas sobre el quenodesoxicólico, tales como no reducir la síntesis de sales biliares, que es una vía de eliminación de colesterol, además de no producir alteraciones funcionales hepáticas, ni estimular la secreción de agua en el colon, por lo que no provoca diarrea como se ha publicado con el uso de quenodesoxicólico, sin embargo, el costo es aún más elevado (Ward, 1984; Sleisenger and Fordtran, 1985).

No todos los pacientes con cálculos de colesterol pueden ser tratados con ácidos biliares para disolver cálculos. Los criterios de selección son que presente cálculos pequeños (lo cual puede ser resuelto mediante litotripsia), no calcificados y flotantes.

Asimismo, pacientes con alto riesgo quirúrgico o que rechazan la cirugía, son candidatos para este tipo de terapia. La disolución de los cálculos de colesterol también se puede lograr con el empleo de solventes orgánicos como el metil terbutil éter y el diglicérido de cadena media ácido monooc tánico, los cuales son mucho mas efectivos para disolver el colesterol, sin embargo, deben ser aplicados por medio de un cateter transhepático colocado mediante punción percutánea de la vesícula biliar o de las vías biliares (Thistle, 1989). El metil terbutil éter se emplea principalmente en coledocolitiasis, mientras que el ácido monooc tánico en la coledocolitiasis o coledocolitiasis residual. Ambos disuelven sólo cálculos de colesterol que no se encuentren calcificados.

Continuando con los ácidos biliares, se ha probado también la efectividad de algunos ácidos biliares sulfonados análogos de ácidos biliares dihidroxilados que inhiben la formación de cálculos de colesterol y reducen el nivel sérico y hepático de colesterol al agregarse a una dieta, sin embargo, no se relacionó directamente su concentración en la bilis al término de la administración (Cohen *et al.* 1993).

Lo anterior muestra que, aunque se tiene una gama de alternativas, todavía no se tiene un método ideal para el tratamiento de la coledocolitiasis, por lo que se requiere continuar investigando y evaluando mecanismos y nuevos agentes terapéuticos de tratamiento, prevención y disolución de este tipo de coledocolitiasis. Entre los padecimientos más comunes se encuentra el cólico biliar, que puede ser aislado o episódico y consiste de dolor en el hipocondrio derecho o epigastrio perdurando mas de media hora, otro es la colecistitis aguda e incluso cáncer de la vesícula biliar y muerte (Atilli *et al.* 1995). A pesar de ser muchas veces asintomática por años, la coledocolitiasis puede implicar mas importantes riesgos de los que pueden considerarse.

3.2.5 Coledocolitiasis del hámster

Debido a la importancia de conocer la etiología de la colelitiasis humana, así como el efecto de diversas sustancias y tratamientos, se han estudiado procesos fisiológicos normales y patológicos en modelos animales. Entre los modelos de colelitiasis de colesterol se encuentran el ratón albino (Alexander, 1987), la ardilla (Pemsingh *et al.* 1987), el perro de las praderas (Cohen *et al.* 1991), los primates (Holzbach, 1984-a) y por supuesto el hámster (Cárdenas, 1991-a).

El hámster dorado, *Mesocricetus auratus*. (Waterhouse, 1840) es un roedor estepario de origen Sirio. Su clasificación es la siguiente (**Cuadro 1**):

Cuadro 1.

Reino	Animal
Phylum	Vertebrados
Clase	Mamíferos
Orden	Roedores
Suborden	Miomorfos
Familia	Cricétida
Género	Mesocricetus
Especie	<i>Mesocricetus auratus</i>

(De acuerdo a Hoffman *et al.* 1968).

El hámster es de hábitos nocturnos e hibernante; nervioso y ocasionalmente agresivo, presentan canibalismo, especialmente marcado en las primeras camadas; su periodo de gestación de 16 días, es el más corto de todos los mamíferos, e igual son los primeros en madurar sexualmente, además de que nacen ya con incisivos. De modo peculiar el hámster posee en su boca, aparte de glándulas salivales, abazones ampliamente vascularizados, los que emplea especialmente para transportar o guardar comida. A diferencia de la rata, la cual es monogástrica, el hámster tiene un estómago compartimentalizado, consistiendo de un estómago anterior y un estómago glandular. El estómago anterior posee funciones y estructuras similares a las del rumen de

herbívoros. El ciego está prominentemente desarrollado y contiene una microflora que promueve la fermentación de celulosa, permitiendo la digestión de alimentos vegetales. Al igual que otros mamíferos, el hígado del hámster es el principal sitio de síntesis de lípidos (Turley *et al.* 1988), aunque también la hay en tejidos adiposos blancos y cafés (Trayhurn, 1980). Asimismo, el hámster, en comparación con la rata, sí presenta vesícula biliar, y ha resultado ser un buen modelo de coleditiásis que actualmente se emplea de manera muy frecuente; el hámster se asemeja al hombre en parámetros biliares y en el metabolismo del colesterol (Roda *et al.* 1995; Spady *et al.* 1983), más que el ratón o la rata, especialmente ésta última que manifiesta una síntesis de colesterol hepático proporcionalmente mucho mayor que el hombre (Spady and Dietsch, 1983). La bilis del hámster consiste principalmente de ácidos cólico y desoxicólico conjugados con glicina y taurina, siendo la mayor proporción de glicocolato, con menores cantidades de quenodesoxicolato y litocolato. No hay síntesis de ácido muricólico (Siegel, 1985).

En el hámster, diversas manipulaciones dietéticas han inducido la formación de cálculos tanto de colesterol como pigmentarios y mixtos. Dam y Christensen (1952) desarrollaron cálculos de colesterol con dietas libres de grasas y con carbohidratos refinados de fácil absorción, tales como glucosa o sacarosa. Esta dieta eleva la concentración biliar de colesterol y disminuye la de sales biliares, favoreciendo la precipitación del colesterol. Al administrar grasas insaturadas como aceites de soya e hígado de bacalao se disminuye la frecuencia de cálculos, pero no sucede lo mismo con grasas saturadas como la manteca de cerdo (Christensen *et al.* 1964). Cabe mencionar también que se emplean generalmente hámsters machos jóvenes, dado que hay una marcada diferencia en la síntesis de colesterol hepático con respecto a las hembras (Dam, 1969; Spady *et al.* 1983).

La dieta litogénica sin grasa y alta en glucosa también produce una deficiencia de ácidos grasos esenciales, así, la actividad de HMG-CoA reductasa se encuentra muy elevada, por lo que hay un incremento en la síntesis de colesterol por el hígado, lo cual provoca un aumento, aunque moderado, en la secreción biliar de colesterol recién sintetizado (Spady *et al.* 1983). Asimismo, con esa dieta se ha demostrado que

conforme la proporción de caseína se substituye por proteína de soya, se reduce la litogenicidad, asociándose esto con una reducción del colesterol biliar y un aumento en la proporción de sales biliares/colesterol (Kritchevsky and Klurfeld, 1983). En relación a lo anterior, se ha observado que las proteínas dietéticas afectan el colesterol LDL (Kenneth *et al.* 1995), y también que la hipercolesterolemia causada por la caseína está asociada con disminución de los receptores LDL hepáticos (Sirtori, 1995). Este efecto hipercolesterolémico se ha observado también cuando se eleva el porcentaje de proteína en la dieta, independientemente del tipo de proteína de que se trate, sin embargo, este efecto es más pronunciado con caseína que con proteína de soya (Terpstra *et al.* 1994). El aumento en el colesterol plasmático es debido al aumento del colesterol VLDL+LDL, sin cambios en el colesterol HDL. No se sabe si estas alteraciones son la causa de los cambios en la secreción de colesterol biliar.

Por otra parte, la fibra también ha sido tema de estudio en cuanto a su influencia en la composición de la bilis, la formación de cálculos, el colesterol sérico y la histología de la vesícula biliar e intestino. Las fibras dietéticas difieren en su efecto fisiológico dependiendo de su fuente, es sabido que los cereales ricos en fibra hidrosoluble, tales como el salvado de centeno, la fibra de avena, y la de soya, tienen un efecto hipocolesterolémico, mientras que aquellas abundantes en componentes insolubles en agua como por ejemplo el salvado de trigo no tienen tal efecto (Zhang *et al.* 1994). Tales alteraciones influyen el metabolismo del colesterol y ácidos biliares. Algunos componentes de fibra purificados como la celulosa y la pectina previenen la coleditiasis en el hámster (Kritchevsky *et al.* 1984). Así también se ha observado que la fibra de cebada incrementa la concentración de sales biliares en la bilis del hámster y previene la formación de cálculos (Zhang *et al.* 1990).

En experimentos realizados por otros grupos de investigadores, se encontraron diferencias entre hembras y machos en la formación de cálculos de colesterol en hámsters Sasco alimentados con una dieta semipurificada conteniendo 0.3% de colesterol y 1.2% de ácido palmítico, en machos se presentó más del 90% de coleditiasis y en hembras no (Ayyad *et al.* 1993-a). Además recientemente se demostró que la adición de andrógenos sintéticos a una dieta litogénica incrementa los

fosfolípidos y el colesterol biliar, lo cual altera la distribución de colesterol entre micelas y vesículas, aumentándolo en estas últimas, elevando así la incidencia de colelitiasis en hámsters hembras (Ayyad *et al.* 1995). En un reciente estudio se demostró en este mismo modelo la inhibición total de colelitiasis de colesterol con una dieta litogénica conteniendo 0.1% de ácido beta-muricólico, mientras que el ácido hioicólico no fue tan efectivo, apesar de que redujo más el índice de saturación biliar (Cohen, 1995-a). También se ha producido una alta incidencia de colelitiasis de colesterol (95%) agregando 1.2% de ácido palmítico a una dieta con 4% de mantequilla, caseína, harina de arroz, celulosa y 0.3% de colesterol, mientras que la misma dieta pero sustituyendo la mantequilla con aceite de olivo, de maiz o de pescado, disminuye significativamente la colelitiasis (Cohen *et al.* 1992).

Se ha reportado también que la distribución de colesterol entre vesículas y micelas es alterada por el tipo de grasas que se consuman, ya que hámsters alimentados con la dieta litogénica pero con aceite de cártamo en sustitución de 1.2% de ácido palmítico y la misma proporción de colesterol, no forman cálculos a pesar de que el índice de saturación de colesterol biliar estuvo por encima de la unidad (Cohen *et al.* 1995-B). Además en ausencia de colesterol exógeno ni hámsters Sasco ni Charles River desarrollaron cálculos, sin embargo, en la primera cepa hubo una tendencia a presentar una más alta concentración de lípidos biliares (Cohen *et al.* 1995-b).

Se ha ensayado también las grasas en esta dieta buscando reducir la incidencia de colelitiasis. La administración de grasas altas en ácido linoléico provocan que este ácido se incorpore a fosfolípidos, lo cual estabiliza al colesterol en las vesículas y retarda su nucleación, aún cuando la bilis esté saturada del mismo (Ayyad, 1993-b). En otro estudio se modificó la composición de lípidos biliares agregando fosfolípidos o sus componentes a la dieta, como la etanolamina, la cual redujo el índice de saturación del colesterol e incrementó la producción de fosfolípidos, éste último efecto también se observó con la adición de lecitina en la dieta. Estos resultados muestran que la solubilización del colesterol en la bilis es afectada por la naturaleza de los ácidos grasos y fosfolípidos biliares (Peled and Gilat, 1994).

Los cálculos pigmentarios también han sido producidos en el hámster con la dieta libre de grasa y alta en glucosa, aunque en un pequeño porcentaje, mismo que se incrementa al sustituir la glucosa con sacarosa. Se ha observado que una dieta de mantenimiento adicionada de colesterol y estrógenos produce cálculos pigmentarios, que pueden ser prevenidos con ácidos ursodeoxicólico y quenodesoxicólico (Cohen *et al.* 1987). Asimismo, se ha establecido la acción litogénica pigmentaria en el hámster, de la mantequilla de leche de vaca (Granados, 1976), de la vitamina A (Cárdenas, 1978), tanto como del acetato de retinol como de ácido retinóico (Cárdenas *et al.* 1991-b) y de carbohidratos refinados como sacarosa, glucosa y fructuosa adicionados a una dieta básica (Granados *et al.* 1979). La prevención de esta coelitis se ha logrado con el ácido dehidrocólico (Granados y Cárdenas, 1983), el derivado de aceite de cártamo Polifat KA-02 (Cárdenas *et al.* 1989), un extracto hidroalcohólico de Gobernadora (*Larrea tridentata*; Granados y Cárdenas, 1994), el ajo (*Allium sativa*; Granados *et al.* 1991), el azul de metileno (Granados y Cárdenas, 1987) y el hidroxitolueno butilado (Cárdenas *et al.* 1996).

3.3 GOBERNADORA (*Larrea tridentata*)

3.3.1 Clasificación

La familia Zygophyllaceae, a la cual pertenece Gobernadora, es una familia de más de treinta géneros y más o menos 250 especies (Jones, 1987), que se distribuyen principalmente en las regiones tropical y subtropical, aunque también muy a menudo en zonas áridas, como la misma Gobernadora. El género *Larrea* comprende a las especies *L. cuneifolia*, *L. divaricata*, *L. ameghinoi*, *L. nitida* y *L. tridentata* (Campos *et al.* 1981). La disposición y clase del tejido esclerenquimático en la nervadura media foliar y peciolo permiten la diferenciación de las especies de Gobernadora (De la Cerda, 1967). En el cuadro 2 se presenta la clasificación taxonómica de *Larrea tridentata* y en el cuadro 3 se presentan los nombres comunes dados a esta planta.

Cuadro 2. Clasificación de Gobernadora (*Larrea tridentata*)

Reino Plantae
División Magnoliophyta
Clase Magnoliopsida
Subclase Rosidae
Orden Sapindales
Familia Zygophyllaceae
Subfamilia Zygophylloideae
Género <i>Larrea</i>
Especie <i>Larrea tridentata</i> Cav.

De acuerdo a: Cronquist, 1987 y Jones, 1987.

Cuadro 3. Nombres comunes de *Larrea tridentata*.

<u>Nombres</u>	<u>Lugar</u>
'Gobernadora'	Norte de México, San Luis Potosí, Ciudad y Edo. de México.
'Falsa alcaparra'	Sonora, San Luis Potosí.
'Hediondilla'	Sonora
'Guamis'	Chihuahua, San Luis Potosí.
'Creosota bush'	Estados Unidos
'Jarilla', 'Jarilla hembra'	Argentina, Bolivia, Chile.
'Té chaparral'	Estados Unidos y Sudamérica.

3.3.2 Descripción:

La Gobernadora es un arbusto de 1 a 3, incluso 4m. de altura, muy ramificado y nudoso, con la corteza muy delgada fuertemente adherida y finas estrías longitudinales, con muchas lenticelas y grietas., con hojas estipuladas opuestas, profundamente partidas en dos lóbulos divergentes, lanceolados, encorvados, recorridos por tres a cinco nervios (Noriega, 1923). Las hojas están cortamente pecioladas con nervaduras paralelas, miden aproximadamente 1cm. Las estipulas son pequeñas, tuberculosas, rojizas y vellosas. Las hojas son brillantes por estar cubiertas de una resina, misma que se deposita sobre los órganos vegetativos, ésta es secretada por la epidermis interna glandular de las estipulas que están situadas en los nudos (De la Cerda, 1967), la resina es adhesiva, aromática y sirve de protección contra la sequia formando una cubierta impermeable que impide la pérdida de agua almacenada por la

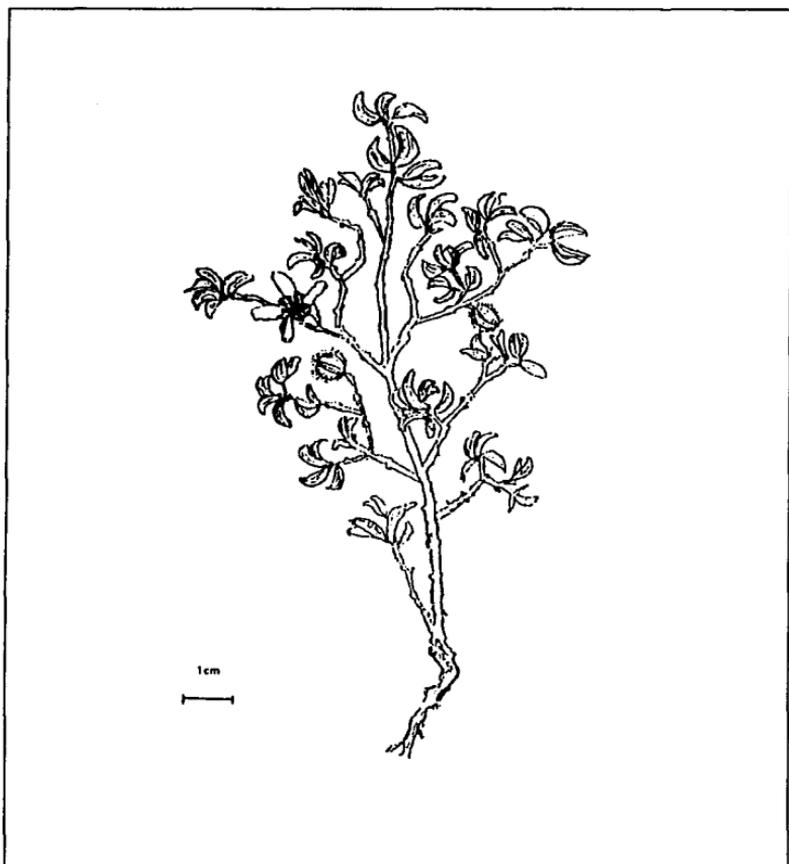
epidermis foliar y por el tejido acuífero subepidérmico del tallo, éste último, es erguido, leñoso, cilíndrico, nudoso e inermes. Las flores son solitarias, amarillas, de corto pedúnculo, con 5 pétalos caedizos imbricados, cáliz con 6 sépalos cóncavos, ovario séstil pentaloculado cubierto de pelos sedosos, hermafroditas y entomógamas. Los órganos masculinos se componen de diez estambres, cada filamento tiene una escamilla amarilla y anteras arqueadas. Su fruto es capsular piramidado, veloso, dehiscente en 5 carpelos con 5 semillas alargadas negras. Toda la planta desprende un olor penetrante y tiene un sabor amargo; es perenifolia, reteniendo muchas de sus hojas a través de la sequía, la cual soporta, al igual que las bajas temperaturas, sin sufrir daños irreparables, ya que el contenido de agua de las hojas puede bajar a menos del 50% de su peso seco, en contraste con las mesófitas leñosas, en las cuales el agua contenida por lo general fluctúa entre 100 y 300% de su peso seco. Gobernadora tienen un sistema radical muy profundo (Cronquist, 1987) Fig. 5.

3.3.3 Distribución geográfica:

De acuerdo a la clasificación de los tipos de vegetación de México (Rzedowsky, 1994), *Larrea tridentata* se encuentra ubicada, dentro del tipo Matorral xerófilo. Esta especie es una planta inermes parvifolia de reproducción espontánea, de abundancia extraordinaria en las tierras áridas mexicanas, superando cuantitativamente la existencia de agaves, euforbiáceas, yucas y *Prosopis juliflora*. En el censo de recursos forestales del desierto ocupa el primer lugar (De la Cerda, 1967). Las especies de *Larrea* se localizan hasta altitudes de 3000msnm, pero su abundancia se incrementa entre 700 y 1200msnm. Su presencia indica ausencia de alcalinidad en los suelos. Crece en terrenos áridos e infértiles para la agricultura (Rzedowski, 1994).

Esta planta es abundante en San Luis Potosí, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sonora, Zacatecas, Baja California Norte y Sur, y al suroeste de los Estados Unidos en Arizona, California, Nevada, Texas y Nuevo México asociada a bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo. (García, *et al.* 1961). Ciertos factores del medio limitan su distribución, de acuerdo a la clasificación climática de Köppen; se observó

Figura 5. *Larrea tridentata*.



que cubre casi todas las regiones de clima muy seco BW y sólo una pequeña parte de regiones de clima seco BS (García, *et al.* 1961). Fig. 6.

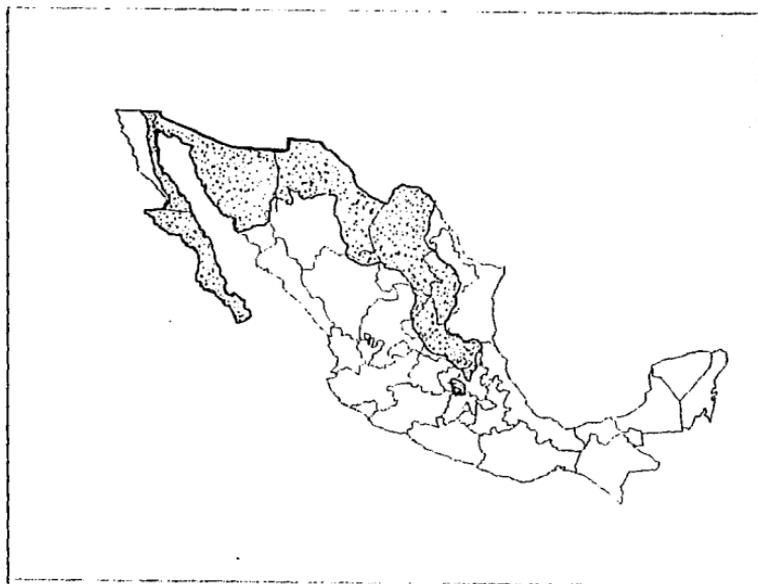
Además de su distribución en Norteamérica, se distribuye también abundantemente en las zonas de clima árido de Sudamérica, sobre todo las de Argentina y Bolivia, que poseen también una serie de elementos florísticos comunes con los de México, a pesar de la distancia actual entre ellos. Se ha propuesto que entre otras especies, *Larrea*, es de extracción sudamericana y que posee taxa vicariantes (Hunziker *et al.* 1977).

3.3.4 Fitoquímica

Larrea es una fuente notable de productos naturales con aproximadamente 50% de peso seco de las hojas de éste género como material extractable. De los cientos de compuestos conocidos producidos por los miembros de éste género más de 125 han sido caracterizados estructuralmente. La resina que cubre la superficie externa de las hojas de la planta, proporcionan 19 agluconas flavonoides, mas diversos lignanos incluyendo notablemente el antioxidante ácido nordihidroguaiarético. Algunos flavonoides glucosilados, sapogeninas, aceites esenciales, alcaloides halogénicos (INI, 1994) y ceras también han sido aisladas de la *Larrea* (Romo, 1985). Entre la mayoría de plantas de zonas áridas en el hemisferio occidental que se han investigado, las especies de *Larrea* son quizás las más diversas químicamente.

Los constituyentes volátiles de la planta tienen una variedad de funciones incluyendo la de atrayentes de polinizadores e inhibidores alelopáticos; en algunas ocasiones, estos constituyentes también sirven para ayudar a los insectos a buscar alimento y sitios de apareamiento (Mabry *et al.* 1977). *Larrea tridentata* contiene cerca de 0.1% de aceites volátiles. Usando cromatografía de gas y espectrometría de masa, 67 compuestos volátiles han sido identificados, los cuales constituyen mas de 90% de los aceites de *Larrea*. El 10% restante del aceite, es una mezcla compleja de mas de 300 constituyentes menores. Los principales grupos de los compuestos volátiles son monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, aromáticos y miscelaneos, que son cualitativamente muy similares

Figura 6. Distribución de *Larrea tridentata* en México.



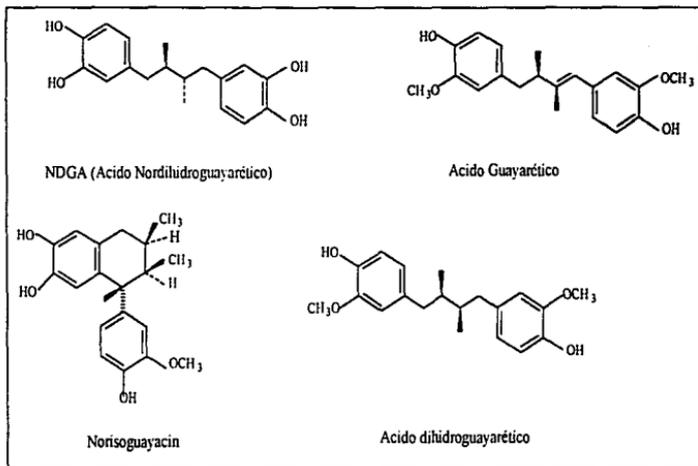
entre las especies de *Larrea* y varían entre sí solo cuantitativamente (Mabry and Bohnstedt, 1981). Aunque los productos de la vía del ácido mevalónico son predominantes (especialmente alfa y beta-pineno, calamineno, gama-eudesmol, limoneno y otros), el aceite volátil también contiene productos de ácidos grasos y de la vía del ácido shikímico. El típico olor de *Larrea* es obviamente debido a un gran número de sustancias; sin embargo, la presencia de la vinil cetona (1-hexen-3-ona, 1-hepten-3-ona y 1-octen-3-ona) y metil cetona (2-heptanona, 2-undecanona, 2-tridecanona y otros) probablemente contribuye significativamente al olor característico pues individualmente ellos reflejan aspectos del olor de la planta.

En términos de sus productos naturales, *Larrea* es más conocida por la gran cantidad del lignano ácido nordehidroguaiarético (NDGA) o dihidro-norguaiarético, que es depositado en toda la planta (Lara y Márquez, 1996) (Fig. 7.). Se encontró que entre 5 y 10% del peso seco de las hojas de *L. tridentata* consiste de NDGA. Este y otros fenoles que existen en la superficie de las hojas de la planta pueden representar una importante defensa contra herbívoros (Mabry and Bohnstedt, 1981).

El papel de la mayoría de los flavonoides en las plantas es desconocido, aunque para algunas de ellas, funciones tales como antimicrobial, propiedades de impedimento a herbívoros, protección contra radiación UV y pérdida de agua, han sido bien establecidas. En cualquier caso, las grandes cantidades de flavonoides producidos por miembros de *Larrea*, especialmente en la superficie de las hojas, sugiere que esas sustancias son importantes factores en el éxito de la especie en ambientes desérticos (Mabry *et al.* 1977).

Tres esteroides han sido identificados en *L. tridentata*: campesterol, stigmasterol y sitosterol. Además de saponinas del tipo C30 que representan menos del 1% del peso seco de esta especie, siendo el principal componente el ácido ursólico (Mabry and Bohnstedt, 1981). Se han aislado alcaloides en la corteza y raíces, pero no en las hojas y flores. (Lara y Márquez, 1996).

Figura.7 . Lignanos de *L. tridentata*.



3.3.5 Usos de *Larrea tridentata*:

1) Medicinales

Son diversos los padecimientos en los que se aplican las propiedades medicinales de la gobernadora, siendo su uso más común en aquellos que son de origen renal y ginecológico, entre otros.

Se recomienda para deshacer los cálculos renales o de vejiga, tomando como agua de uso la cocción de ramas o de toda la planta; para otros malestares renales, tales como dolor de riñón, mal de orin, cistitis y tapiadura, se administra en ayunas el cocimiento de ramas jóvenes, raíces, hojas o corteza.

Asimismo, se emplea contra la esterilidad mediante lavados vaginales con el cocimiento de las hojas o se toma el té 9 días antes y después de la menstruación por 3 meses. Como conceptivo por enfriamiento de la matriz, se dice que es efectivo un té de la mezcla de gobernadora, manzanilla y canela. Se usa también para quitar los "entuetos" y dolores menstruales. Aunque suelen usarse las raíces, ramas o corteza en cocimiento como abortivo.

De igual forma, se utiliza para las reumas el cocimiento de la planta o las ramas puestas en alcohol reposadas por un día, en frotación de la zona dolorida. No obstante se emplea para otra gran variedad de padecimientos como anemia, catarro, diabetes, dolor de cabeza y estómago, infecciones, buena cicatrización, hemorroides, mala digestión, presión sanguínea, úlcera, tos, etc. (INI, 1994).

A Gobernadora se le han atribuido propiedades antimicóticas (Barragán *et al.* 1994), antibióticas (Zamora y Mora, 1985), antiaparasitarias contra amiba y helmintos, actividades que presenta un metabolito muy abundante en las hojas de Gobernadora, el ácido nordehidroguaiarético (Mabry *et al.* 1977). Al ácido nordehidroguaiarético se le han atribuido propiedades antitumorales (Oliveto, 1972), y se empleaba como antioxidante en alimentos hasta la década de los 60's, sin embargo se prohibió su uso por el hallazgo de que inhibe numerosos sistemas enzimáticos a bajas concentraciones incluyendo peroxidasa, catalasa y etil alcohol dehidrogenasa, así como los sistemas

mitocondriales NADH-oxidasa y succinoxidasa (Timmermann, 1981). Hámsters alimentados con NDGA por largos períodos de tiempo no mostraron efectos deletorios, y fue considerado como relativamente no tóxico en pruebas agudas en rata y ratón (Oliveto, 1972). Posteriormente se alimentaron ratas con dietas adicionadas de 3% de NDGA, desarrollandose múltiples puntos negros corticales y quistes medulares en el riñón, por lo cual fue eliminado como aditivo de alimentos por la U.S. Food and Drug Administration (Timmermann, 1977). Asimismo se ha publicado que esta planta provoca el envenenamiento de borregos cuando se come durante años y se observa mayor mortandad entre los animales preñados. También se ha señalado que causa dermatitis alérgica de contacto (Mitchell y Rook, 1979).

Las tribus indias de norte y sudamérica, como los Pima lo llaman en su medicina tradicional, té chaparral y han empleado principalmente infusiones de hojas y tallucos como un emético y como cataplasmas para el dolor causado por heridas, es tomado para enfermedades venéreas, tuberculosis, constricción intestinal y usado como un antiséptico, espectorante, diurético y tratamiento para resfriados y reumatismo. También se usa como tónico para el cabello y para aliviar el dolor en neuritis ciática e inflamación del tracto respiratorio e intestinal. Las hojas secas y pulverizadas son usadas para tratar dolor, inflamación y heridas en humanos y animales domésticos. Para varicela y reumatismo se da un baño con hojas remojadas en agua (Timmerman, 1977).

La Gobernadora también ha sido aplicada contra enfermedades del hígado (Estrada, 1985). Maximino Martínez señala que el cocimiento disuelve los cálculos renales y vesicales (Martínez, 1969; Díaz, 1976). Esta misma infusión se cita recientemente contra la disuria y disolución de cálculos renales y vesicales (Lara y Márquez, 1996). En este laboratorio se demostró que la adición del extracto hidroalcohólico de hojas de Gobernadora al nivel de 4% en la dieta previene la colestiasis pigmentaria producida por vitamina A, en el hámster (Granados, 1994).

ij)No medicinales

La extracción, cristalización y uso del NDGA de Gobernadora como un antioxidante relativamente no tóxico fue patentado varias veces. Su adición a grasas en concentraciones de mas de 1% fue aprobado por Meat Inspection Division of the War Food Administration en diciembre de 1943. Sin embargo, como ya se dijo, fue posteriormente prohibido su empleo en alimentos. El NDGA es actualmente empleado como antioxidante en el almacenaje de hules naturales y sintéticos. También la resina de Gobernadora se utiliza en las áreas del hule como antioxidante. Otra aplicación de la resina es la de polímero termofijo como adhesivo para triplay y cartón comprimido, y debido a sus fuertes propiedades antimicrobianas, la resina evita la pudrición de las fibras naturales. En farmacología se ha utilizado para cubrir cápsulas, tabletas y pastillaje (De la Cerda, 1967) .

La cocción de Gobernadora ha sido empleada como desincrustante de sales calcáreas, destapacaños y quitasarrros de calderas y tuberías, así como para limpiar el cañón de los fusiles. En Estados Unidos. La resina puede utilizarse como barniz de brocha por la polimeración que presenta, y el aceite esencial se ha empleado en jabonería y cremas, por su fragancia, así como en grasas para calzado; por su contenido en tanino sirve en curtiduría (De la cerda, 1967). La planta entera ha sido empleada como material para techar casas de adobe y como leña. (Timermann, 1977).

De la gobernadora se puede obtener celulosa de calidad igualable a la de coníferas, y por ser un recurso tan abundante en los desiertos Gobernadora podría ser una buena fuente alimenticia para el ganado, similar a la alfalfa, pues contiene minerales, carotenos, aminoácidos y una buena cantidad de proteínas digestibles (16%), sin embargo se requiere eliminar las resinas y el olor (De la Cerda, 1967).

4.1.1 OBJETIVO GENERAL:

-Estudiar la utilidad de la Gobernadora (*Larrea tridentata*) en el tratamiento de los cálculos biliares de colesterol .

4.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

-Investigar el uso actual en Ciudad de México de la Gobernadora.

-Poner a prueba en el hámster dorado la posible acción preventiva de dos extractos de Gobernadora sobre la colelitiasis de colesterol.

-Determinar el efecto de los extractos de Gobernadora sobre la composición de la bilis del hámster dorado, y sobre los niveles de colesterol y triglicéridos en suero.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1.1 Obtención de la planta y encuesta:

La planta empleada para realizar los extractos, se obtuvo en el mercado de Sonora de un lote traído en noviembre de 1994 desde San Luis Potosí. Ejemplares de la especie que nos ocupa se colectaron también en San Luis Potosí, se identificaron taxonómicamente y se compararon con muestras del material que se obtuvo en el mercado para corroborar que se tratara de la misma especie, se depositaron ejemplares en los herbarios siguientes: Herbario Nacional de México del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU), con el número 534807; Herbario Institucional de Plantas Medicinales del Centro Médico S. XXI (IMSSN), con los números 11319, 11320 y 11321; Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME), con en número 048231, y Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN (ENCB).

Asimismo, para determinar la utilidad, aplicación, procedencia y otros nombres asignados a la Gobernadora en la Ciudad de México, se llevó a cabo una encuesta en los mercados de Sonora, La Merced, Coyoacán, Xochimilco y Salto del Agua, el método de encuesta-compra. Se entrevistó a 40 vendedores de plantas medicinales mediante un cuestionario previamente elaborado (**Apéndice**).

5.1.2 Preparación de extractos:

El extracto alcohólico se preparó pesando 100g de hojas y pequeños talluelos, éstos se colocaron en un matraz de 2 litros y se les agregó 1 litro de etanol absoluto, se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se filtró a vacío en papel Watman No.1 y se evaporó hasta aproximadamente 40ml. Se colocó en caja de Petri y se dejó evaporar en la estufa a 40°C durante la noche. Se obtuvieron aproximadamente entre 9 y 10g de resina de cada lote de extracto alcohólico.

Para el extracto acuoso se pesaron 100g de hojas y pequeños talluelos, que se colocaron en un matraz de 2 litros que contenía 1 litro de agua destilada hirviendo, se dejó hervir y se agitó por 10 minutos. Se pasó por un cedazo y luego por una tela

nylon fina, para que no quedaran residuos de la planta, el extracto que quedaba de aproximadamente 750ml se repartió en tres matraces kitazato de 1l, se dejó enfriar y luego se congelaron con hielo seco y acetona y se puso a liofilizar.

Tardó aproximadamente 24 horas en liofilizarse cada matraz kitazato. Se obtuvieron entre 15 y 20g de polvo.

5.1.3 Pruebas químicas en el extracto alcohólico:

Debido a la mayor efectividad del extracto etanólico en la prevención de cálculos, se decidió realizar pruebas para determinar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes como se describe:

Se pesaron 50mg de extracto alcohólico y se adicionaron 10 ml de metanol, posteriormente para corroborar el resultado se duplicó la concentración, de ambas soluciones madre se tomó 1 ml para realizar cada una de las pruebas siguientes:

-Prueba de terpenos-esteroides de Liebermann-Burchard.

Se mezclaron 1 ml de cloroformo y 1 ml de anhídrido acético a 0°C y se añadió una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se agregó 1 ml de reactivo a la solución problema. La prueba es positiva si se obtiene una coloración verde (para terpenos) o rosa (para esteroides).

-Prueba de Shinoda para flavonoides.

Se agregó un trozo de limadura de magnesio y una gota de ácido clorhídrico concentrado a la solución problema. Se observa un cambio de coloración: anaranjada, rojo-azuloso, rojo o violeta si están presentes flavonas, flavonoles, flavononas, flavanonoles o xantonas.

-Prueba de Mölish para glucósidos.

Se agregaron 2 gotas del reactivo alfa-naftol y, estratificando, 1 ml de ácido sulfúrico concentrado a la solución problema. Si la prueba es positiva se observa un anillo violeta entre las fases.

-Prueba de alcaloides con el reactivo Dragendorff.

Se evaporó 1 ml de la solución problema y se redisolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1%, se agregaron dos gotas del reactivo. La prueba es positiva si se forma un precipitado.

-Prueba de alcaloides con ácido silicotúngstico.

Esta prueba se llevó a cabo tratando la solución problema como en la anterior, y esta es positiva también si hay formación de un precipitado.

5.1.4 Animales:

En el presente estudio se emplearon hámsters dorados machos (Cepa ChCM) de 60 días de edad promedio inicial, el peso promedio fue de $90.2 \pm 0.25g$ inicialmente, los animales fueron obtenidos de la colonia que se tiene en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Los animales fueron mantenidos en baterías experimentales con jaulas de acero inoxidable con piso y frente de malla de alambre, bajo condiciones ambientales de temperatura y humedad y con un fotoperiodo de 10 h de luz y 14 h de oscuridad. Cada jaula tenía tres animales.

5.1.5 Dietas:

Como dieta básica de mantenimiento se suministró Nutricubos Purina para Roedores Pequeños de Purina S.A., México, D.F.. Los materiales para la elaboración de las dietas experimentales fueron los siguientes: caseinato de calcio de Aranz Comercial S.A., Méx., D.F., glucosa anhidra (Polidex M.A.) de Aranz, S.A., México, D.F., mezcla de minerales No 2 USP XIII y suplemento para mezcla de minerales No. 2 USP XIII de ICN Biomedicals México, Méx., D.F., vitaminas de Productos Roche S.A., México, D.F., cloruro de colina de Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo, USA.

La mezcla de vitaminas contiene por 100g de dieta, lo siguiente: biotina 0.05mg, ácido fólico 0.05mg, ácido ascórbico 5.0mg, clorhidrato de tiamina 5.0mg, riboflavina 5.0mg, clorhidrato de piridoxina 5.0mg, cianocobalamina 3.0µg, pantotenato de calcio

5.0mg, niacinamida 8.0mg, vitamina A 670 UI, vitamina D 133 UI, vitamina E 20mg, vitamina K 0.06mg, ácido p-aminobenzoico 35mg. La mezcla de minerales adicionada a las dietas estuvo compuesta por 4 partes de mezcla de minerales No 2 USP XIII y 1 parte de suplemento para mezcla de minerales No. 2 USP XIII.

En el presente estudio se empleo la Dieta litogénica de Dam, la cual contiene 20% de caseinato de calcio, 74.3% de glucosa anhidra, 5% de mezcla de minerales, 0.5% de mezcla de vitaminas y 0.2% de cloruro de colina (Dam 1969).

5.1.6 Diseño experimental:

Se realizó 1 experimento, en el cual se comparó el efecto de la dieta litogénica de Dam (1969), libre de grasas y alta en glucosa contra la misma dieta litogénica más los extractos alcohólico y acuoso cada uno por separado. Para esto se formaron 4 grupos de 12 animales cada uno y se alimentaron durante 62 días con las siguientes dietas y agua corriente *ad libitum*:

Grupo 1: Nutricubos Purina pulverizados

Grupo 2: Dieta litogénica de Dam (DL)

Grupo 3: DL con sólo 73.8% de glucosa, adicionada de 0.5% de extracto alcohólico de *Larrea tridentata*.

Grupo 4: DL con sólo 73.3% de glucosa, adicionada con 1.0% de extracto acuoso de *Larrea tridentata*.

En las dietas de los grupos 3 y 4 los extractos se agregaron en sustitución de los porcentajes de glucosa de la dieta litogénica. Para mezclar el extracto alcohólico con la dieta, se le agregaron 5ml de alcohol y se calentaron a baño maría para poder desprenderlo, en otra caja de Petri previamente pesada, se pesaron 10g de resina para cada 2 kilogramos de dicta, luego se agregó a un mortero con 50g de glucosa, se mezcló y se pasó por un cedazo, cada residuo que no pasaba se mezclaba nuevamente con más glucosa, hasta obtener por completo un polvo homogéneo con toda la glucosa correspondiente para poder mezclarla con el resto de los componentes de la

dieta. El polvo de extracto acuoso se pasó por el cedazo y se mezcló primero con la glucosa y después esta con todos los demás componentes de la dieta. El extracto acuoso se adicionó a la dieta al nivel de 1% considerando que un litro de extracto da un 2% de materia seca por liofilización, y una persona de 70kg que tome 1L de extracto por día ingeriría el equivalente a 27g de liofilizado o sea 385mg/kg de peso corporal. De acuerdo al consumo de alimento y peso de los animales del Grupo con 1% de extracto acuoso en la dieta corresponde a una dosis de 989mg extracto /kg de peso corporal, que corresponde aproximadamente al triple de la dosis calculada para el humano. Para la dosis de extracto alcohólico se considero que de hojas y talluelos de Gobernadora se obtiene la mitad de éste que del acuoso en materia seca, por lo que se dio la mitad de la dosis del acuoso, o sea 0.5% en la dieta.

A los 55 días experimentales se midió el consumo de alimento, para lo cual al medio día se colocaron 50g de las dietas correspondientes en cada jaula de los diferentes grupos, a las 24 horas se pesó el alimento sobrante.

Los animales de todos los grupos fueron pesados semanalmente para determinar sus curvas de crecimiento.

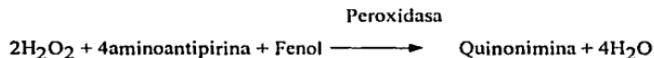
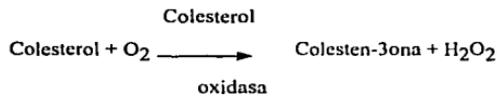
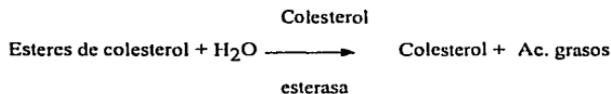
Al cabo de los periodos experimentales los animales fueron puestos en ayuno la noche anterior, pesados y anestesiados con pentobarbital (Anestesa de Smith Kline & French S.A.) inyectando intraperitonealmente la dosis de 6mg/100g de peso corporal, i.p.). A través de una incisión ventral de aproximadamente 1cm se ligó el conducto cístico y se colocó en el colédoco una cánula de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA). Se colectó bilis por 1 hora, inmediatamente después de ser canulado. La bilis se colectó en tubos Eppendorf de 2ml previamente pesados, los cuales se mantuvieron en hielo. Muestras de bilis se extrajeron el mismo día de toma de muestras para el análisis de fosfolípidos, el resto de la bilis se mantuvo a -20°C, y se analizaron en el curso de las siguientes 2 semanas para colesterol y sales biliares.

Inmediatamente después de colectada la bilis, los animales fueron anestesiados con éter, sangrados por punción cardíaca con jeringas de 3ml y agujas 25G, estas muestras de sangre se dejaron coagular por media hora a temperatura ambiente y

posteriormente fueron centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos para obtener el suero, el cual se colectó en tubos Eppendorf de 2ml, se mantuvieron en hielo y se analizó el mismo día colesterol sérico total y colesterol HDL. Aún bajo anestesia los animales fueron sacrificados por fractura de nuca y se realizaron inmediatamente las necropsias parciales (tórax y abdomen), examinándose la vesícula biliar y su contenido con microscopio estereoscópico (Zeiss, West Germany) para determinar la presencia de cálculos o cristales de colesterol. El hígado fué disecado y se registraron los pesos en una balanza analítica Mettler A30.

5.1.7 Análisis de muestras:

-Colesterol en bilis: se determinó por método enzimático con juego de reactivos Merck (Merck México S.A.), por el método Trinder, cuyo principio es el siguiente:



El colesterol se determina después de ser hidrolizado y oxidado enzimáticamente. En la oxidación se produce H_2O_2 que, en presencia de peroxidasa reacciona con 4-aminoantipirina y fenol se transforma en el cromógeno quinonimina.

La determinación se realizó así: a 100µl de bilis se les agregaron 500µl de reactivo Trinder, inmediatamente se leyó la absorbancia a 546nm en espectrofotómetro Baush & Lomb modelo Spectronic 21, se incubaron por 15 minutos a 37°C y se volvió a leer la absorbancia de las muestras. Para calcular la concentración de colesterol en la muestra la diferencia en absorbancia inicial y final se comparó con la de un estandar de colesterol de 200mg/dL tratándolo igual que a la muestra.

-Sales biliares: se determinaron enzimáticamente en el siguiente medio de incubación: 1.5ml de 0.133M Tris-HCl con 0.666M EDTA, 1ml de Sulfato de Hidrazina 1M ambos a pH 9.5, 0.3ml de 3.33mM β-NAD, 0.1ml de Deshidrogenasa 3Ó-Hidroxiesteroidea (2U/ml) para muestras (por duplicado) y 0.1ml de KHPO₄ 10mM a pH 7.2 para blancos. A este medio preparado justo antes del ensayo se agregaron 0.1ml de bilis:metanol (1:9), se mezcló y se dejaron por una hora a temperatura ambiente, al cabo de la cual se determinó la absorbancia a 340nm con lámpara de UV en un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 21. Se empleó un coeficiente de extinción mM de 6.22 para el NAD en el cálculo de la concentración de sales biliares (1mol de NAD es proporcional a 1 mol de sales biliares) (Turley and Dietschy, 1978).

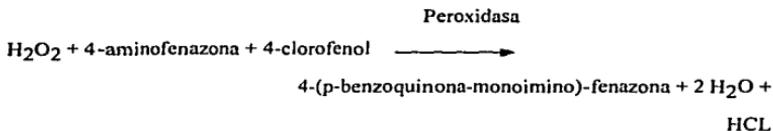
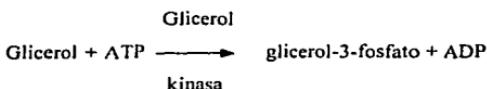
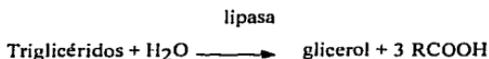
-Fosfolípidos biliares: se determinaron como fósforo orgánico de la siguiente manera: a 50µl de bilis se agregaron 0.7ml de agua y 2.1ml de CHCl₃:MeOH (2:1), se agitó en vórtex por 30 segundos y se centrifugó a 3000rpm por 5 minutos en una centrifuga Sol-Bat C300. Se colocaron 0.4ml del extracto clorofórmico por duplicado en tubos pequeño de vidrio y se evaporó el CHCl₃. Al extracto se le agregaron 0.2ml de H₂SO₄ 10N, se mantuvieron por 2 horas a 150-160°C en un baño de parafina, luego se les agregó 2 gotas de H₂O₂ y se mantuvieron por otra hora a 150-160°C. A este extracto digerido se le determinó fósforo inorgánico por el método de Fiske-Subbarow modificado por Bartlett (1959) así: al extracto digerido con 10N H₂SO₄ se le agregó 0.75ml de H₂O desionizada, 0.2ml de Molibdato de Amonio ((NH₄)₆ al 5%

$\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 0.05ml de Solución reductora (10mg de 1-amino 2-naphtol 4-sulfonic acid más 120mg de Na_2SO_3 más 600mg de Bisulfato de Sodio en 5ml de H_2O desionizada), agitando después de cada adición, luego se incubó 10 minutos en baño maría a punto de ebullición, se enfrió y se leyó la absorbancia a 700nm. Se realizó una curva patrón de fósforo inorgánico para calcular el contenido de éste en las muestras (1 mol de Pi es proporcional a 1 mol de fosfolípidos).

-Colesterol sérico total: se determinó enzimáticamente con un juego de reactivos Sigma (Sigma Diagnostics, St Louis, Mo, USA), el cual es una modificación del método de Allan, *et al.* El principio es el mismo que para colesterol en bilis, excepto que en lugar de fenol emplea p-hidroxibenzenosulfonato. Para la determinación se tomaron 10µl de suero y se le agregaron 500µl de reactivo de colesterol, se incubaron por 15 minutos a 37°C, se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 546nm. Se calculó la concentración de colesterol, comparando la absorbancia de la muestra con la de un estándar de 200mg/dl tratado igual que la muestra.

-Colesterol HDL: se determinó con Reactivo Precipitante para Colesterol HDL (Merck, S.A. de C.V., México). El fundamento de la prueba es el siguiente: la adición de ácido fosfotúngstico e iones de magnesio a la muestra de suero provoca la precipitación de los quilomicrones, VLDL y LDL. El sobrenadante de la centrifugación contiene las HDL, cuya concentración de colesterol es determinada enzimáticamente. Para la determinación se pipeteó en tubos de centrifuga 100µl de suero y 200µl de solución precipitante Merck. Se mezcló y se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó 12 minutos a 3470 rpm. Se determinó colesterol en 50µl de sobrenadante, como se hizo para colesterol en suero.

-Triglicéridos séricos: se analizaron por método enzimático con juego de reactivos Boheringer Mannheim (Triglicéridos GPO-PAP, Mannheim Alemania), que se basa en el fundamento siguiente:



Para la determinación se pipetearon 10µl de suero y se le agregó 1ml de reactivo, se incubaron por 10 minutos a 25°C, y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 546nm. La concentración de los triglicéridos se calculó multiplicando la extinción de la muestra por el factor 1040 para obtener mg de triglicéridos/dl.

-El índice litogénico de la bilis: se calculó por medio de las tablas publicadas por Carey, 1978-b). Para ello primero se calcula el porcentaje molar de colesterol en la bilis, respecto de los lípidos biliares (considerando un peso molecular para colesterol anhidro de 387, para una mezcla de sales biliares de 491 y para lecitina biliar de 775). Se calcula luego la proporción molar [Lecitina] / [sales biliares] + [lecitina], y la

concentración total de lípidos biliares en mg/dl. Todos estos parámetros afectan la capacidad de la bilis para mantener el colesterol en "solución". De las tablas se obtiene el máximo porcentaje molar de colesterol que en equilibrio puede mantener en solución la bilis con una X proporción molar de [Lecitina] / [sales biliares] + [lecitina] (denominado como N) y Y concentración total de lípidos. El índice litogénico resulta de dividir el % molar de colesterol presente en la bilis entre el obtenido de tablas.

5.1.8 Análisis estadístico:

Los resultados son expresados en promedio \pm desviación estándar y entre paréntesis se presenta el tamaño de la muestra; éstos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías y prueba de Bonferroni, con un nivel de significancia del 0.05%.

6 RESULTADOS

6.1 Encuesta sobre Gobernadora:

De las encuestas que se realizaron en los diferentes mercados de la Ciudad de México, se obtuvo la información que se presenta en el cuadro 4. En éste se encuentra la información más relevante acerca del uso de la planta medicinal en nuestra ciudad. Fue claro que el nombre común predominante es el de Gobernadora en todos los mercados, mientras que las respuestas en cuanto al uso, fueron más diversas, al parecer el uso predominante es el de contrarrestar la "frialdad de la matriz", que se relaciona con la esterilidad, en segundo término se mencionaron las enfermedades reumáticas, recomendándola igual que en el uso anterior, por la propiedad de ser una planta de tipo "caliente". A continuación se recomendó para aliviar las enfermedades renales, tales como cálculos, mismos que disolvía e iba expulsando, y contra dolor e inflamación principalmente. Con una menor frecuencia mencionaron el padecimiento de nuestro interés, e incluso cabe decir que se mencionó contra ambos tipos de coleditiasis a la vez, la renal y la vesicular, sin hacer distinción en ellas, y sólo de manera muy aislada se recomendó también para bajar los niveles de colesterol y ácido úrico.

En cuanto al manejo para su uso, coincidieron en tomar el hervor de un puño de hojas y talluelos en un litro de agua y tomarlo en ayuno, como agua de uso común o tres tazas al día, sin destacar ninguna diferencia importante en éstas formas de consumo, o bien, en el caso de dolor reumático, en general, se deja macerar la planta en alcohol por una semana y se frota. Por otro lado, los sitios de abastecimiento son en primer lugar el estado de San Luis Potosí y Zacatecas, aunque los mercados del sur como el de Coyoacán o Xochimilco se abastecen incluso del mismo mercado de Sonora, además curiosamente nombraron el estado de Guerrero como sitio de procedencia, el cual no se menciona dentro de la distribución de la planta. Finalmente, otra parte de la información importante que se obtuvo es el saber específicamente si la emplean para cálculos, ya sea biliares o renales, y más del 50% respondió afirmativamente, aunque cabe mencionar, que en pocas ocasiones se recomendó solo para cálculos renales, ya que era muy fuerte en el caso de los vesicales y podría dañar en vez de aliviar, y de ahí se derivó que era conveniente que hubiera lapsos de descanso de aproximadamente un mes, por tres de su consumo.

CUADRO 4.

1. ¿Cuáles nombres se le dan a la planta?

	Frecuencia	Porcentaje
Gobernadora	40	100
Guamis	1	2.5
Falsa alcaparra	1	2.5

2. Usos (Medicinales, industriales, otros).

	Frecuencia	Porcentaje
Enfermedades Renales y Vesiculares	15	37.5
Frialdad de la matriz	36	90
Enfermedades Renales	20	50
Inflamación	20	50
Colesterol alto	2	5
Exceso de ácido úrico	1	2.5
Enfermedades Reumáticas	28	70

3. Formas de consumo y/o aplicación. (Partes de la planta. Hervida, enjuagada, frotada. En ayuno, como agua común, lapsos de descanso, etc.)

-Hervir 1 puño/l agua:

a) tomar como agua común	23	57.5
b) " 3 tzs./día	3	7.5
c) " en ayuno	4	10

-Hervir 100g/l: como agua común

4 10

-1 puño/l de alcohol, 8 días en maceración, frotar

19 47.5

4. Procedencia y distribución.		
Zacatecas	25	62.5
Sn.Luis Potosí	30	75
Mercado de Sonora	3	7.5
Guerrero	3	7.5
5. Fecha de abastecimiento al lugar (Mercado).		
c/2 meses	6	15
c/3 meses	21	52.5
c/4 meses	13	32.5
6. ¿La emplean para curar cálculos de la vesícula?		
Si	27	67.5
No	13	32.5

Nota: En algunas preguntas, los porcentajes de respuesta exceden al 100%, esto es debido a que las personas dieron más de una respuesta y el porcentaje fue obtenido considerando el número de éstas entre el total de encuestados.

Pruebas químicas en el extracto alcohólico:

Debido al efecto preventivo del extracto alcohólico de *Larrea*, se decidió realizar pruebas químicas semicuantitativas con dos diferentes concentraciones del extracto (50 y 100mg/ml), para identificar los principales grupos de metabolitos secundarios en el extracto alcohólico. De éstas se obtuvieron resultados negativos para el caso de terpenos y esteroides, glucósidos y alcaloides. Solo fue positiva la prueba para detectar flavonoides, observándose un ligero cambio de coloración anaranjada, proporcionales a las dos concentraciones ensayadas, lo que indica una baja concentración de estos compuestos en el extracto. No se pudo analizar para lignanos.

6.2 Efecto de los extractos de Gobernadora en la colelitiasis de colesterol del hámster

Experimento en hámsters:

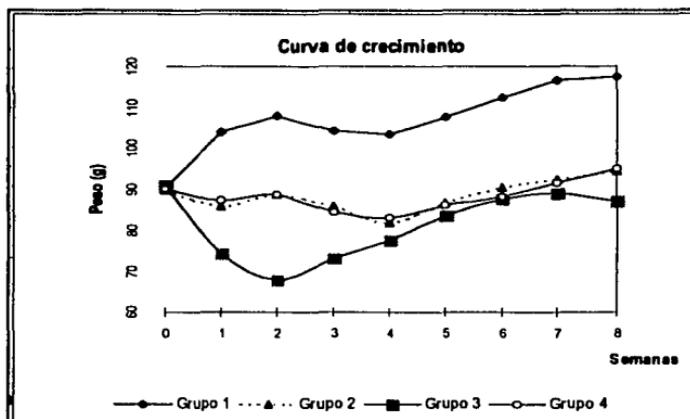
La dieta litogénica de Dam es una dieta nutricionalmente deficiente en ácidos grasos, por lo que no fue sorprendente el observar que los animales que la recibieron (Grupos 2 a 4) prácticamente no crecieron. En la tabla 1, la cual muestra el peso de los animales inicial y final de cada grupo, así como el incremento de peso en el período experimental, se puede observar que el Grupo 1 al que se suministró solo la dieta básica tuvo un incremento significativo ($P < 0.05$) respecto a los otros grupos, mientras que el grupo 3, alimentado con la dieta litogénica más el extracto alcohólico de la planta, perdió 4g de peso. El grupo 2 alimentado con la dieta litogénica de Dam (DL) y el grupo 4 con la misma dieta litogénica más el extracto acuoso de *Larrea tridentata*, tuvieron un incremento similar de peso al término del período experimental. La diferencia de peso del grupo con DL en comparación con los que se les administraron los diferentes extractos (grupos 3 y 4) no fue significativa.

TABLA 1
PESOS CORPORAL Y HEPATICO, INCREMENTO DE
CRECIMIENTO Y CONSUMO DE ALIMENTO.

GRUPOS Y DIETAS	PESO CORPORAL Inicial	PESO CORPORAL Final	DIF.DE PESO g	PESO DEL HIGADO g/100g pc	CONSUMO ALIMENTO g/día
1 PURINA	90 ± 3 (12)	118 ± 8 ^{a,b,c} (12)	27 ± 6 ^{a,b,c} (12)	3.4 ± 0.2 ^{a,b} (12)	10.0 ± 0.9 (4)
2 LITOGENIC A (DL)	90 ± 4 (12)	94 ± 19 (12)	4 ± 19 (12)	4.2 ± 0.5 (12)	7.6 ± 1.2 (4)
3 DL + 0.5% Ex OH GOB.	91 ± 5 (9)	87 ± 14 (9)	-4 ± 13 (9)	4.2 ± 0.4 (9)	7.8 ± 1.7 (4)
4 DL + 1% Ex Aq GOB.	90 ± 5 (12)	95 ± 9 (12)	5 ± 6 (12)	3.6 ± 0.4 (12)	8.9 ± 0.8 (4)

Media ± DE, (n); a= 1 vs 2, b= 1 vs 3, c= 1 vs 4. ($P < 0.05$).

Sin embargo, aunque el Grupo 1 tuvo un consumo mayor en comparación con los Grupos 2 a 4, la diferencia no fue significativa.



Gráfica 1. Curva de crecimiento de los hámsters en el periodo experimental.

En la Gráfica 1 se muestra el crecimiento de los animales, en esta se observa una ligera tendencia ascendente de los Grupos 2 y 4, la cual es muy marcada en el Grupo 1; sin embargo, el Grupo 3 presentó un notable descenso alrededor de la segunda semana experimental, recuperándose posteriormente.

Respecto al peso del hígado (Tabla 1) expresado como el por ciento de peso corporal del animal, se observó que al comparar con el control (Grupo 1), el peso del hígado de los grupos alimentados con la dieta litogénica sola (Grupo 2) y adicionada de extracto alcohólico de Gobernadora (Grupo 3) se incrementó significativamente ($P < 0.05$), mientras que los hámsters que recibieron el extracto acuoso (Grupo 4) mostraron un peso similar a los controles, y significativamente menor al de los que recibieron solo dieta litogénica ($P < 0.05$).

La dieta del Grupo 3 consistente en la dieta litogénica de Dam más el extracto alcohólico de *Larrea tridentata* en una concentración de 0.5% no fue tolerada por todos los animales y solamente sobrevivieron 9 hasta el final del periodo experimental. Durante el curso de la primera y segunda semana experimental murieron 3 animales, en la necropsia de uno de ellos se observó intestino delgado congestionado y el ciego repleto de un contenido pastoso de color verde hoja, mientras que el intestino grueso no presentaba heces formadas y si una distensión por una gran cantidad de gases. La necropsia de otro mostró el estómago conteniendo una bola de pelo muy compacta (tricoma), el ciego aumentado de tamaño y lleno de una substancia verdosa. La necropsia del tercer animal no pudo realizarse ya que se presentó canibalismo. Estos tres animales no fueron considerados para el crecimiento del Grupo 3.

TABLA 2
FLUJOS Y LÍPIDOS BILIARES

GRUPOS Y DIETAS	FLUJO BILIAR mg/min/100g pc	COLESTEROL BILIAR µM	SALES BILIARES mM	FOSFOLÍPIDOS mM
1 PURINA	5.89 ± 0.44 (12)	184 ± 64 ^{a,b,c} (12)	9.18 ± 3.43 (12)	2.23 ± 0.19 ^b (12)
2 LITOGÉNICA (DL)	6.05 ± 1.50 (9)	403 ± 137 (9)	9.90 ± 3.00 (9)	2.9 ± 1.00 (9)
3 DL + 0.5% Ex OH GOB.	6.14 ± 1.41 (7)	370 ± 133 (7)	11.31 ± 4.10 (7)	3.82 ± 1.15 (7)
4 DL + 1% Ex Ag GOB.	5.94 ± 1.14 (10)	406 ± 115 (10)	10.92 ± 2.93 (10)	3.18 ± 0.85 (10)

Media ± DE (n); a= 1 vs 2, b= 1 vs 3, c= 1 vs 4. (P<0.05).

Respecto al flujo biliar los resultados se muestran en la Tabla 2, en la cual se observa que este no fue significativamente diferente entre los grupos. Asimismo, la Tabla 2 nos muestra las concentraciones de lípidos en bilis hepática, y se puede observar que al comparar con el grupo control (Grupo 1), los grupos que recibieron dieta litogénica (Grupos 2 a 4) exhibieron una duplicación en la concentración de colesterol. Por otra parte,

aunque los animales que recibieron el extracto alcohólico de Gobernadora mostraron una concentración de colesterol menor que la de los grupos 2 y 4, esta diferencia no alcanzó a ser significativa.

En relación a las sales biliares (Tabla 2), estas aumentaron ligeramente en los grupos que recibieron los extractos de Gobernadora, especialmente el alcohólico, sin embargo esta diferencia no llegó a ser significativa al compararlos con los grupos 1 y 2.

La concentración de fosfolípidos biliares de los grupos 2 (DL) y 4 (DL + extracto acuoso) fue similar, y aunque mayor que la del Grupo control no llegó a ser significativamente diferente, mientras que el Grupo 3 (DL + extracto alcohólico) mostró la concentración de fosfolípidos más elevada, siendo esta significativamente diferente del Grupo 1 (control; $P < 0.05$), pero no del 2 y 4.

Para los análisis de flujo, colesterol, sales y fosfolípidos biliares, no se pudo obtener bilis de todos los animales porque no pudieron ser canulados o debido a que el flujo biliar se encontró muy disminuído, probablemente por obstrucción de la cánula o por fuga de bilis en puntos cercanos a la inserción de ésta.

Debido al incremento de la concentración biliar de colesterol, el porcentaje molar de colesterol respecto a los lípidos biliares (Tabla 3), tuvo un incremento considerable en todos los grupos que recibieron la dieta litogénica (Grupos 2, 3 y 4), al compararlos con el grupo control, no siendo significativa la diferencia entre ellos. Sin embargo, con la adición del extracto alcohólico de Gobernadora la elevación en el porcentaje molar de colesterol fue intermedia entre las observadas en el grupo con dieta litogénica y el control, de tal modo que las diferencias con estos no fueron significativas.

Por otra parte, el índice litogénico (Tabla 3), fué más elevado en los animales que recibieron la dieta litogénica sola (Grupo 2) y adicionada de extracto acuoso de Gobernadora (Grupo 4), sin embargo, no llegaron a ser significativamente diferentes del grupo control. El grupo 3 presentó un índice litogénico similar al del grupo control.

TABLA 3
PORCENTAJE MOLAR DE COLESTEROL, INDICE LITOGENICO Y
FRECUENCIA DE COLELITIASIS DE COLESTEROL.

GRUPOS Y DIETAS	% MOLAR DE COLESTEROL	INDICE LITOGENICO	FRECUENCIA DE CALCULOS
1 PURINA	1.61 ± 0.45 ^{a,c} (12)	0.59 ± 0.17	0/12
2 LITOGENICA (DL)	3.15 ± 1.09 (9)	0.93 ± 0.39 (9)	9/12
3 DL + 0.5% Ex OH GOB.	2.43 ± 0.60 (7)	0.54 ± 0.18 (7)	0/9
4 DL + 1% Ex Aq GOB.	2.98 ± 1.18 (10)	0.97 ± 0.62 (10)	8/12

Media ± DE (n); a= 1 vs 2, b= 1 vs 3, c= 1 vs 4. (P<0.05).

En relación a la frecuencia de cálculos en los diferentes grupos, los resultados, que se presentan en la Tabla 3, nos muestran que el grupo 2 exhibió una elevada frecuencia de coledlitiasis de colesterol (75%). De igual manera, el grupo con el extracto acuoso de Gobernadora (Grupo 4) presentó una alta frecuencia de cálculos (63%) y dos animales sin cálculos presentaron cristales de colesterol. Por otra parte, en el grupo con el extracto alcohólico (Grupo 3) no se observó formación de cálculos de colesterol, sin embargo, se encontraron algunos microcristales de colesterol en dos animales (22.2%) e incluso pequeños cálculos pigmentarios en dos casos más (22.2%).

Respecto al colesterol sérico los resultados se presentan en la Tabla 4, en la cual se observa que los animales que recibieron la dieta litogénica (Grupo 2) exhibieron el mayor nivel de colesterol (P<0.05 vs Grupo 1). La adición de extracto alcohólico o acuoso a la dieta litogénica (Grupos 3 y 4, respectivamente) indujo concentraciones de colesterol sérico significativamente menores (P<0.05) que las producidas con la dieta litogénica sola (Grupo 2), las cuales además no fueron diferentes estadísticamente de las de los animales controles (Grupo 1).

TABLA 4
LÍPIDOS SÉRICOS

GRUPOS Y DIETAS	COLESTEROL TOTAL mg/dl	COLESTEROL HDL mg/dl	COLESTEROL HDL %	TRIGLICERIS mg/dl
1 PURINA	106 ± 12.3 ^{a,b,c} (12)	68 ± 9 ^{a,b,c} (12)	64.1 ± 4.5 ^{a,b,c} (12)	100 ± 28 (12)
2 LITOGÉNICA (DL)	181 ± 45 ^e (12)	131 ± 20 ^{d,e} (12)	74.1 ± 7.2 (12)	133 ± 55 (12)
3 DL + 0.5% Ex OH GOB	145 ± 25 (7)	111 ± 18 (7)	76.3 ± 4.2 (7)	102 ± 25 (7)
4 DL + 1% Ex Aq GOB	140 ± 26 (12)	106 ± 13 (12)	77.4 ± 11.4 (12)	102 ± 39 (11)

Media ± DE (n); a= 1 vs 2, b= 1 vs 3, c= 1 vs 3, d= 2 vs 3, e= 2 vs 4. (P<0.05).

De manera similar, la dieta litogénica produjo los niveles más elevados de colesterol HDL, mientras que la adición de extractos de Gobernadora indujeron valores intermedios entre la dieta litogénica y el control, pero a diferencia del colesterol total, las diferencias en colesterol HDL entre el grupo control y los que recibieron extractos de Gobernadora (Grupos 3 y 4) si fueron significativas. Por otra parte, la proporción de colesterol HDL respecto al colesterol total se elevó en un 10% con la dieta litogénica en relación a la proporción del control; este incremento en la proporción de colesterol HDL no se modificó con la adición de extractos de Gobernadora a la dieta litogénica.

Respecto a la concentración de triglicéridos en suero, ésta se elevó ligeramente en el Grupo 2, sin embargo, este incremento no fué significativo al comparar con el Grupo 1. Asimismo, los extractos de Gobernadora no afectaron los niveles de triglicéridos.

7 DISCUSION

El interés por estudiar a la Gobernadora como un agente terapéutico en el tratamiento de los cálculos biliares surgió por la cita que se hace de ella en el libro de Jose Luis Díaz del Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (Díaz, 1989), quien hace referencia al libro de Maximino Martínez (Martínez, 1969), en el cual se señala "También se dice que el cocimiento directo disuelve los cálculos renales y vesicales". Otras publicaciones sobre plantas medicinales mexicanas también hacen referencia a esa cita de Maximino Martínez (Lara y Márquez, 1996). Por lo anterior en el presente estudio se decidió realizar entrevistas en los mercados de plantas medicinales de la Ciudad de México para obtener información sobre los usos medicinales actuales de Gobernadora y si es vendida para el tratamiento de los cálculos biliares. Los resultados de esta encuesta mostraron que la utilización principal de Gobernadora es en problemas de esterilidad (frialdad de la matriz), mientras que a la pregunta sobre los usos medicinales en general se señala que el uso en enfermedades renales o vesicales es de 37.5%. El señalar en forma conjunta enfermedades renales y vesicales indica que no se hace una separación entre cálculos renales y biliares, al parecer lo importante es que ambos son piedras y deben tratarse igual. Parece ser que Gobernadora es más usada para cálculos renales o molestias producidas por éstos, que para cálculos biliares, puesto que también se señaló con un alto porcentaje su uso en enfermedades renales. Sin embargo, a la pregunta directa de si se emplea en los cálculos biliares 67.5% respondieron que si, lo cual creemos está influenciado por lo antes señalado.

Anteriormente en este Laboratorio se había ensayado a la Gobernadora como agente preventivo de la coelitis pigmentaria del hámster, encontrándose que un extracto hidroalcohólico suministrado al 4% en la dieta impide la formación de este tipo de cálculos (Granados y Cárdenas, 1994). Al igual que los cálculos renales, los biliares pigmentarios estan compuestos de sales insolubles de calcio, lo cual haria más lógico su empleo para la disolución de ambos tipos de cálculos, aunque la

farmacología y el mecanismo de acción del compuesto(s) activo podría ser muy diferente. Aquí es bueno recordar que uno de los usos industriales de Gobernadora es el de desincrustante de sales insolubles en tuberías, aunque es difícil que éste sea el modo de acción de Gobernadora en la litiasis, su efecto sobre la formación o disolución de sales cálcicas puede ser determinante en la litiasis tanto renal como biliar pigmentaria.

No obstante lo anterior, la mayoría de los cálculos biliares en México son cálculos de colesterol (incluyendo aquí a los puros de colesterol y a los mixtos), y sólo un 14% son pigmentarios (Méndez, *et al.* 1995), por lo cual en el presente trabajo se puso a prueba la posibilidad de que extractos de Gobernadora previnieran la formación de cálculos biliares de colesterol en el hámster.

Se ensayó un extracto acuoso, cuya preparación es similar a lo indicado por la medicina tradicional, pero el extracto no fue suministrado como "agua del día", sino que fue liofilizado para mezclarlo con la dieta y tener un mejor control de la ingestión del extracto. El proceso de liofilización pudo causar la pérdida de algunos compuestos volátiles. Este extracto se adicionó a la dieta al nivel de 1% que es una dosis elevada considerando que un litro de extracto da un 2% de materia seca por liofilización, y una persona de 70kg que tome 1L de extracto por día ingeriría el equivalente a 27g de liofilizado o sea 385mg/kg de peso corporal. De acuerdo al consumo de alimento y peso de los animales del Grupo con extracto acuoso, la dosis de extracto fue de 989mg/kg.

Asimismo, se ensayó un extracto alcohólico, el cual es una resina que se obtuvo con un rendimiento de aproximadamente 10g/100g de planta, por lo que se suministró a la mitad del nivel del extracto acuoso.

El deficiente crecimiento de los animales de los grupos experimentales es debido a la dieta litogénica que no es nutricionalmente balanceada. Los extractos fueron bien

tolerados por los animales, excepto por 3 que recibieron el extracto alcohólico, los cuales murieron al inicio del experimento. Esta tolerancia a los extractos también se demuestra con la similitud en el consumo de alimento de los 3 grupos experimentales. Tampoco se presentaron alteraciones macroscópicas en los animales que recibieron los extractos.

El extracto acuoso produjo incluso un efecto hepatoprotector, reflejado en un peso porcentual del hígado que no fue diferente al del grupo control, así mismo, los hámsters de este grupo mostraron un peso corporal final más homogéneo, aunque el promedio fue similar al de los otros grupos.

De los 2 extractos ensayados sólo el alcohólico produjo una prevención significativa de la colestiasis. Esta prevención por Gobernadora pudiera deberse, de acuerdo a la química de sus componentes, a su alto contenido de ácido nordehidroguaiarético, que es el principal componente fenólico de toda la planta, y que además es completamente soluble en etanol y solo tiene ligera solubilidad en agua caliente, lo que podría explicar la diferencia en efecto protector de los 2 extractos. A este compuesto se le han atribuido, como ya se mencionó, las propiedades de antioxidante, antimicrobiano y fungicida, entre muchas otras. Existen además antecedentes de otros antioxidantes tales como el azul de metileno (Granados y Cárdenas, 1987) y el hidroxitolueno butilado (Cárdenas *et al.* 1996), que previenen la colestiasis pigmentaria en el hámster, aunque como ya se mencionó la patogénesis de ambas litiasis es diferente. Por este motivo sería necesario aislar el ácido nordehidroguaiarético y ponerlo a prueba en experimentos con distintas concentraciones y valorar nuevamente si su ingestión se acompaña de cambios patológicos, ya que se han reportado efectos deletéreos con este antioxidante, como inhibición *in vitro* de peroxidasa, catalasa, alcohol deshidrogenasa, complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial, así como inactivación de ureasa y D-aminoácido oxidasa (Timmermann, 1981). No obstante, la acción *in vitro* puede ser muy diferente a *in vivo* debido al transporte y procesamiento del compuesto por el organismo. Por otra parte, el extracto alcohólico de Gobernadora contiene un

gran número de otros metabolitos secundarios, como lignanos y flavonoides, que pudieran ser el principio activo. De cualquier manera sería importante poder hacer un seguimiento con algunos de los consumidores para saber si hay alguna molestia o intolerancia con el consumo del té.

El extracto alcohólico fue también el que más afectó los lípidos biliares, pero ni la concentración de colesterol, ni la de sales biliares ni la de fosfolípidos llegaron a ser significativamente diferentes a las de los animales con dieta litogénica sola. No obstante, todos los cambios, aunque no significativos, tendieron hacia una bilis menos litogénica, esto es disminuyó el colesterol y aumentaron los fosfolípidos y las sales biliares, lo cual resultó en un porcentaje molar de colesterol menor, que aunque no fue significativamente menor que el del grupo con dieta litogénica, tampoco fue significativamente mayor que el del grupo control.

El cambio más notable en lípidos biliares producido por el extracto alcohólico fue una elevación en la concentración de fosfolípidos, que alcanzó a ser significativamente mayor que el control. La importancia de los fosfolípidos en la solubilización del colesterol y reducción de la litogenicidad de la bilis ha sido estudiada recientemente. De estudios *in vitro* se ha señalado que el incrementar la concentración de fosfolípidos en la bilis puede ser más efectivo para prevenir la colestiasis de colesterol que incrementar las sales biliares, ya que un aumento de fosfolípidos, que produzca una misma disminución en el índice de saturación biliar de colesterol que por aumento de sales biliares, retarda mucho más el tiempo de nucleación que el obtenido con sales biliares (Jungst *et al.* 1993). Lo anterior se asocia con una mayor cantidad de colesterol transportado en micelas que en vesículas, en las cuales la proporción colesterol/fosfolípidos disminuyó. Debe recordarse que la nucleación del colesterol ocurre en vesículas multilamelares saturadas con colesterol (Hussaini *et al.* 1995). Los fosfolípidos empleados en este estudio incluyeron dipalmitoil y diesteoil fosfatidil colina, es decir con ácidos grasos no esenciales, como los que deben encontrarse en los fosfolípidos de los hámsters de este experimento que reciben una dieta carente de

ácidos grasos esenciales. El mecanismo por el cual el extracto alcohólico aumenta la concentración de fosfolípidos queda por establecerse.

Otro posible mecanismo de acción del extracto alcohólico pudiera relacionarse con lo siguiente: se ha establecido que la hipersecreción de colesterol correlaciona con niveles elevados de ácido desoxicólico en la bilis, lo cual es debido a su mayor hidrofobicidad. El ácido desoxicólico es un ácido biliar secundario formado a partir del ácido cólico por bacterias intestinales, el cual entra en circulación enterohepática y regula la síntesis hepática de ácidos biliares primarios (Berr *et al.* 1996). Por otro lado se ha reportado el efecto antibiótico del extracto etanólico de Larrea (Zamora y Mora, 1985) y aún del extracto acuoso (Lara y Márquez, 1996), además del efecto antiamebiano del NDGA (Segura *et al.* 1981). De tal modo cabe la posibilidad de que se haya alterado la microflora intestinal disminuyendo la formación de ácidos biliares secundarios, incluido en estos el desoxicólico, resultando en aumento en la absorción de ácido cólico en el íleon, incrementando así la concentración de este en la bilis, lo cual reduciría la secreción de colesterol. Aunque la acción antibiótica de Gobernadora se ha encontrado tanto en el extracto alcohólico como en el acuoso, es probable que a nivel intestinal su efecto sea diferente, provocando las diferencias observadas. Por otra parte, la disminución biliar de ácido desoxicólico podría también producirse por la unión y el arrastre de ácidos biliares con algún componente del extracto, lo cual evitaría su circulación enterohepática y por tanto aumento en sales biliares primarias en la bilis. Lo anterior podría demostrarse determinando la composición de sales biliares en la bilis, donde se encontraría una reducción en la proporción de ácido desoxicólico, y determinando sales biliares fecales, que de estar incrementadas indicarían arrastre de estas.

Por otro lado y de acuerdo con las pruebas para conocer el contenido de metabolitos secundarios del extracto alcohólico, se obtuvieron resultados positivos para la presencia de flavonoides y podemos así también considerar la posible intervención de éstos. Se ha encontrado que los flavonoides alteran procesos de transporte y secreción

a nivel del intestino y del colon que podría interferir con la circulación enterohepática de sales biliares, o que por sus propiedades antioxidantes y quelantes pudieran estar alterando la flora intestinal (Nguyen y Canada, 1993).

En relación al efecto de los extractos de Gobernadora sobre los lípidos séricos, podemos decir que en general se observó un efecto benéfico de ambos extractos sobre los niveles de éstos, tendiendo todos hacia valores normales, lo cual, como es sabido, reduce el riesgo de aterosclerosis y enfermedades coronarias. Los niveles de colesterol HDL, fueron significativamente más bajos en comparación al grupo con dieta litogénica sola, sin embargo, ni éste ni el colesterol total disminuyeron a valores normales. El descenso en colesterol producido por los extractos también afectó a las LDL, ya que el porcentaje de colesterol HDL en los grupos con dieta litogénica y adicionada de extracto fue similar. Como es sabido, en los humanos, la cantidad total y la distribución del colesterol entre los diferentes tipos de lipoproteínas, es un fuerte factor de enfermedades ateroscleróticas, coronarias e isquémicas (German, *et al.* 1996), encontrándose mayor riesgo si el colesterol de HDL es bajo y el de LDL alto, por lo que es importante hacer notar que la adición de los diferentes extractos a la dieta litogénica, no alteró dicha distribución. Así mismo, aunque la concentración de triglicéridos fue estadísticamente similar en todos los grupos, el promedio más elevado se encontró con la dieta litogénica sola y los extractos tendieron a valores normales, asociándose también esto con menor riesgo de enfermedades coronarias.

Por otra parte, ambos extractos mostraron los mismos efectos sobre los lípidos sérico, pero tuvieron diferente efecto sobre los lípidos biliares, por lo que parece no haber relación entre lo que ocurre en plasma con los lípidos y lo que ocurre en bilis.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en el presente estudio, se considera de interés proyectar futuras investigaciones hacia la prevención o curación de los cálculos biliares analizando más a fondo el o los principios activos de esta abundante planta de nuestros desiertos.

8 CONCLUSIONES

-Entre vendedores de plantas medicinales en mercados de la Ciudad de México la Gobernadora (*Larrea tridentata*) se emplea principalmente contra la esterilidad y el "enfriamiento de la matriz"; sin embargo, un 37.5% de éstos mencionan que se emplea en enfermedades renales y vesiculares y un 67.5% respondieron afirmativamente a si se emplea contra los cálculos vesiculares.

-Sólo el extracto alcohólico de hojas de Gobernadora, suministrado al nivel de 0.5% en la dieta litogénica, previene significativamente la colelitiasis de colesterol en el hámster; lo cual se asocia con una reducción del porcentaje molar de colesterol biliar y una elevación en la concentración de fosfolípidos.

-Tanto el extracto alcohólico de Gobernadora como el acuoso al 0.5 y 1% en la dieta respectivamente, reducen los niveles de colesterol total sérico, sin afectar la proporción de éste en HDL, ni la de triglicéridos.

9 APENDICE

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles nombres se le dan a la planta?
2. Usos (Medicinales, Industriales, etc.)
3. Formas de consumo y/o aplicación, manejo, partes de la planta que se emplea, es hervida, enjuagada, frotada, etc. Tomada en ayuno, agua común, lapsos de descanso, etc.
4. Dosis. Indicaciones con la dieta, sexo, edad, etc.
5. Contraindicaciones en cantidad, mezcla con alimentos, descanso en su consumo, etc.
6. Tipo de la planta (Calidad: fría, caliente, combinada con alimentos, etc.
7. Procedencia y distribución (Silvestre, regional, restringida, abundante, cultivada, método de cultivo: cuidados, podas, abonos, frecuencia, etc.).
8. Parámetros para la recolección. Colector, sexo, edad, otras condiciones; método: herramientas, horario, estacionalidad, etc., totalidad o partes de la planta.
9. Métodos de preservación. Completa, cortes, paquetes; forma de secado (sol, aire), almacenaje (humedad, plagas).
10. Potencialidad como fuente económica local. Autoconsumo familiar, método de comercialización (Entidad-Mercados), sobreexplotación, conservación.
11. Costo, entidad, reventas, demanda-época.
12. Fecha de abastecimiento al lugar (Mercado).
13. Fauna observada cercana a la planta, interacciones, polinizadores.
14. Posibles pacientes-consumidores, resultados.
15. ¿La emplean para cálculos biliares y/o renales? Características para este uso.
- 16.- Otros.

10 BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M. and Portman, O. W.** 1987. Different susceptibilities to the formation of cholesterol gallstones in mice. *Hepatology*, 7:257-265.
- Andersen, J. M. and Dietschy, J. M.** 1978. Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat. *J. Biol. Chem.* 253:9024-9032.
- Angelin, B., Backman, L., Einarsson, K., Eriksson, L., and Ewerth, S.** 1982. Hepatic cholesterol metabolism in obesity: activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Lipid. Res.*, 23:770-773.
- Arteaga, S., Estañol, P. y Cárdenas, R.** 1995. Prevención por Gobernadora *Larrea tridentata* de la colelitiasis de colesterol en el Jámster Dorado. Congr. Nal. Gastroenterol, Mérida., *Rev. Gastroenterol. Méx.*, 60 (4) Supl. 3:S94.
- Arteaga, S., Estañol, P. y Cárdenas, R.** 1996. La Gobernadora *Larrea tridentata* en el tratamiento de los cálculos biliares. II Congr. Nal. de Etnobiología, Cuernavaca, Mor. Memorias: 17,115.
- Attili, A., De Santis, A., Capri, R., Repice, A., Maselli, S. and GREPCO Group.** 1995. The natural history of gallstones: The GREPCO experience. *Hepatology*, 29, 3:656-660.
- Ayyad, N., Cohen, Y., Mosbach, E., Miki, S., Mikami, T., Mikami, Y. and Stenger, R.** 1993-a. Age, sex and source of hamsters affect experimental cholesterol cholelithiasis. *Lipids*, 28:981-986.
- Ayyad, N., Cohen, B., Mosbach, E., Mikami, T., and McSherry, C.** 1993-b. Biliary phospholipids and gallstones are affected by dietary fat in sasco hamsters. *Gastroenterology*, 104 (4), part 2:A347.
- Ayyad, N., Cohen, Y., Mosbach, E., Mikami, T., Mikami, Y. and Ohsima, A.** 1995. Hormonal control of cholesterol cholelithiasis in the female hamster. *J. Lipid Res.* 36:1483-1488.
- Barragán, S., Alvarez, G. y Zavalza, A.** 1994. Valoración *In vitro* de la actividad antimicótica frente a hongos patógenos para el hombre de la *Larrea tridentata*. En: Memorias del 1er. Congreso Mexicano de Etnobiología, Toluca, Méx. Resúmenes pag 17.
- Bartlett, G.** 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*; 234:466.

Basu, S. K., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 1978. Characterization of the low density lipoprotein receptor in membranes prepared from human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 253: 3852-3856.

Bennion, L. and Grundy, S. 1978. Risk factors for the development of cholelithiasis in man. *N. Engl. J. Med.*, 299:1221-1227.

Bergman, F. y Van der Linden, W. 1968. Further studies on the effects of dietary anion exchangers on gallstone formation in hamsters. *Acta Chir. Scand.*, 134: 651-654.

Berr, F., Kullak-Ublick, G., Paumgartner, G., Münzing, W. and Hylemon, P. 1996. α -Dehydroxylating bacteria enhance deoxycholic acid input and cholesterol saturation of bile in patients with gallstones. *Gastroenterology*, 11, 6:1611-1620.

Bilhartz, L. and Dietschy, J. 1988. Bile salt hydrophobicity influences cholesterol recruitment from rat liver in vivo when cholesterol synthesis and lipoprotein uptake are constant. *Gastroenterology*, 95: 771-779.

Boyd, G. S. 1975. Cholesterol absorption. En: *The role of fats in human nutrition.* Academic Press. London. Cap.8:353.

Broomfield, P., Chopra, R., Sheinbaum, R., Silverman, A., Schoenfield, L. and Marks, J. 1988. Effects of ursodeoxycholic acid and aspirin on the formation of lithogenic bile and gallstones during loss of weight. *N. Engl. J. Med.*, 319:1567-1562.

Bruneton. 1991. Elementos de fitoquímica y Farmacognosia. ACRIBIA. España. 127-139 y 148-155.

Busch, N., Lammert, F., Marshall, H., and Matern, S. 1993. Isolation of a new potent inhibitor protein of cholesterol crystal growth from human bile. *Hepatology*, 8:96A,158.

Busch, N., Lammert, F., Marschall, H., and Matern, S. 1995. A new subgroup of lectin-bound biliary proteins binds to cholesterol crystals, modifies crystal morphology, and inhibits cholesterol crystallization. *J. Clin. Invest.*, 96:3009-3015.

Campos, L.E., Mabry, J.J. y Fernández, T. S. 1981. *Larrea*. 2ª edición. CONACYT, México. 441 pags.

Cárdenas, V. R. 1978. Estudio sobre la acción colelitogénica pigmentaria de la vitamina A en el jámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

- Cárdenas R., García, F. Jaime, M. y Granados, H.** 1989. Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXV. Efecto de la hidrogenación del Polifat KA-02 sobre su acción preventiva de la colelitiasis pigmentaria. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 20:343-348.
- Cárdenas R.** 1991-a. Modelos animales de litiasis biliar. Rev. Gastroenterol. Méx., 56: 131-135.
- Cárdenas, R., Jaime, M. E., Guzmán, L. and Granados, H.** 1991-b. Gallstones in the golden hamster. XXXVI. Pigment cholelithiasis produced by retinoic acid. Arch. Invest. Méd. Méx., 22:209-216.
- Cárdenas, R., Arteaga, H. y Estaño, P.** 1995. Composición biliar de jámsteres con dieta de frijol y glucosa. Congr. Nal. Gastroenterol, Mérida., Rev. Gastroenterol. Méx., 60 (4) Supl. 3:593.
- Cárdenas, R., Estaño, P. and Galicia, M.** 1996. Pigment cholelithiasis induced by vitamin A and its prevention by butylated hydroxytoluene. Archives of Medical Research. 27, 1:71-75.
- Carey, M. and Small, D.** 1978-a. The physical chemistry of cholesterol solubility bile: relation to gallstone formation and dissolution in man. J. Clin. Inves., 61: 998-1026.
- Carey, M.** 1978-b. Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile, J. Lipid Res., 19:945-955.
- Christensen, F., Prange, Y. and Dam, H.** 1964. Alimentary production of gallstone in hamsters. 13. Influence of highly unsaturated fats and certain minerals on gallstones production. Z. Ernährungswiss., 4:186-192.
- Cohen, B., Toshiaki, S. Mosbach, E. et. al.** 1987. An animal model of pigment cholelithiasis. Am. J. Surg., 153:130-138.
- Cohen, B., Ayyad, N., Mosbach, E. McSherry, C., Matoba, N., Hofmann, A., Ton-Nu, H-T., Peng, Y., Scheingart, C. and Stenger, R.** 1991. Replacement of cholesterol gallstones by murideoxycholic taurine gallstones in prairie dogs fed murideoxycholic acid. Hepatology, 14:158-168.
- Cohen, B., Mosbach, E Ayyad, N., Miki, S., and Mc Sherry, C.** 1992. Dietary fats and fatty acids modulate cholesterol cholelithiasis in the hamster. Lipids. 27: 7, Jul., 526-32.
- Cohen, B., Miki, S., Mosbach, E Ayyad, N., Stenger, R., Mikami, T., Yoshi, M., Kihira, K. And Hoshita, T.** 1993. Bile acid sulfonates alter cholesterol gallstone incidence in hamsters. Hepatology:103.

Cohen, B., Mikami, T., Ayyad, N., Oshima, A., Infante, R. and Mosbach, E. 1995-a. Hydrophilic bile acids: prevention and dissolution experiments in two animal models of cholesterol cholelithiasis. *Lipids*; 30, 9:855-861.

Cohen, B., Mikami, T., Ayyad, N., Mikami, Y., Mosbach, E. 1995-b. Dietary fat alters the distribution of cholesterol between vesicles and micelles in hamster bile. *Lipids*. 30, 4:299-305.

Cotecaca. 1974. Vegetación del Estado de Sonora. Herbario. Brigada UNO. Sonora. S.A.G.

Coyne, M. J., Bonorris, G. G., Goldstein, L. Y. and Shoenfiel, L. J. 1976. Effects of chenodeoxycolic acid and phenobarbital on the rate-limiting enzymes of hepatic cholesterol and bile acid synthesis in patients with gallstones. *J. Lab. Clin. Med.*, 87:281-291.

Cronquist, A. 1987. Botánica básica. Comp. Editorial Continental, México, p. 409-401, 586.

Dam, H. 1969. Nutritional aspects of gallstones formation with particular reference to alimentary production of gallstones in laboratory animals. *World Rev. Nutr. Diet.*, 11:199-239.

Dam, H. y Hegardt, F. G. 1971. The relation between formation of gallstones rich in cholesterol and the solubility of cholesterol in aqueous solutions of bile salts and lecithin. *Z. Ernährungswiss.*, 10:239-252.

Danzinger, R.G., Hofman, A. F., Schoenfield, L. J. and Thistle, J. L. 1972. Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycolic acid. *New Eng. J. Med.*, 286:1.

Davidson, N.O., et al. 1987. Intestinal apolipoprotein A-1 y B-48 metabolism. *J. Lipid. Res.*, 28: 388-402.

DenBesten, L., Connor, W. E., and Bells, S. 1973. The effect of dietary cholesterol on the composition of human bile. *Surgery*, 73:266-273.

De la Cerda, A. J. 1967. Las tierras áridas mexicanas. Estudio general de las especies de Larrea. Serie Aridocultura, Tomo II. México. 13-45 pp.

Díaz, J. L. 1989. Usos de las plantas medicinales de México. Monografías científicas II. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales 329 p.

Domínguez. 1979. Métodos de Investigación fitoquímica. Limusa, México. pags: 38-47, 74, 127-136.

Dowsett, J.F. , Vaira, D., Polydorou, A., Russell, R.O. and Salmon, P. 1988. International endoscopy in the pancreatobiliary tree. *Am. J. Gastroenterol.*, 83: 1378-1386.

Einarson, K., Nisell, K., Angelin, B. and Leijd, B. 1983. Effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and secretion rates of biliary lipids in man. En: Paumgartner, G., Stiehl, A. And Gerok, W. (Eds.). 1983. Bile acids and cholesterol in health and disease. MTP Press Ltd, Boston, pp. 267-268.

Estrada, E., Soriano, M., Cárdenas, R. y Grannados, H. 1976. Cálculos biliares en el jámster dorado. XII. Comparación de la acción litogénica de la mantequilla de leche de vaca con la de 6 aceites vegetales. X Congr. Nal. Gastroenterol. Resúmenes: T-2.

Estrada, E. 1985. Jardín botánico de plantas medicinales. Depto. de Fitotecnia Univ. Autónoma Chapingo. 15 pp.

Faergeman, O. and Havel, R.J. 1975. Metabolism of cholesteryl esters of rat very low density lipoproteins. *J. Clin. Invest.* 55: 1210-1218.

Fielding, C.J. Origin and properties of remnant lipoproteins. In: Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism, edited by J. M. Dietschy *et al.*, 1978:83-98. American Physiological Society, Bethesda.

Fridhandler, E., Davidson, J. and Shaffer, E. 1983. Defective gallbladder contractility in the ground squirrel and prairie dog during the early stages of cholesterol gallstones formation. *Gastroenterology*, 85:830-836.

Frimberger, E. 1989. Operative laparoscopy: Cholecystectomy. *Endoscopy*, 21:367-372.

Fujihira, et al. 1973. Effect of taurine on the capacity of the bile to solubilize cholesterol in lithogenic hamsters. *Chem. Pharm. Bull.* 21: 2796-2798.

Gallinger, S., Taylor, R., Harvey, P., Perunka, C. and Strasberg, S. 1985. Effect of mucous glycoprotein on nucleation time of human bile. *Gastroenterology*, 89:648-658.

García, E., Soto, C. y F. Miranda. 1961. Larrea y clima. *An. Inst. Biol.*, 31:133-160.

German, J., Xu, R., Walzem, R., Kinsella, J., Knuckless, B., Nakamura, M. and Yokoyama, W. 1996. *Nutrition Research*, Vol 16, No 7:1239-1249.

Ginsberg, R., et al. 1977. Hepatic 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA reductase activity in hamsters on a lithogenic diet. *J. Lab. Clin. Med.* V 89, no. 5:928-936.

Goldstein, L. and Schonfield, L. 1975. Gallstones: pathogenesis and medical treatment. *Adv. Intern. Med.*, 20:89-119.

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

Granados, H., Cárdenas, R., Castillo, A. y Soriano, M. 1979. Cálculos biliares en el jámster dorado. XXIII. Colelitiasis pigmentaria producida por una dieta no purificada alta en sacarosa. *Congr. Nal. Gastroenterol., México, Rev. Gastroenterol. Méx.*; 44:253.

Granados, H. y Cárdenas, R. 1980. Prevention by *dehydrocholic acid* of the pigment cholelithiasis produced by vitamin A in the golden hamster. *Fed. Proc.* 39 (Part 1):284, abstract 96.

Granados, H. y Cárdenas, R. 1987. 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. Méx. *Rev. Gastroenterol. Méx.*, 52:302.

Granados, H., Cárdenas, R., Soriano, M. y Villa, J. 1991. Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXIV. Acción preventiva del ajo *Allium sativum* en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. *Rev. Fac. Medicina, UNAM*; 34 (2):154-159.

Granados, H. y Cárdenas, R. 1994. Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXVII. Acción preventiva de Gobernadora *Larrea tridentata* en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. *Rev. Gastroenterol Méx.*; 59(1):31-35.

Green, P. H., Tall, A. R. and Gilkman, R. M. 1978. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *J. Clin. Invest.*, 61:528-534.

Gurr, M. Y. and J.L. Harwood. 1991. Dietary lipids: implications for health and disease. Chap. 5, 163-241. En: *Lipid Biochemistry. An Introduction.* Chapman and Hall. 4^a edition, N. Y. 406 pag.

Hamilton, R. L. 1978. Hepatic secretion and metabolism of high density lipoproteins. In: *Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism*, edited by J. M. Dietschy, *et al.* pp. 155-171. American Physiological Society, Bethesda.

Hanis, L., Ferrell, E., Tulloch, R. and Schull, J. 1985. Gallbladder disease epidemiology in mexican-american in Starr County, Texas. *Amer. J. Epidemiol.*, 122:820-829.

Harvey, R., Sümjen, G., Litchenberg, M., et al. 1987. Nucleation of cholesterol from vesicles isolated from bile of patients with and without cholesterol gallstones. *Biochim. Biophys. Acta*, 921: 198-204.

Harvey, R. and Upadhyya, A. 1995. A rapid, simple high capacity cholesterol crystal growth assay. *J. Lipid Res.*, 36: 2054-2059.

Havel, R. J. 1980. Lipoprotein biosynthesis and metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 348:16-29.

Havel, R. J. 1986. Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. *Ann. Rev. Physiol.*, 48: 119-134.

Heaton, K. 1973. The epidemiology of gallstones disease and suggested aetiology. *Clin. Gastroenterol.*, 2:67-83.

Holzbach, R. T. 1983. Gallbladder stasis: consequence of long term parental hyperalimentation and risk factor for cholelithiasis. *Gastroenterology*, 84: 1055-1058.

Holzbach, R. T. 1984-a. Animals models of cholesterol gallstone disease. *Hepatology*, 4:191S-198S.

Holzbach, R. Kibe, A., Thiel, E., Howell, J., Marsh, M. and Hermann, R. 1984-b. Biliary proteins: unique inhibitors of cholesterol crystal nucleation in human gallbladder bile. *J. Clin. Invest.*, 73:35-45.

Holzbach, T. 1985. Patogenia y tratamiento médico de los cálculos de la vesícula biliar. En: *Slensenger, H., Fordtran, J. Panamericana, 3º de Argentina. Vol 2. 1678pp.*

Holzbach, R. 1990. Current concepts of cholesterol transport and crystal formation in human bile. *Hepatology*, 12:26S-32S.

Hoffman, Robinson and Magalhaes. 1968. *The Golden Hamster, its biology and use in medical research.* The Iowa University Press, Ames, Iowa U.S.A. Firsth edition.

Hoosier, V. & Ch.W., McPherson. 1987. Clinical chemistry and hematology. En: *Laboratory Hamsters.* Academic Press, Inc. USA., chap 3: 49.

Hunziker, J., Palacios, R., Poggio, L., Naranjo, C. and Yang, T. 1977. Geographic distribution, Morphology, Hybridization, Cytogenetics, and Evolution. En: *Mabry, T., Hunziker, J. and Difeo, D.* 1977. Creosote bush. *Biology and chemistry of Larrea in new world deserts.* Dowden, Hutchinson Ross, Inc., USA. 10-13.

Hussaini, H., Pereira, S., Murphy, G. And Dowling, H. 1995. Deoxycholic acid influences cholesterol solubilization and microcristal nucleation time in gallbladder bile. *Hepatology*, 22, 6:1735-1744.

Igimi, H. and Carey, M. 1981. Cholesterol gallstone dissolution in bile: dissolution kinetics of crystalline cholesterol (anhydrate and monohydrate) with chenodeoxycholate, ursodeoxycholate and their glycine and taurine conjugates. *J. Lipid Res.*, 22: 254-270.

Imazumi, K., Fainaru, M., and Havel, R. J. 1978. Compositions of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins. *J. Lipid. Res.*, 19:712-722.

Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la medicina tradicional mexicana. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II: 669-670.

Jones , S. B. 1987. *Sistemática Vegetal*. Mc Graw Hill 2ª edición, México. pag. 405-406.

Jungst D, Lang T, Huber P, Lange V y Paumgartner G. 1993. Effect of phospholipids and bile acids on cholesterol nucleation time and vesicular/micellar cholesterol in gallbladder bile of patients with cholesterol stones. *J. Lipid Res.* 34:1457-1464.

Kenneth, K., Carrol and Kurowska, E. 1995. Soy consumption and cholesterol reduction: Review of animal and human studies. *J. Nutrition*;125, 3S:594S-597S.

Kibe, A., Holzbach, R., La Russo, N. and Mao, S. 1984. Inhibition of cholesterol crystal formation by apolipoproteins in supersaturated model bile. *Science*, 225: 514-516.

Kibe, A., Dudley, M., Halpern, Z., Lynn, M., Breuer, A. and Holzbach, R. 1985. Factors affecting cholesterol monohydrate crystals nucleation time in model systems of supersaturated bile. *J. Lipid Res*, 26:1102-1111.

Kritchevsky , D. and Klurfeld, D. 1983. Gallstone formation in hamster: effect of varying animal and vegetable protein levels. *Am. J. Clin. Nutr.*, 37:802-804.

Kritchevsky, D., Teppper, S. and Klurfeld, D. 1984. Effect of pectin and cellulose on formation and regression of gallstones in hamsters. *Experientia*, 40:350-351.

Kritchevsky , D. 1988. Dietary fiber. *Ann. Rev. Nutr.*, 8:301-328.

Kuipers, F., Derksen, J. T. P., Gerding, A., Scherphof, G. L. and Vonk, R. J. 1987. Biliary lipid secretion in the rat. The uncoupling of biliary cholesterol and phospholipid secretion from bile acid secretion by sulfated glycolithic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 922:136-144.

Kullak-Ublick, G-A., Paumgartner, G. and F. Berr. 1995. Long-term effects of cholecystectomy on bile acid metabolism. *Hepatology*, 21, 1:41-45.

Lamont, J., Smith, B. and Moore, J. 1984. Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Hepatology*, 4:51S-56S.

Lara, F. Y Márquez, C. 1996. Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México. 59-61pp.

Lehninger, A., Nelson, D. and Cox, M. 1993-a. Biosynthesis of cholesterol, steroids, and isoprenoids. En: Lehninger *et al.* 1993. Principles of Biochemistry, chap. 20. Second edition. Worth Publishers, N.Y. 669-674 pp.

Levy, P, Smith, B. and Lamont, J. 1984. Human gallbladder mucin accelerates nucleation of cholesterol artificial bile. *Gastroenterology*, 87:270-275.

Lipsett, P., Samantary, D., Falconer, S., Kolp, R., Lillemoe, K., and Pitt, H. 1993. Pronucleating proteins localize preferentially in gallbladder biliary vesicles. *Hepatology*, 8:96A.157.

Ly, H., Francone, O., Fielding, C., Shigenaga, J., Moser, A., Grunfeld, C. and Feingold, K. 1995. *J. Lipid Res.*, 36: 1254-1263.

Mabry, T., DiFeo, D., Sakakibara, M., Bohnstedt, C. And Steiger, D. 1977. The natural products chemistry of *Larrea*. En: Mabry, T., Hunziker, J. and DiFeo, D. Creosote bush. Biology and chemistry of *Larrea* in the new world desert. Dowden Hutchinson Ross Inc. U.S.A. Chap:5, 115-134pp.

Mabry, T. And Bohnstedt, Ch. 1981. *Larrea*: A chemical resource. En: Campos, L.E., Mabry, J.J. y Fernández, T. S. 1981. *Larrea*. 2ª edición. CONACYT, México. Chap.13, 232p.

Malavolti, M., Fromm, H., Ceryak, S. and Shehan, K. 1990. Effects of bile acid depletion and of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acids on biliary protein secretion in the hamster. *Life Science*; 46, 23:1727-1737.

Malet, P., Deng and R. Soloway. 1989. Gallbladder mucin and cholesterol and pigment gallstone formation in hamster. *Scand. J. Gastroenterol.*, 24, 1055-1060.

- Martínez, M.** 1969. Las plantas medicinales de México. 5ª ed. Botas. México. 143-144 pp.
- Marzolo, M. P., Rogotti, A. and Nervi, F.** 1990. Secretion of biliary lipids from the hepatocyte. *Hepatology*, 12:134S-142S.
- Mazer, N. A. and Carey, M. C.** 1983. Quasi-elastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Cholesterol solubilization and precipitation in model bile solutions. *Biochemistry*, 22:426-442.
- Méndez, N., Jessurum, J., Ponciano, G., Uribe, M., Hernández-Avila, M.** 1993. Prevalence of gallstone disease in mexican population. *Dig. Dis. Sci.*, 38:680, 1993.
- Méndez, N., Ponciano, G., Jessurum, J., Alonso, P., Romero, P. and Uribe, M.** 1995. Gallstone composition in mexican patients. *Arch. Medical Res.*, 36, 4:415-419.
- Mitchell, C. y Rook, A.** 1979. Toxicidad. En: INI. 1994. Biblioteca de la medicina tradicional mexicana. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II: 669-670.
- Nervi, F., Bronfman, M. Allalon, W., Depiereux, E., and Del Pozo, R.** 1984. Regulation of biliary cholesterol secretion in the rat. Role of hepatic cholesterol esterification. *J. Clin. Invest.*, 74:2226-2237.
- Nervi, F., Marinovic, Y., Rigotti, A. and Ulloa, N.** 1988. Regulation of biliary cholesterol secretion: functional relationship between the canalicular and sinusoidal cholesterol secretory pathways in the rat. *J. Clin. Invest.*, 82:1818-1825.
- Nervi, F., Covarrubias, C., Bravo, P., Velásco, N., Ulloa, N., y Cruz, F., Fabra, M., Servén, C., Del pozo, R., Antezana, C., Valdivieso, V., and Arteaga, A.** 1989. Influence of legume intake on biliary lipids and cholesterol saturation in young Chilean men. *Gastroenterology*, 96:825-830.
- Nestel, P., Reardon, M., and Billington, T.** 1979. *In vivo* transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to very low density lipoproteins in man. *Biochim. Biophys. Acta*, 573:403-407.
- Nguyen, T. y Canada, A.** 1993. Citrus flavonoids stimulate secretion by human colonic T₈₄ cells. *Am. Institute of Nutrition*. 259-268.
- Nilsell, K., Angelin, B., Liljeqvist, L. and Einarsson, K.** 1985. Biliary lipid output and bile acid kinetics in cholesterol gallstones disease. *Gastroenterology*, 89:287-293.

Noriega, J. M. 1923. Contribución al estudio de la gobernadora. Laboratorio Industrial Experimental del Departamento de Industrias. Sria. de Industrias, Comercio y Trabajo. México. 7 p.

Oliveto, E. 1972. Nordihydroguaiaretic acid, a naturally occurring antioxidant. *Chemistry and Industry*, 2:677-679.

Park, Y., Igimi, H. and Carey, M. 1984. Dissolution of human cholesterol gallstones in stimulated chenodeoxycholate-rich and ursodeoxycholate-rich bile. An in vitro study of dissolution rates and mechanisms. *Gastroenterology*, 87, 1:150-158.

Pattinson, N. 1985. Solubilization of cholesterol in human bile. *FEBS Lett.*, 181:339-342.

Pattinson, N., Willis, K. and Frampton. 1991. Comparative analysis of cholesterol transport in bile from patients with and without cholesterol gallstones. *J. Lipid Res.*, 32:205-214.

Peled, Y. and Gilat, T. 1994. Effect of dietary phospholipids and their constituents on bile composition in rats and hamsters. *Hepatology*: 708.

Pemsingh, R., McPherson, B. and Scott, G. 1987. Mucus hypersecretion in the gallbladder epithelium of ground squirrels fed a lithogenic diet for the induction of cholesterol gallstones. *Hepatology*, 7:1267-1271.

Potter, S. M. 1995. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J. Nutrition*, 125, 3S:606S-611S.

Prosser, C. L. 1973. Comparative animal physiology. Vol. Y Environmental physiology. Saunders Company, U.S.A. 122 p.

Redgrave, T.G. 1970. Formation of colesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *J. Clin. Invest.* 49: 465-471.

Reuben, A. 1984. Biliary proteins. *Hepatology*, 4: 46S-50S.

Rhoades, D. F. 1977. The antiherbivore chemistry of *Larrea*. En: Mabry, T., Hunziker, J. and Difeo, D. 1977. Creosote bush. Biology and chemistry of *Larrea* in new world deserts. Dowden, Hutchinson Ross, Inc., USA. Chap. 6: 135-138.

Robins, S. J., and Fasulo, J.M., Collins, M. A. and Patton, G. M. 1985. Evidence for separate pathways of transport of newly synthesized and preformed cholesterol into bile. *J. Biol. Chem.*, 260:6511-6513

- Robinson.** 1983. The organic constituents of higher plants. 1^a edition. Cordus Press, USA. Chapter 4. pags: 54-86.
- Roda, E., Morselli, A., Sama, C., Festi, D. and Barbara, L.** 1989. Epidemiology of gallstones disease. En: Biliary lithotripsy. Ferruci, J., Dellius, M. and Burhene, H. Eds. Publisher Inc., Chicago. 121-138 pp.
- Roda, A., Pellicciari, R. et al.** 1995. Metabolism, pharmacokinetics, and activity of a new 6-fluoro analogue of ursodeoxycholic acid in rats and hamsters. Gastroenterology, 108:1204-1214.
- Romero, A. L. And M. L. Fernandez.** 1996. Dietary fat amount and carbohydrate type regulate hepatic acyl CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) activity possible links between ACAT activity and plasma cholesterol levels. Nutrition Research, Vol. 16. No. 6:937-948 pp.
- Romo de Vivar, A.** 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa, México. 56-56p.
- Rzedowsky, J., Huerta, M.** 1994. Matorral xerófilo. En: La Vegetación de México. 6^a edición. Limusa, México. 237-261.
- Sackmann, M., Delius, M., Saurbruch, T. et al.** 1988. Shock-wave lithotripsy of gallbladder stones. The first 175 patients. N. England. J. Med., 318:393-397.
- Salen, G., Nicolau, G., Shefer, S. and Mosbach, E.** 1975. Hepatic cholesterol metabolism in patients with gallstones. Gastroenterology, 69:676-684.
- Schlierf, G. Schellenberg, B., Stiehl, A., Czygan, P. and Oster, P.** 1981. Biliary cholesterol saturation and weight reduction: effect of fasting and low calorie diet. Digestion, 21:44-49.
- Segura, J. y C. Calzado.** 1981. Possible amebicidal activity of *Larrea*. En: Campos, E., Mabry, T. and Fernandez, S. 1981. *Larrea*. CONACyT. México. 317-326.
- Sherlock, S.** 1981. Diseases of the liver and biliary sistem. 7th Edition. Blackwell Scientific Publications. London. 727-737 pp.
- Siegel, H.** 1985. The hamster. Reproduction and behavior. Plenum press, N. Y. 440 p. Anatomy and Physiology of hamster gastrointestinal tract: 363-366.
- Sirtori, C. R.** 1995. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. J. Nutrition. 125:598S-605S.

Sleisenger, H. and Fordtran, J. 1985. Enfermedades gastrointestinales: Fisiopatología, Diagnóstico, Tratamiento. 3a. ed. Panamericana, Argentina. Vol 2: 1682-1686.

Smith, R. 1973. The excretory function of bile. Chapman & Hall. London, pp 9-15.

Smith, J., Schinkel, A., et al. 1993. Homozygous disruption of the murine *mdr2* p-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75:451-462. En: Verkade, H., Vonk, R., and Kuipers, F. 1995. New insights into the mechanism of bile-induced biliary lipid secretion *Hepatology*, Vol 21, 4:1174-1185

Soloway, R. Trotman, B. and Ostrow, J. 1977. Pigment gallstones. *Gastroenterology*, 72: 167-182.

Sömjen, J. G., and Gilat, T. 1985. Contribution of vesicular and micellar carriers to cholesterol transport in human bile. *J. Lipid. Res.*, 26:699-704.

Spady, D. and Dietschy J. 1983. Sterol synthesis *in vivo* in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster and rat. *J. Lipid Res.*, 24:303

Spady DK, Turley SD y Dietschy J. M. 1983. Comparison of the role of hepatic cholesterol synthesis and lipoprotein cholesterol uptake in determining the rate of biliary cholesterol secretion in the hamster. En: Bile acids and cholesterol metabolism in health and disease. 1983. Falk Symposium 33. Paumgartner G, Stiehl A y Gerok W (Eds). MTP Press Ltd, Boston, Chapter 22, pp157-173.

Stange, E. F., and Dietschy, J. M. 1985. Cholesterol absorption and metabolism by the intestinal epithelium. In: Sterols and bile acids, edited by H., Danielsson and J. Sjövall, pp. 121-149. Elsevier Science Publishers B. V., New York.

Stone, B., Erickson, Craig, W. and Cooper, A. 1985. Regulation of rat biliary cholesterol secretion by agents that alter intrahepatic cholesterol metabolism. *J. Clin. Invest.*, 76:1773-1781.

Stone, B., Gavalier, J., Belle, S., Shreiner, D., et. al. 1988. Impairment of gallbladder emptying in diabetes mellitus. *Gastroenterology*, 95:170-176.

Stone, B., Ansel, H., Peterson, F. and Gebhard, R. 1992. Gallbladder emptying stimuli in obese and normal-weight subjects. *Hepatology*, 15:795-798.

Swidsinski, A., Ludwig, W., Pahlig, H., and Priem, F. 1995. Molecular genetic evidence of bacterial colonization of cholesterol gallstones. *Gastroenterology*, 108, 3:860-864.

- Tanimura, H.** 1965. Experimental studies on the etiology of cholelithiasis. Arch. Fur Jap. Chir., V. 34:1160-1179.
- Tanno, N., Koizumi, M. and Goto, Y.** 1988. The relationship between cholelithiasis and diabetes mellitus. Tohoku J. Exp. Med., 154:11-20.
- Terpstra, A., Laitinen, M., Stucchi, A., and Nicolosi, Ph.** 1994. The effect of semipurified diets containing two levels (20% and 40%) of either casein or soybean protein isolated and concentrate on plasma lipids in hamsters. Nutrition research; 14, 6:885-895.
- Thistle, J., May, G., Bender, C.** 1989. Dissolution of cholesterol gallbladder stones by methyl ter-butyl ether administered by percutaneous transhepatic catheter. N. Engl. J. Med., 320:633-639.
- Thompson, J., Fried, G., Ogden, W., Fagan, C., Inque, K., Woener, Y. and Watson, L.** 1982. Cirrelation between release of cholecystokinin and contraction of the gallbladder in patients with gallstones. Ann. Surg., 195: 670-676.
- Thornton, J., Emmett, P. and Heaton, K.** 1983. Diet and gallstones: effects of refined and unrefined carbohydrate diets on bile cholesterol saturation and bile acid metabolism. Gut, 24:2-6.
- Timmermann, B.** 1977. Practical uses of *Larrea*. En:Mabry, T., Hunziker, J. and Difeo, D. 1977. Creosote bush. Biology and chemistry of *Larrea* in new world deserts. Dowden, Hutchinson Ross, Inc., USA., 252-257.
- Timmermann, B.** 1981. *Larrea*: Potential uses. En:Campos, L., Mabry, J. y Fernández, T. 1981. *Larrea*. 2ª edición. CONACYT, México. Cap. 14, 241 pag.
- Trayhurn, P.** 1980. Fatty acids synthesis in brown adipose tissue in relation to whole body synthesis in the cold acclimated golden hamster (*Mesocricetus auratus*), Biochem. Biophys. Acta, 620:10-17.
- Trotman, B. and Soloway, R.** 1975. Pigment vs cholesterol cholelithiasis: clinical and epidemiological aspects. Dig. Dis., 20: 735-740.
- Trotman, B. and Soloway, R.** 1982. Pigment gallstones disease: summary of the National Institute Health - International Workshop. Hepatology, 2:879-884.
- Turley, S. and Dietschy, J.** 1978. Reevaluation of the 3-alfa-hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. J. Lipid Res., 19:924.
- Turley, S. and Dietschy, J.** 1979. Regulation of biliary cholesterol output in the rat: Dissociation from the rate of hepatic cholesterol synthesis, the size of the hepatic

cholesteryl ester pool, and the hepatic uptake of chylomicron cholesterol. *J. Lipid. Res.*, 20:923-934.

Turley, S. and Dietschy, J. 1982. Cholesterol metabolism and excretion. En: Arias, Y., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz, D. Eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*, N.Y. Revan Press 467-492 pp.

Turley, S. and Dietschy, J. 1988. The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. En: Arias, Y., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz, D. Eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*, N.Y. Revan Press 617-637 pp.

Tyroler, H., Glueck, J. and Christensen, B. 1980. Plasma high density lipoprotein cholesterol comparisons in black and white population. *Circulation*, 62: 99-107.

Van Erpecum, K., Henegouwen, G., Stoelwinder, B., Schmidt, Y. and Willekens, F. 1990. Bile concentration is a key factor for nucleation of cholesterol crystal and cholesterol saturation index in gallbladder bile of gallstone patients. *Hepatology*, 11:1-6.

Verkade, H., Vonk, R., and Kuipers, F. 1995. New insights into the mechanism of bile-induced biliary lipid secretion *Hepatology*, Vol 21, 4:1174-1185.

Vezina, W., Paradis, R., Grace, D., Zimmer, R., et. al. 1990. Increased volume and decreased emptying of the gallbladder in large (morbidly obese, tall normal and muscular normal) people. *Gastroenterology*, 98:1000-1007.

Ward, A., Brosden, R., Heel, R., Speight, T. And Avery, G. 1984. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacologic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 27: 95-131.

Waterhouse, C. 1840. Proceedings of learned societies, Zoological Society, April 9, 1839, *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 4:445-446. En: Siegel, H. 1985. *The Hamster. Reproduction and behavior.* Plenum Press, N.Y. 18p.

Yamada, N., Shames, D., Stoudemire, J., and Havel, R. 1986. Metabolism of lipoproteins containing apolipoprotein presence of apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3479-3483.

Yamashita, G., Corradini, S., Secknus, R., Takabayashi, A., Williams, C., Hays, L., Chernosky, A. and Holzbach, R. 1995. Biliary haptoglobin, a potent promoter of cholesterol crystallization at physiological concentrations. *J. Lipid R.*, 36:1325-1333.

Zamora, J. y Mora, E. 1985. *Farmacologia*. En: INI. 1994. *Biblioteca de la medicina tradicional mexicana*. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II: 669-670.

Zhang, J-X., Bergman, F., Hallmans, G., Johansson, G., Lundin, E., Stenling, R., Theander, O. and Westerlund, E. 1990. The influence of barley fibre on bile composition, gallstone formation, serum cholesterol and intestinal morphology in hamsters. *APMIS* 98:568-574.

Zhang, J-X., Lundin, E., Hallmans, G. Bergman, F., Westerlund, E. and Petterson, P. 1992. Dietary effects of barley fibre, wheat bran and rye bran on bile composition and gallstone formation in hamsters.

Zhang, J-X., Lundin, E., Reuterving, C-O., Hallmans, G. and Stenling, R. 1994. Effects of rye bran, oat bran and soya-bean fibre on bile composition, gallstone formation, gall-bladder morphology and serum cholesterol in Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *British Journal of Nutrition*, 71:861-870.