

0034324<sup>2</sup>



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**LOS ACIDOS BILIARES  
QUENODESOXICOLICO, URSODESOXICOLICO  
Y DEHIDROCOLICO EN LA COLELITIASIS  
PIGMENTARIA DEL HAMSTER DORADO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
ACADEMICO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS

BIOLOGIA ANIMAL

P R E S E N T A :

**ROCIO BERNAL BASAVILBAZO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ**

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

266257<sup>1998</sup>



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.

*A Dios*

*A mi Madre*

*A mis Hermanos*

*A la Dra. María Cristina Pérez-Amador*

*A mis amigos*

*Y a todos aquellos que esta vez si pensaron que no lo lograría*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al personal del Bioterio y del Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias por su colaboración y asesoría en el cuidado de los animales y la determinación del perfil de ácidos biliares mediante HPLC.

A mi honorable jurado.

Gracias a las siguientes personas, por su ayuda incondicional y sus consejos:

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

Dra. María Luisa Fanjul De Moles

Biol. Rafael Serrano Velázquez

Dr. Roberto Caballero Pérez

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

A la Facultad de Ciencias, a la UNAM y a CONACyT por el apoyo académico y económico que me permitió realizar estos estudios.

A mi familia y a todos mis amigos quienes me impulsaron en todo momento a continuar a pesar de los múltiples obstáculos.

Gracias a todos aquellos que me ayudaron directa e indirectamente en la realización de este trabajo y también agradezco a todos aquellos me han dado la oportunidad de saber reconocer la verdadera amistad.

Por último, no tengo palabras para expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me mostraron su apoyo y amistad en los momentos más difíciles de mi vida.

Este trabajo se realizo gracias al apoyo del CONACyT

Esta tesis se llevo a cabo en el Laboratorio de Biología Animal Experimental de la  
Facultad de Ciencias, UNAM  
Bajo la asesoría del Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

*"PARA QUE PUEDA SER, HE DE SER OTROS, SALIR DE MI,  
BUSCARME ENTRE LOS OTROS, LOS OTROS QUE NO SON SI  
YO NO EXISTO, LOS OTROS QUE ME DAN PLENA  
EXISTENCIA"            OCTAVIO PAZ.*

## RESUMEN

En esta investigación se presentan los resultados de 2 experimentos que se llevaron a cabo con el fin de estudiar el efecto de los ácidos biliares quenodesoxicólico (AQDC), ursodesoxicólico (AUDC) y dehidrocólico (ADHC) sobre la litogenicidad de la dieta litogénica no purificada a base de glucosa (DLG) y una dieta semipurificada (DLSP) a base de caseína, glucosa y vitamina A, desarrollada en este trabajo. El diseño de los experimentos consistió en formar grupos de hámsters machos adultos jóvenes, a los que se les dieron las diferentes dietas *ad libitum*. El primero se realizó para estudiar el efecto de los ácidos biliares sobre la DLG adicionados separadamente a la dieta al 0.1% para los tres y también al 0.5% para el ADHC; en este experimento se utilizó la dieta comercial Nutricubos Purina para roedores pulverizada adicionada de 50% de glucosa anhidra (DLG) y los animales se alimentaron durante de 60 días. En el 2o experimento se estudio de igual manera el efecto de los tres ácidos biliares al nivel de 0.1% sobre la DLSP durante 21 días. Al término de los períodos experimentales, se obtuvo bilis hepática. En ambos experimentos se determinó el efecto sobre la frecuencia de litiasis, la composición de la bilis, incluyendo el perfil de sales biliares, el peso corporal y el hepático.

Los resultados del ensayo de los ácidos biliares mostraron que el AQDC y el AUDC previenen significativamente la litiasis en ambas dietas ( $P < 0.05$ ). Asimismo, el AQDC enriqueció la composición biliar con AQDC y disminuyó la de taurocolato, taurodesoxicolato y glicodesoxicolato ( $P < 0.05$ ), mientras que el AUDC incrementó los conjugados de AUDC y AQDC. El AQDC y el AUDC disminuyeron significativamente la concentración de fosfato biliar y elevaron las concentraciones de lípidos biliares, respecto a DLSP ( $P < 0.05$ ). Por otra parte, el ADHC al 0.1% mostró efectos diferentes dependiendo de la dieta, mientras que en DLG potencializó la litiasis, en DLSP la previno ( $P < 0.05$ ). En ambas dietas, el ADHC al 0.1% incrementó la proporción de glicocolato y glicodesoxicolato, el flujo biliar y la secreción de fosfato; con DLG y ADHC la concentración de fosfato es elevada, mientras que con DLSP y ADHC ésta disminuye a valores cercanos al control. Esto último al parecer, es debido a la mayor colerésis producida por 0.1% de ADHC en la DLSP, a lo cual probablemente se debe su efecto preventivo con esta dieta. Por su parte el ADHC a dosis de 0.5% en la DLG previno completamente la litiasis, lo cual se asoció con una significativa disminución en la concentración de fosfato inorgánico, debido a que, a pesar de producirse una mayor secreción de este ión, la colerésis inducida por este nivel de ADHC fue muy elevada. Así mismo, la concentración de los conjugados del ácido cólico y del ácido desoxicólico se incrementó en la bilis de animales con 0.5% de ADHC en DLG, lo que provocó un aumento en la secreción y concentración de lípidos biliares. En conclusión: la DLG y la DLSP produjeron una alta frecuencia de colelitiasis pigmentaria, lo cual se asocia con un incremento en el flujo biliar y concentración de fosfato inorgánico, y una reducción en la de lípidos biliares. La adición de AQDC y AUDC al nivel de 0.1% en ambas dietas y del ADHC al 0.5% en DLG previene la colelitiasis, mientras que el ADHC al 0.1% potencializa la litiasis en DLG y la previene en DLSP. Los efectos preventivos se relacionaron con reducción en la concentración de fosfato inorgánico biliar, mientras que la potencialización se asoció con un incremento en la concentración de este ión.



## Contenido

<b>1 Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>1.1 La colelitiasis</b>	<b>3</b>
1.1.1 Epidemiología y características clínicas de la litiasis pigmentaria	4
1.1.2 Composición química de los cálculos biliares pigmentarios.	5
1.1.3 Patogénesis de la colelitiasis	7
<b>1.2 Inducción de litiasis pigmentaria por medios dietéticos en el hámster dorado.</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Patogénesis de la litiasis pigmentaria en el hámster dorado</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Los ácidos biliares quenodesoxicólico y ursodesoxicólico y su efecto en la colelitiasis pigmentaria.</b>	<b>15</b>
<b>1.5 El ácido dehidrocólico en la prevención de la litiasis pigmentaria en el hámster.</b>	<b>17</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>20</b>
<b>HIPÓTESIS:</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL:</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES:</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIALES Y METODOS</b>	<b>23</b>
<b>Experimento 1. Efecto de AQDC , AUCD y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica no purificada de glucosa.</b>	<b>23</b>
<b>Experimento 2. Efecto de AQDC , AUCD y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica semipurificada.</b>	<b>29</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>Experimento 1. Efecto de AQDC , AUCD y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica no purificada de glucosa</b>	<b>31</b>
<b>Experimento 2. Efecto de AQDC , AUCD y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica semipurificada (DLSP).</b>	<b>39</b>
<b>4 Discusión</b>	<b>48</b>
<b>Elección de las dos dietas litogénicas.</b>	<b>48</b>
<b>Experimento 1. Efecto de AQDC , AUCD y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica no purificada de glucosa</b>	<b>52</b>
<b>Experimento 2. Efecto de AQDC , AUCD y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica semipurificada.</b>	<b>58</b>
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>6 REFERENCIAS</b>	<b>63</b>

# 1 Antecedentes

## 1.1 La colelitiasis

La colelitiasis o presencia de cálculos en la vesícula biliar o en las vías biliares es una enfermedad común en la época contemporánea.

En general, los cálculos se forman cuando ocurre un cambio en la composición de la bilis. El cambio puede resultar de un incremento o una disminución en algún componente biliar normal (es decir, en la proporción de algún electrolito, como el calcio, el fosfato inorgánico, etc; de los lípidos biliares, como las sales biliares, el colesterol o los fosfolípidos, de los pigmentos biliares, como la bilirrubina, etc.), que puede ser el responsable en la solubilización de un compuesto dado, lo que puede acarrear la sobresaturación de la bilis. Una vez que se produce ésta ocurre la nidación, secuestro y agregación del (o los) componente (s) que formará (n) parte del cálculo. Esta secuencia de eventos puede ser rápida (cuestión de días) o prolongada (en años; Trotman y Soloway, 1982).

Existen 2 diferentes tipos de cálculos que se han clasificado de acuerdo a su composición química: los cálculos de colesterol puros y mixtos, y los pigmentarios, que a su vez se dividen en cálculos negros pigmentarios, cálculos cafés pigmentarios y los cálculos de sales orgánicas e inorgánicas de calcio (Sutor y Wooley, 1973; Trotman y Soloway, 1982)

Este trabajo está enfocado al estudio de la litiasis pigmentaria en el modelo del hámster dorado.

En los países desarrollados, aparte de los grupos de riesgo elevado por causas genéticas o raciales, la incidencia de cálculos vesiculares registrada se encuentra en el orden del 10 al 20%. Excepto en estudios de poblaciones de alto riesgo, no existen datos que permitan determinar la prevalencia real de la enfermedad, ya que ésta varía dependiendo de la zona geográfica que se analice, la edad y el sexo. Por esta razón es difícil indicar con precisión la historia natural de la colelitiasis, además de que la gran mayoría de los sujetos presentan cálculos vesiculares silenciosos que permanecen sin una

sintomatología específica durante un largo periodo de tiempo, incluso durante toda la vida (Sleissenger y Fordtran, 1985).

Los cálculos, sin embargo, pueden volverse sintomáticos y provocar obstrucción del conducto cístico o colédoco, causando ictericia obstructiva y colecistitis aguda o crónica, la cual puede llegar a causar gangrena y perforación de la vesícula. La obstrucción del cístico puede también ocasionar daño a la vesícula debido a la retención de la bilis. Asimismo, el carcinoma de vesícula se encuentra generalmente asociado a la presencia de cálculos biliares y colecistitis (Sherlock, 1988).

### **1.1.1 Epidemiología y características clínicas de la litiasis pigmentaria**

En los países de Occidente la mayoría de los cálculos son de colesterol, puros o mixtos, en aproximadamente el 80 % de los casos registrados; sin embargo, los cálculos pigmentarios también son comunes, por ejemplo en México el 13.5 % de los pacientes presentan este tipo de litiasis del 15 % total de la población con cálculos (Mendez-Sánchez *et al*, 1995).

#### **Cálculos cafés**

Los cálculos cafés son identificados generalmente durante la colecistectomía. En Occidente, rara vez ocurren como una enfermedad vesicular primaria, sin embargo, la incidencia tiende a incrementarse hasta el 50 % de los casos de recurrencia de cálculos después de ciertos tratamientos y se albergan en los conductos biliares extra o intrahepáticos. Los cálculos cafés son más comunes en países Orientales y se presentan en las vías biliares e infrecuentemente en la vesícula biliar. Este tipo de litiasis se asocia con la divertícula paraveriana, condición que se piensa altera la movilidad del colédoco. Otra causa es la infección con bacterias entéricas, como *Esterichia coli* (Crowther y Soloway, 1990), además de dieta baja en proteínas (Trotman y Soloway, 1982).

### **Cálculos negros pigmentarios.**

Al igual que la litiasis café, la litiasis negra pigmentaria aumenta con la edad, lo cual puede estar determinada genéticamente (Crowther y Soloway, 1990) y la incidencia es la misma en hombres que en mujeres (Trotman y Soloway, 1975 ; Sarin *et al*, 1986 ; Méndez-Sánchez *et al*, 1995). La litiasis negra pigmentaria se asocia con la residencia en países Occidentales, a dieta alta en proteínas y carbohidratos y a la ausencia de infección biliar (Trotman y Soloway, 1982).

La población Amerindia no es afectada por esta enfermedad, mientras que en las poblaciones Hispana y Escandinava de los Estados Unidos y del Norte de Europa los casos registrados son menos frecuentes que en la población Japonesa y la del este de los Estados Unidos (Crowther y Soloway, 1990). En Japón la litiasis negra pigmentaria se presenta en un 9% de los casos y existen reportes que la asocian con la población rural más pobre (Sarin *et al*, 1986 ).

### **Cálculos de sales orgánicas e inorgánicas de calcio.**

Los cálculos de sales orgánicas e inorgánicas e calcio son un grupo heterogéneo de cálculos que se presentan con muy baja frecuencia y su distribución es amplia y no específica. Se sabe muy poco acerca de ellos. Generalmente son cálculos negros que se desarrollan en la vesícula biliar y no se asocian a infección biliar (Trotman y Soloway, 1982).

#### **1.1.2 Composición química de los cálculos biliares pigmentarios.**

La composición de los cálculos de colesterol es muy diferente a la de los cálculos pigmentarios. En el cuadro 1 puede observarse la diferencia en la composición de ambos tipos de cálculos.

### **Cálculos cafés**

Un típico cálculo café está compuesto de sales de calcio de bilirrubina hasta en un 60%, el ácido graso, comúnmente presente, es el palmitato junto una pequeña proporción

de colesterol estos componentes se encuentran inmersos en una matriz glicoproteica. Estos cálculos presentan generalmente laminaciones y se fragmentan fácilmente. Los componentes minoritarios son: el carbonato de calcio, el cual se presenta en raras ocasiones y el porcentaje de sales biliares que es mínimo (Trotman y Soloway, 1982).

### Cálculos negros pigmentarios

Los cálculos puros o negros de pigmento tienen la superficie negra y el núcleo de color café, son cálculos amorfos y quebradizos cuando se aplastan. Están compuestos principalmente por bilirrubinato de calcio, componente que se encuentra polimerizado a diferencia de los cálculos cafés y carbonato de calcio. Estos cálculos rara vez contienen colesterol y sales biliares. (Trotman y Soloway, 1982). Mediante el análisis de espectroscopia infrarroja se ha determinado que el fosfato de calcio, presente en este tipo de cálculos, siempre se encuentra en forma de hidroxiapatita ( Qiu *et al*, 1992).

**Cuadro 1 Comparación de la composición de cálculos de colesterol y pigmentarios**  
(% de peso seco inicial, d.s = desviación estándar) . Tomado de Sutor y Wooley, 1973

Composición química	Cálculos de Colesterol (n=31)		Cálculos Pigmentarios (n=25)	
	X ± d.s.	Rango	X ± d.s.	Rango
Pigmentos	0.47 ± 0.07	0-1.4	34.4 ± 3.1	8.0-9.8
Acidos biliares	0.71 ± 0.1	0.02-2.7	2.3 ± 0.3	0-6.2
Colesterol	85.2 ± 1.9	60-109	2.1 ± 1.0	0-25
Calcio	1.53 ± 0.6	0-6	9.4 ± 1.3	17-25
Fosfato	0.95 ± 0.3	0-7.8	7.7 ± 2.1	0-32
Carbonato	0.53 ± 0.4	0-8.6	6.7 ± 1.9	0-35
Sodio	0.02 ± 0.2	0-0.5	0.34 ± 0.1	0-18
Potasio	0	0	0.09 ± 0.03	0-0.5
Magnesio	0.02 ± 0.1	0-0.4	0.29 ± 0.06	0-1.1
Cenizas	3.12 ± 1.0	0-27	27.7 ± 3.4	8.2-65
Total	89.4 ± 1.5	75-110	63.7 ± 3.6	36-99
% inorgánico	89.1 ± 1.5	71-110	54.1 ± 3.9	25-105
% orgánico	60.6 ± 8.3	0-176	77.1 ± 7.1	17-142

## **Cálculos de sales orgánicas e inorgánicas de calcio.**

Los cálculos de sales orgánicas e inorgánicas de calcio se componen de diferentes combinaciones de sales de calcio. Entre ellos se encuentran los cálculos de carbonato de calcio (formados por aragonita pura, vaterita o combinadas, además de carbonato de calcio), los de fosfato de calcio (que contienen este compuesto en forma de apatita), los de palmitato de calcio y los de sales de calcio mixtas (con la combinación más frecuente de carbonato y palmitato de calcio; Sutor y Wooley , 1973)

### **1.1.3 Patogénesis de la colelitiasis**

Los mecanismos de formación para cada tipo de litiasis son diferentes (Sarin *et al*, 1986), asimismo la patogenia pigmentaria y de colesterol es mutuamente excluyente y las condiciones dentro de la vesícula puede favorecer el desarrollo de un solo tipo de cálculo biliar (Crowther y Soloway, 1990).

#### **Colelitiasis de colesterol**

La litiasis de colesterol está generalmente asociada con los siguientes cambios en la composición biliar y la vesícula: a) con la bilis vesicular sobresaturada de colesterol, es decir, la concentración de colesterol excede, la que teóricamente, los fosfolípidos y sales biliares pueden solubilizar, b) al equilibrio entre proteínas que aceleran la cristalización del colesterol (agentes nucleantes) y los que retrasan este proceso (agentes antinucleantes) y c) a defectos en la contractibilidad de la vesícula biliar (Trotman y Soloway, 1974 ; Méndez-Sánchez *et al*, 1995).

#### **Colelitiasis pigmentaria**

En base a las características epidemiológicas y clínicas, y a la composición química de los cálculos pigmentarios, se sabe que el desarrollo de esta litiasis se realiza por diferentes mecanismos (Trotman y Soloway, 1982).

Aunque la etiología de esta litiasis en el humano no está comprendida en su totalidad, se tiene el antecedente de que, la precipitación del calcio y de la bilirrubina no conjugada en forma de sales de bilirrubinato de calcio juegan un papel importante en la formación de los cálculos pigmentarios, por lo que el conocimiento de la solubilidad y la sobresaturación biliar con estos elementos es primordial (Moore, 1985)

### **Litiasis pigmentaria café**

En la litiasis pigmentaria café se han enfatizado dos aspectos particulares, como son la infección biliar y la estasis. No obstante, no se sabe si la infección biliar es un proceso primario o secundario y si la estasis puede originarse por un desorden motor primario de los conductos biliares, lo cual provoca problemas en el vaciamiento de la bilis y como consecuencia, un cambio en la composición biliar, con la subsecuente formación del cálculo (Trotman y Soloway, 1975).

En esta litiasis la concentración de bilirrubina no conjugada puede incrementarse debido a algunos de los siguientes factores: 1) la desconjugación con la  $\beta$ -glucuronidasa de origen bacteriano o 2) la hidrólisis no enzimática (Árias *et al*, 1988), lo que produciría aniones para la formación de sales de calcio, tales como ácidos grasos y bilirrubinato.

En los cálculos cafés, además del bilirrubinato también se encuentra gran cantidad de palmitato de calcio. Este compuesto, posiblemente proviene de la hidrólisis de la lecitina efectuada por las fosfolipasas de origen bacteriano o del jugo pancreático, de la vesícula biliar o de la mucosa de las vías biliares presentes en los pacientes que padecen la enfermedad (Trotman y Soloway, 1982).

### **Litiasis negra pigmentaria.**

Por otra parte, la litiasis negra pigmentaria se presenta frecuentemente en pacientes con hemólisis (desorden fisiológico que incrementa las concentraciones de bilirrubina no conjugada) y en pacientes con cirrosis (caso en el que puede existir una combinación del incremento moderado de la bilirrubina no conjugada y que puede asociarse con hemólisis y la disminución en la concentración de sales biliares; Erlinger.

1996). En ambos casos se puede provocar la precipitación de este pigmento biliar si se alcanzan niveles de sobresaturación. Es importante señalar que existen pacientes que presentan cálculos negros pigmentarios y no tienen hemólisis o cirrosis. En ellos probablemente ocurre sobresaturación de bilirrubina no conjugada, como en aquellos pacientes, sin embargo, al parecer en este caso se requiere de un extenso período de tiempo para la formación del cálculo (Erlinger, 1996).

Otro posible evento importante que tiene, lugar en esta litiasis es la hidrólisis de la bilirrubina conjugada para producir bilirrubina no conjugada mediante la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de origen bacteriano (mecanismo postulado para la patogénesis pigmentaria café en los Japoneses, Trotman y Soloway, 1975) o ser de origen biliar o de la pared vesicular (Trotman y Soloway, 1982). El proceso de hidrólisis puede ser intermitente en la bilis de pacientes que no presentan infección biliar (Trotman y Soloway, 1975).

Otros factores relacionados con la patogenia de la litiasis pigmentaria pueden ser :

- a) Las deficiencias parciales en glucuronil transferasas, que pueden provocar altas concentraciones de monoglucoronidos de bilirrubina en la bilis (Trotman y Soloway, 1982).
- b) El papel de la secreción de glicoproteínas y la absorción de electrolitos realizada por la vesícula biliar (Trotman y Soloway, 1982).
- c) Aumento en la absorción intestinal de la bilirrubina no conjugada, como ocurre en los paciente que cursan con malabsorción de sales biliares, como resultado de la resección ileal u otros desordenes del intestino delgado. El incremento en el reciclamiento de bilirrubina no conjugada a través de la circulación enterohepática puede producir la sobresaturación biliar y la formación de cálculos con sales de bilirrubinato de calcio (Mendez-Sánchez *et al*, 1996).

Es importante resaltar, que la mayor parte de los estudios dedicados a la colelitiasis se han enfocado principalmente a la litiasis de colesterol, mientras que la patogénesis de la litiasis pigmentaria no ha sido establecida con claridad y hasta la fecha no se cuenta con un método no invasivo para su eliminación y/o prevención, a pesar de



que se presenta en un alto porcentaje de la población. Por tanto, esta litiasis amerita mayor investigación.

En un intento por conocer la patogénesis pigmentaria se han logrado inducir cálculos pigmentarios en animales, principalmente en el hámster.

### **1.2 Inducción de litiasis pigmentaria por medios dietéticos en el hámster dorado.**

La implementación de modelos animales en la investigación de la fisiología hepática en condiciones de normalidad y enfermedad es invaluable; sin embargo, las limitaciones de tipo económico, de espacio para mantener diferentes especies de animales, los problemas relacionados con la interpretación de resultados y las diferencias en la composición de sales biliares, así como las condiciones litogénicas entre estos y el hombre, han excluido en cierta forma los resultados obtenidos en tales estudios (Schoenfield *et al*, 1981; Tint *et al*, 1986). A pesar de lo anterior, la facilidad para obtener muestras del hígado, de bilis hepática y vesicular, y de la posibilidad de manipulación dietética o administración de drogas, entre otros, hace que los estudios en animales sean muy atractivos (Tint *et al*, 1986).

Una de las áreas que ofrece más probabilidades de éxito es el estudio de la regulación de los procesos enzimáticos para la síntesis de colesterol y sales biliares (Tint *et al*, 1986) y la modificación de la composición biliar en condiciones patológicas.

Son varios los animales en los que se ha logrado la inducción de cálculos de colesterol y de tipo pigmentario por diferentes métodos, sin embargo, aún no se ha establecido un modelo para la litiasis café pigmentaria (Crowther y Soloway, 1990).

El hámster ha sido elegido como modelo de litiasis debido a que la composición biliar de sales biliares es similar a la humana, en lo que se refiere a la estructura esteroide (Gurantz y Hofmann, 1984), y porque este animal conjuga los ácidos biliares con taurina y con glicina y no hidroxila a los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico en posición 6 durante su transporte hepático, como ocurre en la rata (Gurantz y Hofmann, 1984). En el cuadro 2 se presenta una comparación de la composición de sales biliares de

la bilis vesicular del hombre y del hámster. Además en el hámster se ha logrado la inducción de cálculos de colesterol y de tipo pigmentario por medio de dietas tanto semipurificadas como no purificadas.

En dietas semipurificadas se han dado a conocer los siguientes hallazgos.

Dam y Christensen (1952) introdujeron al hámster como modelo de colelitiasis. Con dietas ricas en glucosa y libres de grasa obtuvieron altas frecuencias de litiasis de colesterol y un pequeño porcentaje de litiasis pigmentaria (Dam, 1969). El porcentaje de litiasis de tipo pigmentario se incrementa cuando se sustituye la glucosa por sacarosa o con la adición de 2 % de aceite de soya o de hígado de bacalao (Dam, 1969). Los cálculos desarrollados son morfológicamente semejantes a los negros pigmentarios humanos y están compuestos por fosfato de calcio, sales biliares conjugadas con glicina y un bajo porcentaje de pigmentos biliares. Tanimura (1965) hizo modificaciones a esta dieta semipurificada. Ésta consta de 20 % de caseína, 63.5 % de glucosa, 10 % de mantequilla de leche de vaca, 0.5 % de cloruro de colina, 5 % de mezcla de minerales y 0.5% de mezcla de vitamina. Con esta dieta Wheeler, en 1973, logró la inducción de cálculos pigmentarios en el 14 % de los animales alimentados, no obstante, obtuvo un 68% de animales con cálculos de colesterol. Kritchevsky y Klurfeld (1983) dieron a conocer que si se sustituye caseína con soya en dietas libres de grasa y con alto contenido de glucosa, la frecuencia de animales con cálculos de colesterol va disminuyendo notoriamente y aumenta la de cálculos pigmentarios. La dieta de Dam o modificaciones de esta, todavía es utilizada en estudios de colelitiasis de colesterol (Crowther y Soloway, 1990).

Por su parte, Cohen *et al* (1987) iniciaron la búsqueda de un modelo de litiasis. Estos investigadores administraron dos dietas semipurificadas nutricionalmente adecuadas, una a base de soya y otra a base de caseína, a hámsteres jóvenes durante tres semanas. Estas dietas habían producido cálculos de colesterol en el perro de las praderas; sin embargo, en el hámster indujeron la formación de cálculos de tipo pigmentario en un alto porcentaje de los animales. Es importante señalar que la dieta de caseína indujo 50% de animales con cálculos en comparación con el 28% de la dieta de soya. Con respecto a lo anterior, los autores concluyeron que la adición de colesterol y estrógenos fueron los reponsables del desarrollo de la alta frecuencia de litiasis en la dieta de caseína.

Los cálculos biliares obtenidos con ambas dietas fueron negros, numerosos, amorfos, de 0.1 a 0.4 mm de longitud y estaban compuestos de 26.7% de fosfato de calcio, 12.8% de bilirrubinato, 15.1% de colesterol y 45% de proteínas.

Recientemente, Hayes *et al* (1991) han llegado a la siguiente conclusión después de sus estudios con dietas semipurificadas en el hámster: las dietas con caseína, harina de arroz, glucosa y fibra, con un mínimo contenido de ácidos grasos esenciales, pero sin colesterol, promueven la litiasis pigmentaria, mientras que, las dietas con limitado contenido de ácidos grasos, con colesterol y lactosa, promueven eficazmente la litiasis de colesterol.

Cuadro 2 Composición de ácidos biliares de la bilis vesicular en el hombre y en el hámster. \* Tomado de Arias *et al*, 1988 y de \*\*Roda *et al*, 1995.

Acido biliar	Hombre (%)*	Hámster (%)**
Glicoquenodesoxicolato	20	18
Tauroquenodesoxicolato	12	9
Glicocolato	23	40
Taurocolato	12	22
Acido cólico	/	2
Glicodesoxicolato	16	4.5
Taurodesoxicolato	8	4.5
oxodesoxicolato	0.1	/
7-oxo-colato	0.1	/
12-oxo-colato	0.4	/
Glicoursodesoxicolato	5	/
Tauroursodesoxicolato	2	/
7- $\theta$ xolitocolato	0.4	/
iso-veno-taurodesoxicolato	1	/

Por otro lado, también se han realizado investigaciones utilizando dietas no purificadas (o comerciales); por ejemplo, Granados, en 1971, observó que las dietas para ratones inducían el desarrollo de cálculos pigmentarios en el hámster (de la cepa ChCM) cuyo componente principal era el fosfato de calcio en forma de hidroxipatita.

Granados (1976a) y Cárdenas *et al* (1991) establecieron la acción litogénica pigmentaria de la mantequilla de leche de vaca, de la vitamina A, como ácido retinoico y

acetato de retinol y de carbohidratos refinados, como glucosa, sacarosa y fructosa, cuando se adicionan a la dieta no purificada de roedores y se administran por períodos superiores a 50 días. Los cálculos obtenidos en esos experimentos contienen aproximadamente 10 % de fosfato inorgánico y 20 % de calcio, que si estuviesen presentes como hidroxapatita, representaría el 50 % de la masa total del cálculo. Conviene recordar que los cálculos negros de pigmento humanos pueden contener hasta un 30 % de fosfato de calcio, el cual siempre se encuentra en forma de hidroxapatita (Crowther y Soloway, 1990); por tanto, este modelo puede ser de utilidad en la búsqueda de agentes que impidan la precipitación de sales de fosfato de calcio.

Es importante señalar que los ratones albinos alimentados con dietas litogénicas a base de mantequilla o de vitamina A no desarrollan cálculos pigmentarios, lo cual indica que la acción litogénica de estos elementos es específica del hámster dorado (Granados, 1976b)

Ahora bien, se ha observado que en las dietas no purificadas utilizadas por Granados (1971, 1976a y b) y Cárdenas *et al* (1991 y 1996), la composición de la misma afecta la litogenicidad de los factores mencionados. Así por ejemplo, la vitamina A no es litogénica cuando se adiciona a la dieta Albilab, por lo que es necesario controlar los componentes de la dieta básica en la producción de cálculos pigmentarios (Cárdenas *et al*, 1996)

### ***1.3 Patogénesis de la litiasis pigmentaria en el hámster dorado***

Después de lograr la inducción de la litiasis pigmentaria por medios dietéticos en el hámster, se ha recurrido frecuentemente al análisis de la composición biliar como un medio para tratar de comprender en parte, si no del todo, cual es el proceso que probablemente desencadena la formación de los cálculos.

Se ha observado, que en la litiasis pigmentaria producida por la dieta suplementada con 25,000 UI% de vitamina A, se observa una mayor coleresis y un incremento de 2 o 3 veces en la concentración de fosfato inorgánico. El calcio total puede elevarse ligeramente o no alterarse. Asimismo, las concentraciones de sales biliares,

colesterol y fosfolípidos disminuyen notoriamente. Esta litiasis no se asocia con hemólisis, ni con el incremento de la concentración de la bilirrubina biliar (Cárdenas *et al*, 1996).

Se ha propuesto que un evento clave, que probablemente contribuye y desencadena la formación de cálculos en este tipo de dietas, es el incremento en la concentración de fósforo inorgánico biliar, debido al incremento en su concentración en la bilis (Cárdenas *et al*, 1996). Asimismo, este componente se encuentra en elevada proporción en los cálculos producidos en el hámster con esta dieta. Adicionalmente, se ha determinado que el incremento en la concentración de fósforo inorgánico no parece deberse a la resorción ósea, ya que la excreción urinaria de este electrólito no se ve alterada (Cárdenas *et al*, 1996).

Una posible explicación del incremento en la excreción de este elemento hacia la bilis es el probable efecto que ejerce la vitamina A sobre el transportador de fósforo recientemente descubierto y caracterizado por Ghilan *et al*, en 1993 en hígado.

En la litiasis pigmentaria humana la precipitación de sales de calcio es un evento importante, porque los cálculos poseen cantidades considerables de este componente en forma de sales de bilirrubinato, carbonato y fosfato de calcio. Es por esto, que el estudio de este catión es esencial para el esclarecimiento de la patogenia de la litiasis.

El contenido de electrolitos en la bilis y el mecanismo por el cual diferentes sales biliares estimulan su secreción y solubilización en ésta han llegado a ser de relevancia para descubrir cual es el papel del calcio en la patogénesis y la calcificación de los cálculos humanos (Loria *et al*, 1989). La proporción de calcio libre, es decir la que está en forma ionizada respecto al calcio total, es mucho menor en la bilis vesicular que en el suero (aproximadamente 20-50%) debido a que en la bilis se forman complejos solubles con las sales biliares y otros componentes (Crowther y Soloway, 1990). Se estima que el 80 % de este ion se encuentra unido a micelas en la bilis hepática y de un 40-50% en la bilis vesicular (Gleeson *et al*, 1990).

El calcio puede interactuar con diferentes compuestos biliares y formar sales de calcio que pueden precipitarse. La precipitación depende, en parte, de la concentración de calcio libre (Gleeson *et al*, 1990). Se ha observado que el calcio tiene gran afinidad por

las sales biliares en concentraciones premicelares. Este catión se une a diferentes sitios de la estructura de las sales biliares, por ejemplo, a los grupos 7-hidroxilo y/o 12 hidroxilo  $\alpha$  ó  $\beta$ , carboxi terminal ( $\text{COO}^-$ ) o grupos sulfoxi ( $\text{SO}_3^-$ ), los cuales conforman un sitio de intercambio de iones, dimérico y reversible. No obstante, no se ha registrado afinidad por el grupo 12-oxo, ni por el grupo tri-oxo (es decir por el ácido dehidrocólico, Moore y Preston, 1990). La afinidad del calcio es mayor por sales biliares dihidroxiladas conjugadas con glicina y al parecer, las sales biliares monoméricas se unen más eficientemente al calcio que aquellas que se encuentran formando micelas (Gleeson *et al*, 1990).

#### **1.4 Los ácidos biliares quenodesoxicólico y ursodesoxicólico y su efecto en la colestiasis pigmentaria.**

Como ya se mencionó tanto en cálculos humanos, como en cálculos de animales el fosfato de calcio se encuentra siempre como hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ ; Crowther y Soloway, 1990). Este elemento se puede formar directamente o a través de su precursor, el fosfato de calcio amorfo, mediante un proceso de disolución y reprecipitación (Qiu *et al*, 1992) y su formación puede ser retardada o impedida mediante el uso de inhibidores, los cuales han sido divididos en dos clases de acuerdo a su modo de acción:

Tipo I.- inhibidores que se unen a la superficie del centro de crecimiento de hidroxiapatita y previenen su crecimiento.

Tipo II.- inhibidores que se unen al fosfato de calcio amorfo y retardan su disolución.

No obstante, únicamente aquellos compuestos que se unen a la superficie de los núcleos en formación reducen la cantidad de hidroxiapatita formada finalmente (Qiu *et al*, 1992).

Se ha establecido que el ácido quenodesoxicólico (AQDC) o ácido quénico es capaz de inhibir y evitar la precipitación de hidroxiapatita *in vitro*, principalmente si se encuentra conjugado con glicina. De los estudios de Qiu *et al* (1991), se determinó que la concentración adecuada para una inhibición eficiente es mayor o igual a 2 mM. Además se ha postulado que este ácido biliar actúa a través de evitar el crecimiento de los núcleos

de hidroxiapatita en formación, o sea es un inhibidor de tipo I (Qiu *et al*, 1992), ya que compite por los aniones de fosfato antes de que se unan al núcleo de formación del cálculo e inhibe de este modo su crecimiento (Qiu *et al*, 1992). Sin embargo, esto no se ha verificado *in vivo*.

El AQDC es un ácido biliar natural sin efecto colerético marcado y tóxico si se administra a altas concentraciones, debido a que causa diarrea, pues induce la secreción de agua y electrolitos en el colon, así mismo eleva las transaminasas en el suero (Danzinger *et al*, 1973 ; Kihira *et al*, 1994). Es utilizado generalmente en la disolución de cálculos de colesterol y la dosis recomendada es de 15 mg/Kg/día (Maudgal y Northfield, 1991).

Las investigaciones de Qiu *et al* en 1992 han revelado que los ácidos biliares dihidroxilados conjugados con glicina son inhibidores de la precipitación de hidroxiapatita *in vitro*. Por lo tanto, el ácido ursodesoxicólico (AUDC, el 7  $\beta$ -epímero del AQDC) puede comportarse quizá como el AQDC *in vivo*. Además existe el antecedente que evidencia que el AQDC puede ser convertido en parte a AUDC después de la formación del ácido 7-cetolitolcólico, probable intermediario, gracias a la producción de deshidrogenasas 7 $\alpha$  ó 7 $\beta$ -hidroxiesteroide de origen bacteriano en el intestino (Tint *et al*, 1986). El ácido 7-cetolitolcólico se absorbe eficientemente en el yeyuno y en el íleon, y es llevado al hígado mediante la circulación enterohepática, en donde se transforma en AQDC. El AUDC es un ácido biliar terciario y al igual que el AQDC, es un ácido biliar natural, pero más hidrofílico, que en condiciones normales se encuentra en cantidades mínimas en la bilis (Heathcote *et al*, 1994). El AUDC es extensivamente utilizado en el tratamiento para la disolución de cálculos de colesterol y otras enfermedades hepáticas, como la cirrosis. La dosis adecuada para la disolución en tal colelitiasis va de 8 a 15 mg/Kg/día (Stiehl *et al*, 1984); sin embargo, tiene la desventaja de producir la calcificación de los cálculos durante tratamientos prolongados (Maudgal y Northfield, 1991).

El AUDC es el ácido biliar menos hepatotóxico conocido y con propiedades coleréticas capaz de aumentar el flujo biliar dependiente de ácidos biliares (Dummont *et al*, 1980) y la secreción de bicarbonato (Takikawa *et al*, 1990).

Tanto el AQDC, como el AUDC han sido administrados al hámster para comprender la biodinámica en un sistema diferente al humano. Cohen *et al* (1987) administraron AQDC y AUDC a una dosis de 30 mg/Kg/día, a hámsters alimentados con una dieta semipurificada litogénica que produce cálculos pigmentarios en 28% de los animales en un período de 14 semanas. El AQDC disminuye significativamente la frecuencia de litiasis a 13 %, mientras que el AUDC muestra un menor efecto (28 % vs 18 %). La composición biliar de sales biliares tiende a enriquecerse con los conjugados de AQDC, mientras que los del AUDC solamente se elevan un 3 %. Asimismo, parece probable que parte del AUDC haya sido convertido en AQDC.

A pesar de que estos autores analizaron cambios en la composición biliar, la concentración de fosfato inorgánico no fue determinada, por lo que no se conoce como se ve afectada por la dieta litogénica y por la adición de ácidos biliares. En la figura 1 se muestra la estructura de los ácidos biliares AQDC y AUDC.

### **1.5 El ácido dehidrocólico en la prevención de la litiasis pigmentaria en el hámster.**

Otro ácido biliar que ha prevenido la formación de cálculos pigmentarios *in vivo* en el modelo del hámster, es el ácido dehidrocólico (ADHC). Granados y Cárdenas (1983) determinaron que el ADHC al nivel de 0.5% previene completamente la litiasis pigmentaria producida por la mantequilla de leche de vaca y la vitamina A adicionadas a dietas no purificadas, sin embargo, provoca hepatomegalia y reduce significativamente el peso corporal de los animales. En esta investigación no se determinó el cambio en la composición biliar, ni el probable mecanismo de prevención.

El ADHC es un compuesto sintético derivado de la oxidación del ácido cólico (Yousef *et al*, 1990), posee propiedades hidrofílicas y no forma micelas (Rahman y Coleman, 1987a).

Este compuesto ha sido utilizado en estudios experimentales para comprender la fisiología de la formación de la bilis y como estimulante del flujo biliar después de cirugía por atresia biliar en humanos (Yousef *et al*, 1990).



El ADHC tiene un alto potencial colerético, ya que se trata de un ácido biliar que no forma micelas y tiene por tanto un alto potencial osmótico. La fuerza osmótica que origina en el canalículo biliar es aproximadamente igual a su concentración, como resultado el flujo biliar es incrementado (Hardison, 1971).

Al parecer, el poder colerético de este compuesto puede deberse también a la aparición de sus metabolitos derivados, como los ácidos mono-hidroxi-diceto o los ácidos dihidroxi-monoceto que son altamente coleréticos (Soloway *et al*, 1973).

*In vitro* el ADHC no forma micelas, sin embargo *in vivo* este compuesto posiblemente es modificado por el hígado antes de ser secretado y los derivados resultantes puedan formarlas (Hardison, 1971), como por ejemplo, el ácido cólico. El ADHC puede ser modificado en el hígado en tal forma que se han reportado al menos 27 diferentes metabolitos entre los que se destaca el ácido cólico (Hardison, 1971; Yousef *et al*, 1990).

A pesar de que este ácido biliar sintético fue objeto de múltiples estudios en la época de los 70's, existen ciertas controversias en cuanto a su efecto sobre la secreción de lípidos biliares, así, se ha observado que las concentraciones de lípidos biliares no cambian después de la administración de ADHC (Soloway *et al*, 1973), otras veces se reporta una disminución en la concentración de sales biliares (en rata, perro y hombre, Yousef *et al*, 1990) o bien se reprime la secreción de fosfolípidos y colesterol (en gatos, Yousef *et al*, 1990). En un sistema de hígado perfundido se ha demostrado que la secreción de lípidos biliares aumenta con ADHC (Rhaman y Coleman, 1987b). Puesto que el ADHC puede convertirse en parte a ácido cólico y éste en ácido desoxicólico, como resultado de la modificación bacteriana en el intestino, se esperaría un aumento en la secreción de lípidos biliares, debido a que estos ácidos biliares incrementan la secreción de estos lípidos biliares, sobre todo la de colesterol (Beer *et al*, 1996).

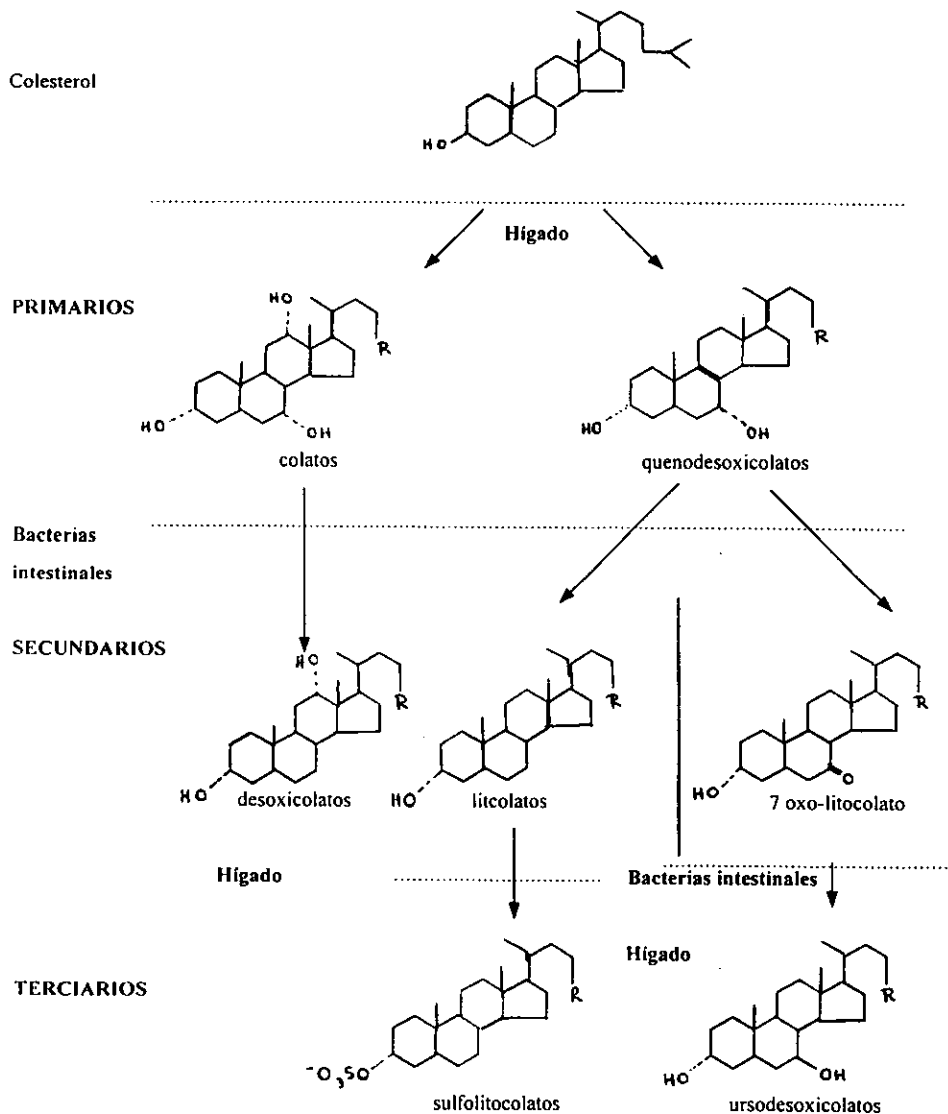


Figura 1. Representación de las sales biliares naturales primarias, secundarias y terciarias encontradas en el hombre. Tomado de Arias *et al.*, 1988. En el hígado se sintetizan los ácidos biliares primarios y son conjugados con glicina o taurina para rendir sales biliares, las cuales son secretadas a la bilis a través de los canaliculos hepáticos. Cuando la bilis llega al intestino durante la digestión, las sales biliares son captadas después de realizar su función, por los transportadores que se encuentran en la pared intestinal o en forma pasiva y retornan al hígado mediante la circulación enterohepática. Durante su trayecto por el intestino pueden sufrir modificaciones bacterianas que las transforman en sales biliares secundarias y parte de ellas son desconjugadas. Algunas, como la sal biliar 7-oxo-litocólico es modificada por el hígado y se transforma en una sal biliar terciaria. R= conjugación con glicina o taurina.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De la población total mexicana, el 15% padece de algún tipo de litiasis (es decir, aproximadamente 6 millones de personas). Se ha calculado que el costo económico del tratamiento de estos pacientes es cercano a los 1000 millones de pesos, por lo que se trata de un serio problema de salud pública (Mendez-Sánchez, *et al*, 1993). De este 15 %, el 13.5% de los pacientes presentan cálculos pigmentarios (Mendez-Sánchez, *et al*, 1995).

A diferencia de la colelitiasis de colesterol, la terapia de los cálculos pigmentarios no ha podido ser implementada, debido a las dificultades para disolver las sales orgánicas e inorgánicas de calcio. Inclusive los cálculos de colesterol calcificados solo pueden ser eliminados quirúrgicamente.

Por lo anterior se hace necesario conocer los factores que desencadenan la precipitación de estas sales insolubles de calcio, y establecer otros que puedan prevenir o al menos retrasar la precipitación, evitando de este modo la formación de cálculos pigmentarios. Actualmente parece más factible el prevenir la formación de estos cálculos que el eliminarlos por medios no quirúrgicos. La implementación de modelos animales para el estudio de la colelitiasis pigmentaria puede ayudar a esclarecer la patogénesis de esta enfermedad y a encontrar mecanismos de prevención. Así, en el hámster se pueden inducir cálculos con sales de fosfato de calcio, mediante manipulación dietética (Cárdenas *et al* 1996). Los cálculos negros pigmentarios humanos y algunos de sales inorgánicas de calcio, contienen fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita (Crowther y Soloway, 1990). Por lo tanto, este modelo puede ser de utilidad en establecer como el fosfato de calcio llega a precipitar en la bilis, y puede también servir en la búsqueda y análisis de agentes que impidan la formación de sales de fosfato de calcio, como es el caso de las sales biliares dihidroxiladas, las cuales son capaces de evitar la precipitación de hidroxiapatita *in vitro*, fenómeno recientemente dado a conocer (Qiu *et al*, 1992).

## **HIPÓTESIS:**

1. Si la precipitación de hidroxapatita *in vitro* es inhibida por la acción de las sales biliares dihidroxiladas conjugadas con glicina, especialmente el AQDC en concentraciones mayores o iguales a 2 mM (Qiu et al, 1991), entonces la adición de este tipo de sales biliares a una dieta litogénica prevendrá la precipitación de hidroxapatita en el hámster, y por tanto la litiasis pigmentaria.
2. Puesto que el AUDC también es una sal biliar dihidroxilada, y ya que parte de este ácido biliar se puede convertir en AQDC, entonces prevendrá la precipitación de hidroxapatita y la formación de cálculos pigmentarios.
3. La coleresis inducida por el ADHC provocará que se diluyan los componentes biliares, por lo que la concentración de fosfato inorgánico disminuirá y se evitará su precipitación.

## **OBJETIVO GENERAL:**

1. Estudiar el efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la frecuencia de cálculos biliares pigmentarios y la composición biliar de hámsteres alimentados con dos dietas litogénicas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Determinar el efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la frecuencia de litiasis inducida por una dieta litogénica no purificada a base de glucosa y otra semipurificada a base de caseína, glucosa y vitamina A.

2. Determinar los cambios en la composición biliar, respecto a fosfato inorgánico, calcio total, bilirrubina total, colesterol, fosfolípidos y sales biliares inducidos por el suministro de las dos dietas litogénicas adicionadas de AQDC, AUDC y ADHC.
  
3. Determinar el perfil de sales biliares en la bilis hepática de la dieta litogénica no purificada de glucosa y la dieta semipurificada mediante HPLC, solas y con los diferentes tratamientos con AQDC, AUDC y ADHC, para corroborar el aumento de sales biliares dihidroxiladas con los tratamientos de AQDC y AUDC, y determinar la composición de sales biliares con ADHC.

## 2 MATERIALES Y METODOS

**Experimento 1. Efecto de AQDC, AUDC y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica no purificada de glucosa.**

En este experimento se formaron 6 grupos de 10 animales los cuales se alimentaron con las siguientes dietas durante 60 días:

### Grupos y dietas del experimento 1.

Grupos	Dietas
Grupo 1	Nutricubos Purina pulverizados. Dieta básica (DB).
Grupo 2	DB + 50% de glucosa anhidra. Dieta litogénica (DLG).
Grupo 3	DLG + 0.1 % de AQDC.
Grupo 4	DLG + 0.1 % de AUDC.
Grupo 5	DLG + 0.1 % de ADHC.
Grupo 6	DLG + 0.5 % de ADHC.

### Animales

Se utilizaron hámsters dorados machos de la cepa ChCM de 40 días de edad promedio obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM.

### Manejo de los animales.

Los animales se colocaron aleatoriamente en una batería experimental con jaulas de acero inoxidable con piso y frente de malla metálica y fueron aclimatados a la batería y a la dieta pulverizada durante 8 días antes de iniciar el período experimental. Tanto el alimento como el agua fueron suministradas en recipientes de hierro galvanizado en forma *ad libitum*. (Las dietas se prepararon semanalmente y se mantuvieron en refrigeración.)

### Condiciones experimentales.

El fotoperiodo fue de 14h de luz y 10 de obscuridad a temperatura y humedad ambientales. Los animales fueron pesados semanalmente.

### **Dietas y suplementos dietéticos.**

La dieta básica utilizada fue la dieta Nutricubos Purina para roedores pequeños de Miles Laboratories Inc. (USA) en forma pulverizada (Proteína 23%, Grasa 6 %, Fibra 6 %, Cenizas 7 %, E.L.N. (elementos libres de nitrógeno) 46%, calcio 1 % y fósforo 0.6%, humedad 12 %; total de 340 kcal/100g dieta). La glucosa anhidra fue Poldex MA, de Arancia S.A., México. Los ácidos biliares fueron los siguientes: Acido quenodesoxicólico: Sulobil. Cápsulas de 150 mg de Laboratorios Atlantis (México), Acido ursodesoxicólico, Ursofalk. Cápsulas de 250 mg de Laboratorios Farmasa (México), Acido dehidrocólico donado por los Laboratorios Infan (México).

### **Preparación de las dietas.**

La glucosa se adicionó a la dieta pulverizada y se mezcló hasta conformar una mezcla homogénea. A la DLG pulverizada se agregaron los ácidos biliares hasta formar una mezcla homogénea. Las dietas se mantuvieron en refrigeración y se prepararon semanalmente.

### **Procedimientos quirúrgicos y obtención de bilis hepática.**

Al término del período experimental los animales, sin previo ayuno, fueron anestesiados con pentobarbital (5 mg/100 g pc Anestosal, Pfizer S.A. de C.V. México). Se insertó un catéter de polietileno PE-10 Clay-Adams Parsipany (N.J. USA) en el colédoco después de ligar el cístico, fijándose el catéter a la pared abdominal durante la colección de bilis. La colecta de bilis se realizó por un período de 90 min, en tubos siliconizados prepesados, de 2 ml de capacidad, sobre hielo y en la obscuridad para evitar la fotodegradación de la bilirrubina. El mismo día de colecta de bilis se determinó bilirrubina, calcio, fosfato inorgánico y se extrajeron los fosfolípidos. La bilis restante fue almacenada a -20 °C.

### **Flujo biliar:**

### **Flujo biliar:**

Se determinó el flujo biliar gravimétricamente, asumiendo que 1  $\mu$ l de bilis es igual a 1 mg de bilis (asumiendo una densidad igual a la del agua, es decir 1g/ml).

### **Necropsias.**

Después de la obtención de la bilis, los animales fueron sacrificados mediante fractura de la nuca. La vesícula biliar se examinó bajo microscopio estereoscópico para determinar la presencia de cálculos. Los cálculos biliares se separaron de la bilis vesicular, se lavaron con agua desionizada y se colocaron en tubos de polipropileno prepesados, en los cuales se dejaron secar y se almacenaron a temperatura ambiente.

### **Procedimientos analíticos:**

#### **Bilirrubina en bilis hepática:**

Se empleó un juego de reactivos Merckotest para bilirrubina (método colorimétrico). Los reactivos utilizados son ácido sulfanílico 29 mmol/L en HCl 0.17 N, nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) 29 mmol/L, acelerador (cafeína 130 mmol/L, benzoato de sodio 156 mmol/L, y acetato de sodio 460 mmol/L) y solución II de Fehling (tartrato de potasio y sodio 930 mmol/L en hidróxido de sodio 1,9 mol/L). Para determinar bilirrubina en bilis hepática se agregaron 10  $\mu$ l de bilis y se adicionaron 50  $\mu$ l de solución A (4:1 de ácido sulfanílico y nitrito de sodio, v/v ) y 250  $\mu$ l de acelerador, después de 10 min se agregaron 250  $\mu$ l de solución II de Fehling y se leyeron a 578 nm.

#### **Calcio en bilis hepática:**

La determinación de la concentración de calcio se realizó según el método de Baginsky (Varley *et al.*, 1980). **Reactivo para calcio:** 4 mg de cresoftaleina complexona se disolvieron en 0.1 ml de ácido clorhídrico concentrado, la solución se colocó en un volumétrico de 100 ml con 5 ml de DMSO. Se agregaron 0.25 g de 8-hidroxiquinoleína y se lava el cuello del volumétrico con otros 5 ml de DMSO. La solución se llevó a un volumen de 100 ml y se almacenó en una botella de plástico.



**Buffer de etanolamina:** 50 mg de KCN se disolvieron en 40 ml de agua desionizada, luego se agregaron 3.1 ml de etanolamina (98% d= 1.0155) y se aforó a 100 ml.

**Solución estándar de calcio:** se utilizó una solución de 15 mg/dl de calcio del juego de reactivos Hyal.

**Método:** A 5 µl de bilis hepática se agregaron 250 µl de reactivo para calcio y 250 µl de buffer de etanolamina. La medición de la absorbancia a 575 nm se determinó entre 5 y 15 minutos después de iniciada la reacción. El estándar se preparó agregando 5 µl de solución estándar y los mismos reactivos en igual proporción.

#### **Fosfato inorgánico en bilis hepática:**

Se empleó una modificación del método de Bartlett (1959): A 60 µl de bilis hepática se agregaron 90 µl de TCA (ácido tricloroacético) al 10% y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos al término de los cuales se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Se tomaron 50 µl del sobrenadante, por duplicado y se agregaron 700 µl de agua desionizada, 200 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N, 200 µl de Molibdato de amonio al 5% y 50 µl de solución reductora ( 10 mg de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 120 mg de sulfito de sodio y 600 mg de bisulfito de sodio en 5 ml de agua desionizada). Enseguida se colocan en baño de agua hirviendo por 10 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 700 nm. Se preparó una curva patrón de 1 a 3 µg de Pi, con una solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, con 80 µg de Pi/ 100ml.

#### **Fosfolípidos en bilis hepática:**

Se determinaron como fósforo lipídico por el método de Bartlett (1959).  
**Extracción:** A 50 µl de bilis hepática se agregaron 700 µl de metanol, 700 µl de agua desionizada y 1.4 ml de cloroformo. La solución se mezcló en vortex y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y se colocaron 0.4 ml en tubos de vidrio de 75 X 8 mm lavados con ácido nítrico al 50%, por duplicado.

**Ensayo:** Después de evaporadas las muestras se agregaron 200 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N y se colocaron en baño de cera a 150-160 °C durante dos horas, al término de las cuales se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se colocaron de nuevo en el baño de

cera durante 1 hora. Se dejaron enfriar y se determinó fósforo inorgánico por el método de Bartlett (1959).

#### **Sales biliares en bilis hepática:**

Para la determinación de sales biliares se empleó una modificación del método de Turley y Dietschy (1978), mediante la reacción con 3  $\alpha$ -deshidrogenasa esteroide como se indica a continuación: a 50  $\mu$ l de bilis se agregaron 450  $\mu$ l de metanol. Se colocaron 40  $\mu$ l de bilis-metanol en tubos de 10 ml por triplicado (dos para muestra y uno para blanco). A los tres tubos de cada muestra se agregaron: 500  $\mu$ l de buffer Tris-HCl pH 9.5, 330  $\mu$ l de 1 M de sulfato de hidrazina pH 9.5, 100  $\mu$ l de solución de NAD 1mM pH 7.0 (ajustada con bicarbonato de sodio). A los tubos muestra se les agregó además 40  $\mu$ l de solución de enzima 3 $\alpha$ -deshidrogenasa esteroide (2 U/ml). Al tubo blanco se le agregaron 40  $\mu$ l de buffer KP, 0.01 M pH 7.2 en vez de la enzima. Se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 340 nm contra un blanco de reactivos.

#### **Colesterol biliar**

Se determinó por método enzimático, para lo cual se empleó un juego de reactivos CHOD-PAP de Boehringer-Mannheim. El procedimiento es el siguiente : a 50  $\mu$ l de bilis (por duplicado) irradiadas con lámpara fluorescente por 3 horas en hielo se agregaron 500  $\mu$ l de reactivo CHOD-PAP y se leyó su absorbancia a 500 nm al tiempo cero y después de 15 minutos. Se corrió un estándar con 5  $\mu$ l de solución estándar de colesterol (200 mg/dl) y 500  $\mu$ l del reactivo.

#### **Determinación de los perfiles de sales biliares mediante HPLC**

El método utilizado para la detreminación de los perfiles de sales biliares por HPLC es el de Rossy *et al*, 1987.

**Purificación de la muestra:** A 4 ml de solución 0.1 N de NaOH se agregaron 100  $\mu$ l de bilis hepática. La muestra se pasó a través de un cartucho de C<sub>18</sub> de fase reversa de 500 mg bajo vacío después de haber lavado previamente el cartucho con 10 ml de agua desionizada, 4 ml de Metanol (MeOH) grado HPLC y 10 ml de agua desionizada.

Después de agregar la muestra se adicionaron 10 ml de agua desionizada y las sales biliares se extrajeron con 4 ml de MeOH. El volumen del extracto de MeOH se redujo a 1 ml  $\mu$ l Grado alta pureza (99.99%) de Linde Praxair Inc. México S.A. de C.V. y se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m antes de ser inyectada al aparato. La cantidad inyectada fue de 20  $\mu$ l por cada muestra.

**Estandares:** las soluciones estandares se prepararon pesando 5 y 10 mg de cada uno de los siguientes estandares en forma alternada: GU = glicoursodesoxicolato, TU = tauroursodesoxicolato, TC = taurocolato, GC = glicocolato, TQ = tauroquenodesoxicolato, GQ = glicoquenodesoxicolato, TD = taurodesoxicolato, GD = glicodesoxicolato, TL = taurolitocolato y GL = glicolitocolato. Los estandares se disolvieron en 1 ml de MeOH grado HPLC y de cada uno se tomaron 100 $\mu$ l de solución los cuales se colocaron en un tubo para elaborar una mezcla que contenía todos los estandares. Cada tubo de mezcla se llevo a sequedad bajo un flujo de nitrógeno.

**Fase móvil:** Consistió de metanol:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01M (75:25). Por cada litro de fase móvil se adicionaron 4.5 ml de una solución 5 N de NaOH. Se ajustó el pH a 5.35 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85%. La fase móvil se filtró a través de un filtro de nylon con exclusion de 0.45 $\mu$  (Supelco, Inc) antes de ser utilizada.

**Condiciones de la corrida:** El flujo fue de 0.45 ml/min y la corrida se llevó a cabo durante 45 min a temperatura ambiente, las sales biliares se detectaron a 200 nm.

**Aparatos y columnas:** Para la purificación de la muestra se utilizaron cartuchos de  $\text{C}_{18}$  de fase reversa Bond elut, Analytichem Int. (Harbor City, CA). El cromatógrafo de HPLC esta constituido por el sistema de bombas modelo L-7100, detector UV L-7400 y el integrador D-7500 de Merck-Hitachi y la columna utilizada en la determinación de los perfiles fue una columna de  $\text{C}_{18}$  de 5 $\mu$  de tamaño de partícula y 25cm de longitud por 4mm de diametro de Macherey-Nagel-Duren (Alemania).

### **Reactivos.**

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico o HPLC de Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo. USA) o J.T. Baker S.A. de C.V ( México).

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas ANOVA (análisis de varianza) y Bonferroni para concentración y secreción de bilirrubina total, calcio total, fosforo inorgánico, colesterol, fosfolípidos, sales biliares y perfiles de sales biliares, y  $X^2$  para la frecuencia de litiasis. Las diferencias, con un valor de  $P < 0.05$  se consideraron significativas. El análisis se llevó a cabo en el programa estadístico de computo "Primer versión 1.0" (McGraw-Hill Inc., 1988).

### **Experimento 2. Efecto de AQDC, AUCD y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica semipurificada.**

#### **Grupos.**

Se formaron grupos de 8 animales y se alimentaron con las siguientes dietas durante un período de 21 días:

#### **Grupos y dietas del experimento 2**

<b>Grupos</b>	<b>Dietas</b>
<b>Grupo 1</b>	Nutricubos Purina pulverizados. Dieta básica (DB).
<b>Grupo 2</b>	Dieta litogénica semipurificada (DLSP).
<b>Grupo 3</b>	DLSP + 0.1 % de AQDC.
<b>Grupo 4</b>	DLSP + 0.1 % de AUCD.
<b>Grupo 5</b>	DLSP + 0.1 % de ADHC.

Los animales de 50 días de edad promedio y las condiciones experimentales fueron los mismos que en el experimento 1.

#### **Dietas y suplementos dietéticos**

Dieta litogénica semipurificada de caseína (DLSP): 20 % de caseína, 68 % de glucosa, 2 % de aceite de maíz, 2.2% de mezcla de vitaminas, 4 % de mezcla de minerales, 1 % de suplemento para mezcla de minerales, 2.75% de alfaced y 0.05 % de vitamina A tipo 500 (Total : 428.45 Kcal/100g dieta). El Caseinato de calcio utilizado fue de Avary Comercial. S.A (México), el aceite de maíz Mazola, de Aceites la Central. (México). La mezcla de minerales No. 2 USP XIII, el suplemento para mezcla de minerales No. 2 USP XIII, la mezcla de vitaminas "ICN Vitamins Diet fortification" y el Alfaced de ICN Biomedicals Inc. (Cleveland. USA). La vitamina A (acetato de retinol

tipo 500) de Productos Roche (México) y la Glucosa anhidra fue Polidex MA de Arancia S.A. (México).

### **Preparación de las dietas.**

Se utilizó la misma dieta básica que en el experimento 1. Para la preparación de las dietas semipurificadas todos los ingredientes se adicionaron uno por uno, iniciando con la fuente proteica y se fueron incorporando poco a poco hasta formar una mezcla homogénea. Las dietas se mantuvieron en refrigeración y se prepararon semanalmente. Al igual que en el primer experimento, el alimento y el agua fueron suministradas *ad libitum*.

### **Determinación de los componentes en bilis hepática.**

En bilis hepática se determinaron los mismo parámetros y en iguales condiciones que en el experimento anterior; además, también se determinó la composición química de los cálculos biliares de los grupos 2,3,4 y 5, respecto a colesterol, sales biliares, fosfato inorgánico y calcio.

### **Análisis de los cálculos biliares.**

**Procesamiento de los cálculos biliares:** la cantidad que se obtuvo de los cálculos en miligramos se molió en un tubo ependorf de 0.5 ml con un capilar sellado en un extremo. Los tubos se colocaron sobre hielo y se agregaron 0.1 ml de MeOH, después se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se agitaron. Del extracto clorofórmico se tomaron 0.15 ml y se evaporaron. Al extracto se agregaron 5 µl de MeOH y se determinó la concentración de colesterol agregando 500µl de reactivo CHOD-PAP. Las sales biliares se determinaron como se mencionó antes, en 40 µl del sobrenadante del extracto clorofórmico, empleando otros 40µl como blanco. Posteriormente, a la fase acuosa se agregaron 50 µl de ácido clorhídrico concentrado para obtener la fase acuosa acidulada, en la cual se determinó calcio total y fosfato inorgánico, como se describe en el apartado de procedimientos analíticos.

### 3 RESULTADOS

Para todos los cuadros de resultados, si no existe ninguna letra igual entre los superíndices de 2 celdas dentro de la misma columna quiere decir que hay diferencia significativa entre los resultados de las 2 celdas por Bonferroni ( $P < 0.05$ ) o  $X^2$  para frecuencia de litiasis ( $P < 0.05$ ). También en los cuadros I y VIII se emplean las siguientes abreviaturas: ncs/ntot = número de animales con cálculos entre número total de animales por grupo; mg/an = mg promedio de cálculos por animal. Las celdas sombreadas indican los resultados más trascendentes de cada variable.

#### *Experimento 1. Efecto de AQDC, AUDC y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica no purificada de glucosa*

Primeramente, se describirán los resultados obtenidos en los grupos tratados con la dieta litogénica de glucosa, para posteriormente tratar los obtenidos con AQDC, luego los de AUDC y por último los de ADHC al 0.1% y al 0.5%.

En los animales que recibieron la dieta litogénica de glucosa (DLG) sola o adicionada de AQDC o AUDC, no se afectó ni el peso corporal ni el peso del hígado (cuadro I).

Con la DLG se observó una alta frecuencia de litiasis (75%) y los cálculos fueron semejantes en apariencia a los obtenidos en experimentos con dietas litogénicas de vitamina A (Cárdenas *et al*, 1996), esto es, son numerosos, amorfos, verde oscuros y duros (cuadro I). La concentración de fosfato inorgánico se incrementó al doble del valor normal ( $P < 0.05$ ) y su secreción casi 3 veces (cuadros II y III). La concentración de calcio total no se vio afectada, mientras que la de bilirrubina disminuyó considerablemente ( $P < 0.05$ ), aunque la secreción de esta última no se modificó (cuadros II y III).

**Cuadro I. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre el peso corporal, el hepático, la frecuencia de litiasis y la masa de los cálculos de hámsteres alimentados con DLG.**

Grupos y Dietas	Diferencia de peso corporal en 60 días (g)	Peso porcentual del hígado	Frecuencia de litiasis		Masa de cálculos	
			ncs/ntot	%	tot(mg)	mg/an.
1 Purina (DB)	14 ± 6.4* n=12	3.6 ± 0.3* n=12	0/12*	0	0	0
2 DB + 50% glucosa (DLG)	14 ± 6.4* n=12	3.9 ± 0.3* n=12	2/12	17%	23.3	1.11
3 DLG + 0.1% AQDC	19 ± 6* n=12	4 ± 0.4* n=12	10/12	83%	10.5	0.88
4 DLG + 0.1% AUDC	19 ± 6.6* n=12	4 ± 0.3* n=12	10/12	83%	10.5	0.88
5 DLG + 0.1% ADHC	17 ± 4* n=12	4 ± 0.3* n=12	10/12	83%	10.5	0.88
6 DLG + 0.5% ADHC	13 ± 11* n=12	3.6 ± 0.3* n=12	0/12*	0	0	0

En este experimento se encontró que con **DLG** sola la concentración de lípidos biliares disminuyó, aunque solo significativamente para colesterol y sales biliares, mientras que la secreción de sales biliares y fosfolípidos fue similar a la del **control** (Grupo 1) y solo la de colesterol disminuyó (cuadros IV y V).

En el grupo de **AQDC**, 8 animales presentaron el hígado pálido y con los lobulillos muy marcados, lo cual denota cierta toxicidad. La frecuencia de litiasis disminuyó significativamente al comparar con el grupo de **DLG** (Grupo 2); esto es, únicamente 2 animales desarrollaron cálculos pigmentarios, sin embargo 4 animales no considerados dentro de este porcentaje presentaron formaciones translúcidas y gelatinosas en muy baja cantidad, que no tenían la apariencia de cálculos de colesterol; estas

formaciones no fueron analizadas debido a la cantidad obtenida. El flujo biliar fue similar al presentado con la dieta de glucosa y la concentración de fosfato inorgánico se aproximó a valores normales (cuadro II), así mismo, su secreción disminuyó, y aunque no fue significativamente diferente a la de los animales con la DLG, tampoco lo fue respecto al control (cuadro III); la concentración de calcio total se incrementó solo ligeramente ( $P < 0.05$ ) y la de bilirrubina se mantuvo como en el grupo de DLG (cuadro II); la secreción de calcio y de bilirrubina no fue significativamente diferente al control (cuadro III).

Cuadro II. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre el flujo biliar y la concentración de fosfato inorgánico, de calcio y de bilirrubina en bilis hepática de hámsteres alimentados con DLG.

Grupos y Dietas	Flujo biliar $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{gpc}$	Fosfato inorgánico mM	Calcio total mg/dl	Bilirrubina total mg/dl
1 Purina (DB)	$4 \pm 1^a$ n=10		$9.3 \pm 1^a$ n=11	$10.4 \pm 2.4^a$ n=11
2 DB + 50% glucosa (DLG)	$6.3 \pm 1.4^b$ n=9	$3.1 \pm 0.6^b$ n=11	$9 \pm 1.4^a$ n=10	$5.4 \pm 2.3^b$ n=10
3 DLG + 0.1% AQDC	$6.8 \pm 1.4^b$ n=9			$5.5 \pm 1.3^b$ n=11
4 DLG + 0.1% AUDC	$7.7 \pm 1.7^b$ n=11	$2.6 \pm 0.6^c$ n=11	$8.1 \pm 0.7^a$ n=11	$4.34 \pm 1.2^b$ n=11
5 DLG + 0.1% ADHC	$8.3 \pm 1.2^b$ n=9	$3.3 \pm 0.6^b$ n=11	$8.1 \pm 0.9^a$ n=11	$4.5 \pm 1.6^b$ n=11
6 DLG + 0.5% ADHC			$8.8 \pm 2.2^a$ n=7	$4.6 \pm 1.2^b$ n=7

Por otra parte, las concentraciones de colesterol y fosfolípidos se incrementaron significativamente por encima de los niveles normales, la de sales biliares también se incrementó respecto a DLG sola (Grupo2), aunque no fue diferente al control (cuadro IV), mientras que la secreción de colesterol, fosfolípidos y sales biliares aumentó considerablemente respecto del valor control y de DLG.



En el grupo tratado con AUDC, solamente 1 hígado mostró los lobulillos marcados. Este ácido biliar previnó completamente la litiasis, sin embargo, cabe mencionar, que tres animales desarrollaron precipitados gelatinosos, que no eran cálculos pigmentarios, por lo que no se tomaron en cuenta dentro del porcentaje de animales con litiasis. En este grupo, la concentración de fosfato inorgánico disminuyó y las de calcio total y bilirrubina no cambiaron con respecto a la DLG. La secreción de fosfato inorgánico, calcio y bilirrubina fue similar a la del grupo con DLG sola (cuadro III).

Respecto a los lípidos biliares, el AUDC, al igual que el AQDC, también elevó la concentración de colesterol al compararlo con el grupo de DLG sola, pero en menor grado; así mismo, restableció las concentraciones de fosfolípidos y sales biliares a niveles control (cuadro IV). Al igual que el AQDC, la secreción de fosfolípidos y sales biliares se incrementaron significativamente en relación al grupo control (Grupo 1), mientras que la de colesterol se incremento respecto a DLG sola (Grupo 2) hasta ser similar a la del control (cuadro V).

**Cuadro III. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre el flujo biliar y la concentración de fosfato inorgánico, de calcio total y de bilirrubina total en bilis hepática de hámsters alimentados con la dieta litogénica de glucosa.**

Grupos y Dietas	Fosfato inorgánico nm/min/100gpc	Calcio total nm/min/100gpc	Bilirrubina total nm/min/100gpc
1 Purina (DB)		0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> n=10	0.4 ± 0.12 <sup>a</sup> n=10
2 DB + 50% glucosa (DLG)	18.2 ± 5.5 <sup>b</sup> n=9	0.55 ± 0.16 <sup>a</sup> n=9	0.34 ± 0.13 <sup>a</sup> n=9
3 DLG + 0.1% AQDC	13.3 ± 7.02 <sup>ab</sup> n=10	0.71 ± 0.16 <sup>a</sup> n=10	0.35 ± 0.06 <sup>a</sup> n=10
4 DLG + 0.1% AUDC	21.6 ± 9 <sup>bc</sup> n=10	0.62 ± 0.12 <sup>a</sup> n=11	0.32 ± 0.07 <sup>a</sup> n=11
5 DLG + 0.1% ADHC		0.66 ± 0.12 <sup>a</sup> n=11	0.4 ± 0.07 <sup>a</sup> n=9
6 DLG + 0.5% ADHC			

**Cuadro IV. El efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la concentración de Colesterol, fosfolípidos y sales biliares en bilis hepática de hámsters alimentados con la dieta litogénica de glucosa.**

Grupos y Dietas	Colesterol $\mu\text{M}$	Fosfolípidos $\text{mM}$	Sales biliares $\text{mM}$
1 Purina (DB)	$275.7 \pm 103^b$ n=10	$2.6 \pm 0.5^b$ n=7	$3.5 \pm 1.3^b$ n=10
2 DB + 50% glucosa (DLG)	$73 \pm 31^a$ n=10	$2.2 \pm 0.2^b$ n=7	$3.4 \pm 0.8^a$ n=9
3 DLG + 0.1% AQDC	$54.9 \pm 19.3^a$ n=11	$1.6 \pm 0.2^a$ n=7	$2.2 \pm 0.4^a$ n=10
4 DLG + 0.1% AUDC	$194 \pm 119^b$ n=11	$2.7 \pm 0.6^b$ n=8	$5.2 \pm 1.3^{ab}$ n=11
5 DLG + 0.1% ADHC	$127 \pm 101^b$ n=11	$1.7 \pm 0.3^a$ n=8	$3.5 \pm 1.2^a$ n=11
6 DLG + 0.5% ADHC	$147 \pm 110^b$ n=7	$2.6 \pm 0.2^b$ n=7	$3.5 \pm 1.2^a$ n=7

Ahora bien, el **ADHC** mostró efectos diferentes a los observados con los ácidos biliares dihidroxilados **AQDC** y **AUDC**. El peso del hígado únicamente se incrementó en los grupos de **ADHC** al 0.1 % y 0.5% (cuadro I).

El **ADHC** al 0.1% aumentó la frecuencia de litiasis pigmentaria del 75% al 83.3% (diferencia no significativa) y también incrementó la masa de cálculos y el tamaño de los mismos. El flujo biliar fue el doble del valor normal y las concentraciones de fosfato inorgánico, calcio total y bilirrubina, fueron similares a las presentadas por el grupo con **DLG** (cuadro II). En cambio, la secreción de fosfato inorgánico se incrementó significativamente al compararlo con la **DLG** sola y 4 veces respecto del valor normal (cuadro III); mientras que, como sucedió con los otros ácidos biliares, la concentración y la secreción de calcio y bilirrubina fueron similares a los de **DLG** sola (cuadros II y III).

Respecto a los lípidos biliares, este ácido biliar tiende a incrementar la concentración y la secreción de colesterol, casi a niveles normales; mientras que la

concentración de fosfolípidos disminuyó ( $P < 0.05$ ), aunque su secreción fue la misma que la presentada en el grupo de DLG (cuadros IV y V). La concentración y secreción de sales biliares no fueron significativamente diferentes con respecto a la DLG, aunque la secreción tendió a incrementarse (cuadros IV y V).

**Cuadro V. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la secreción de colesterol, fosfolípidos y sales biliares en bilis hepática de hámsters alimentados con DLG.**

Grupos y Dietas	Colesterol nmol/min/100gpc	Fosfolípidos nmol/min/100gpc	Sales biliares nmol/min/100gpc
1 Purina (DB)	$0.4 \pm 0.16^{a,b}$ n=10	$9.5 \pm 3^a$ n=7	$28 \pm 6^a$ n=8
2 DB + 50% glucosa (DLG)	$0.2 \pm 0.07^{a,b}$ n=11	$13 \pm 3.5^a$ n=7	$21 \pm 5^a$ n=9
3 DLG + 0.1% AQDC	$0.9 \pm 0.3^a$ n=9	$25 \pm 5^a$ n=7	$34 \pm 8^b$ n=10
4 DLG + 0.1% AUDC	$0.5 \pm 0.3^{a,b}$ n=11	$22.2 \pm 6^a$ n=8	$36.2 \pm 8.6^b$ n=9
5 DLG + 0.1% ADHC	$0.4 \pm 0.3^{a,b}$ n=9	$13.5 \pm 5^a$ n=8	$30 \pm 12^a$ n=11
6 DLG + 0.5% ADHC			

Con ADHC al 0.5% los animales lucían muy deteriorados y débiles, además este ácido biliar indujo hepatomegalia (cuadro I). Con este nivel de ADHC se previno completamente la litiasis. El flujo biliar se incrementó casi 5 veces sobre el valor control y la concentración de fosfato inorgánico retorno a niveles normales, además de que no cambió las concentraciones de calcio total y de bilirrubina (cuadro II). En cuanto a la secreción de estos elementos, la de fosfato inorgánico se incrementó cerca de 4 veces al igual que con ADHC al 0.1%; mientras que, las de calcio y de bilirrubina también se incrementaron (cuadro III). Además de lo anterior, este ácido biliar elevó considerablemente la concentración y secreción de colesterol y sales biliares, mientras

que de fosfolípidos, la concentración se elevó, pero no fue estadísticamente diferente a la de DLG sola, y la secreción si se elevó notablemente (cuadros IV y V).

Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre los perfiles de sales biliares en la bilis hepática de los animales alimentados con la dieta de glucosa.

En la dieta de Purina (Grupo 1) los ácidos biliares mayoritarios fueron el colato y el quenodesoxicolatos y en menor porcentaje se presentó el ursodesoxicolato, el desoxicolato y el litocolato (cuadro VI). Por otra parte, en cuanto a los conjugados de estas sales biliares, la proporción de tauroconjugados fue mayor que la de glicoconjugados (cuadro VII).

**Cuadro VI. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre el perfil de sales biliares en bilis hepática de hámsteres alimentados con DLG.\***

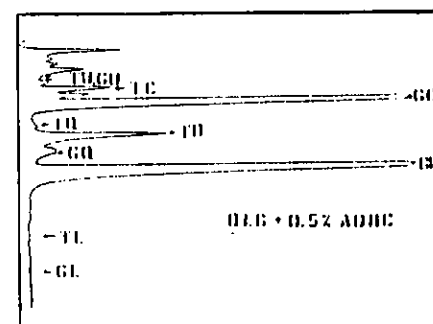
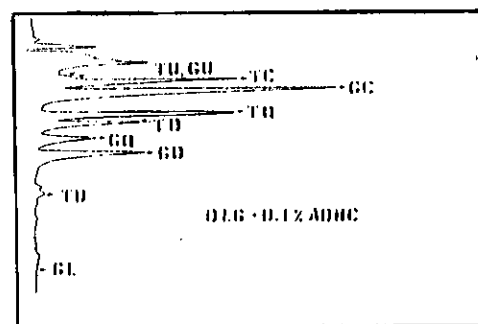
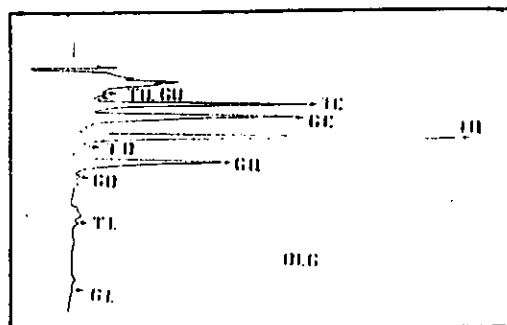
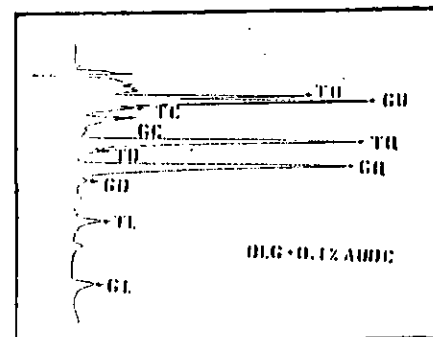
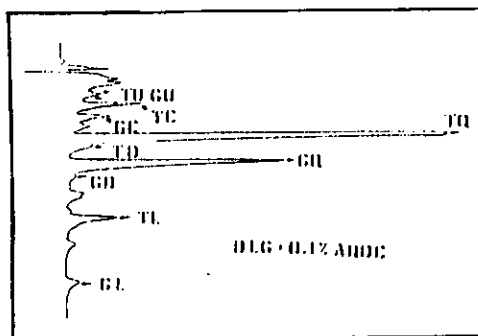
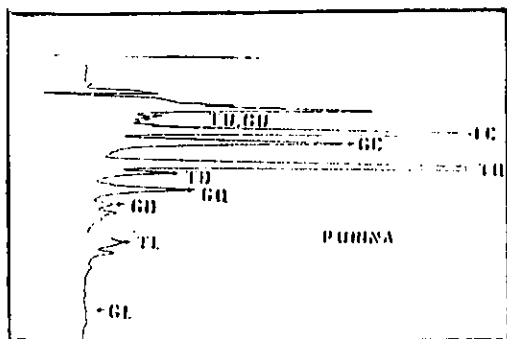
Grupos	Ursodesoxicolato	Colato	Quenodesoxicolato	Desoxicolato	Litocolato
1 Purina (DB)	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	66 ± 8.5 <sup>a</sup>	25.5 ± 3.4 <sup>a,b</sup>	5.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.15 <sup>a</sup>
2 DB + 50% glucosa (DLG)	2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	44 ± 15.3 <sup>a,b</sup>	54.0 ± 10.0 <sup>a,b</sup>	2 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.76 <sup>a,c</sup>
3 DLG + 0.1% AQDC	1.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	47 ± 2.3 <sup>a</sup>	46 ± 20 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.35 <sup>a</sup>
4 DLG + 0.1% AUDC	31 ± 13 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.32 <sup>a</sup>	261 ± 11 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 1.14 <sup>a</sup>
5 DLG + 0.1% ADHC	2 ± 0.1 <sup>a</sup>	56.2 ± 20 <sup>a,b</sup>	32.3 ± 19 <sup>a,b</sup>	8 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.05 <sup>a</sup>
6 DLG + 0.5% ADHC	0 <sup>a</sup>	42 ± 6.6 <sup>b,c</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	36.6 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>

\*Porcentaje ± DS de cada ácido biliar, n = 5

Cuadro VII. Perfil de sales biliares de la bilis hepática de hámsters alimentados con la DLG y con los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC

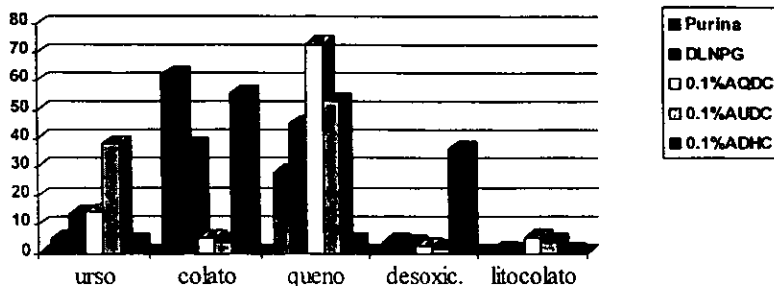
Grupos	TU	GU	TC	GC	TQ	GQ	TD	GD	TL	GL
Purina	0.65 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.32 ± 1.10 <sup>a</sup>	17.5 ± 7.08 <sup>b</sup>	21 ± 1.42 <sup>c</sup>	4.74 ± 2 <sup>b</sup>	4.42 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.38 ± 0.15 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>
DLG	1.65 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.09 <sup>a</sup>	35.8 ± 11.52 <sup>c</sup>	8.17 ± 3.8 <sup>a</sup>	29.8 ± 6.64 <sup>d</sup>	25 ± 11.4 <sup>c</sup>	1.33 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.76 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
DLG + 0.1 % de AQDC	1.14 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.24 <sup>a</sup>	3.30 ± 1.63 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.94 <sup>a</sup>	34.4 ± 9.8 <sup>d</sup>	50.5 ± 10.5 <sup>e</sup>	0.98 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.18 <sup>c</sup>	1.51 ± 0.17 <sup>b</sup>
DLG + 0.1 % de AUDC	19.83 ± 3.82 <sup>a</sup>	20.8 ± 8.93 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.94 <sup>a</sup>	3.30 ± 0.2 <sup>a</sup>	20.7 ± 8.2 <sup>c</sup>	40.1 ± 7.7 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.17 <sup>b</sup>	20.4 ± 0.97 <sup>a</sup>
DLG + 0.1 % ADHC	1.49 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.04 <sup>a</sup>	17.6 ± 3.7 <sup>b</sup>	38.6 ± 16.0 <sup>b</sup>	12.6 ± 6 <sup>b</sup>	19.7 ± 13.1 <sup>c</sup>	6.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>a</sup>
DLG + 0.5 % ADHC	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	6.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	35.4 ± 5.1 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.40 <sup>a</sup>	8.42 ± 3.7 <sup>b</sup>	7.482 ± 1.13 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

DLG = dieta litogénica de glucosa; TU= tauroursodesoxicolato; GU= glicoursodesoxicolato; TC= taurocolato; GC= glicocolato; TQ= tauroquenodesoxicolato; GQ= glicokenodesoxicolato; TD= taurodesoxicolato; GD= glicodesoxicolato; TL= taurolitocolato y GL= glicolitocolato.



**Cromatogramas de los perfiles de sales biliares de hámsters tratados con DLG y los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC**

DLG = dieta litogénica de glucosa; TU= tauroursodesoxicolato; GU= glicoursodesoxicolato; TC= taurocolato; GC= glicocolato; TQ= tauroquenodesoxicolato; GQ= glicoquenodesoxicolato; TD= taurodesoxicolato; GD= glicodesoxicolato; TL= taurolitocolato y GL= glicolitocolato.



Gráfica del efecto de los ácidos biliares en el perfil de sales biliares totales de hámsters alimentados con dieta de glucosa.

Cuando se suministra la DLG la proporción de colatos tendió a bajar con respecto al grupo control de purina. Por otro lado, el porcentaje de quenodesoxicolato se eleva al doble, mientras que los restantes permanecen sin cambio (cuadro VII). En este grupo se observó la misma tendencia que en el grupo de purina, respecto a la mayor proporción de los tauroconjugados.

El suministro de AQDC con DLG incrementó el porcentaje de quenodesoxicolato y disminuyó la de colatos. El AUDC incrementó considerablemente el porcentaje de ursodesoxicolato y quenodesoxicolato en la bilis. El ADHC al 0.1% enriquece la bilis con colato y quenodesoxicolato, no afectando los porcentajes de las demás especies de sales biliares. El ADHC al 0.5% elevó significativamente el porcentaje de colatos y desoxicolatos y disminuyó el de quenodesoxicolato, ursodesoxicolato y litocolato (cuadro VI). En todos los grupos que recibieron ácidos biliares en la dieta la proporción de glicoconjugados fue mayor que la de tauroconjugados (cuadro VII).

En resumen, los resultados de este primer experimento muestran lo siguiente:

1. La DLG indujo cálculos en el 75% de los animales e incrementa de forma significativa el flujo biliar, la concentración y la secreción de fosfato inorgánico y disminuye significativamente la concentración de bilirrubina. Los lípidos biliares se mantienen similares al control, excepto que sólo se reduce la concentración y secreción de colesterol.

2. El AQDC y el AUDC previnieron significativamente la litiasis, no afectaron el flujo biliar con respecto a la dieta de glucosa y tendieron a regresar la concentración de fosfato biliar a valores normales. Asimismo, aumentaron la secreción de lípidos biliares.
3. El ADHC al 0.1% incrementa la masa de cálculos y no modifica la frecuencia de litiasis, con respecto al grupo de glucosa. Incrementa el flujo biliar al doble del valor normal y la secreción de fosfato, a razón de 4 veces ( $P < 0.05$ ).
4. El ADHC al 0.5% es altamente tóxico, induce hepatomegalia, previno la litiasis completamente, retorno la concentración de fosfato a valores normales, pero incrementó su secreción, a razón de 4 veces ( $P < 0.05$ ).

El análisis de los perfiles de sales biliares mostró que:

- a) Las sales biliares mayoritarias en el hámster son colato y quenodesoxicolato, y los conjugados con taurina son comunes. La dieta litogénica cambia los perfiles pero los mayoritarios siguen siendo los mismos.
- b) El AQDC enriquece la bilis con quenodesoxicolato; el AUDC con ursodesoxicolato y quenodesoxicolato, el ADHC al 0.1% con colatos y el ADHC al 0.5% con colatos y desoxicolatos.
- c) Con la administración de ácidos biliares exógenos se conjuga principalmente con glicina.

### ***Experimento 2. Efecto de AQDC , AUDC y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica semipurificada (DLSP).***

Los grupos alimentados con dieta semipurificada (DLSP) perdieron peso en comparación con el grupo de purina, debido al tipo de dieta (cuadro IX). No obstante, los animales que recibieron AQDC , AUDC y ADHC al 0.1% no mostraron diarrea y su apariencia era saludable.



Cuadro IX. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la frecuencia de litiasis, el peso corporal y hepático y la masa de cálculos de hámsters alimentados con la dieta de caseína.

Grupos y Dietas	Diferencia de peso corporal después de 21 días (g)	Peso porcentual del hígado (g/100g p.c.)	Frecuencia de litiasis		Masa de cálculos	
			ncs/ntot	%	tot (mg)	mg/an.
1 Purina (DB)	4.5 ± 8.3* n=8	3.7 ± 0.2* n=8	0/8*	0	0	0
2 Dieta litogénica (DLSP)	1 ± 4.1* n=8	4.3 ± 0.3* n=8	7/8*	87.5	7.3	10.5
3 DLSP + 0.1% AQDC	2.5 ± 9.2* n=8	4.3 ± 0.7* n=8	1/8*	12.5	1	1.0
4 DLSP + 0.1% AUDC	1.5 ± 2.2* n=8	4.2 ± 0.4* n=8	2/8*	25.0	2.4	1.2
5 DLSP + 0.1% ADHC	9.8 ± 5.2* n=8	5.2 ± 0.5* n=8	1/8*	12.5	1.5	1.5

La DLSP indujo una alta frecuencia de colelitiasis. Los cálculos observados con esta dieta son similares a los obtenidos con DLG (cuadro IX). Los cambios producidos en el flujo biliar y en la composición de la bilis hepática por la DLSP fueron muy semejantes a los encontrados con la DLG, es decir, el flujo biliar se incrementó significativamente (cuadro X), aunque este flujo fue mayor que el observado con la DLG. La concentración y la secreción de fosfato inorgánico (cuadros X y XI) se incrementó significativamente en DLSP ( $P < 0.05$ ) en comparación con los valores normales del grupo de Purina. La concentración de calcio total con DLSP no fue diferente del valor control, sin embargo, la secreción de este ión fue mayor con DLSP (cuadros XI); mientras que la concentración de bilirrubina disminuyó con esta dieta y la secreción no vió afectada (cuadros X y XI).

La DLSP indujo una significativa disminución en la concentración de colesterol, en comparación con los valores del grupo de purina (cuadros XII y XIII). Además de que la concentración de fosfolípidos tendió a disminuir, a pesar de que la secreción fue

mayor. Asimismo, la concentración de sales biliares disminuyó, mientras que la secreción, aunque disminuyó, no alcanzó a ser estadísticamente diferente a la del grupo con Purina.

**Cuadro X. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre el flujo biliar y la concentración de fosfato inorgánico, de calcio total y de bilirrubina total en labilis hepática de hámsters alimentados con DLSP.**

Grupos y Dietas	Flujo biliar μl/min/100g pc	Fosfato inorgánico mM	Calcio total mg/dl	Bilirrubina total mg/dl
1 Purina (DB)	5.6 ± 0.9 <sup>a</sup> n=8	1.3 ± 0.4 <sup>a</sup> n=8	10 ± 1.0 <sup>ab</sup> n=8	9.2 ± 2.5 <sup>a</sup> n=8
2 Dieta litogénica DLSP	11.5 ± 1.7 <sup>b</sup> n=7	3 ± 0.4 <sup>b</sup> n=7	10 ± 2 <sup>a</sup> n=7	3.5 ± 0.6 <sup>b</sup> n=7
3 DLSP + 0.1% AQDC	12 ± 3.2 <sup>b</sup> n=8	2.2 ± 0.3 <sup>c,d</sup> n=8	12 ± 1 <sup>b</sup> n=8	3.6 ± 0.8 <sup>b</sup> n=8
4 DLSP + 0.1% AUDC	11 ± 2 <sup>b</sup> n=8	2.4 ± 0.4 <sup>c</sup> n=8	11.5 ± 1.5 <sup>ab</sup> n=8	3 ± 0.7 <sup>b</sup> n=8
5 DLSP + 0.1% ADHC	15.6 ± 3.5 <sup>b</sup> n=7	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup> n=7	10.4 ± 1.3 <sup>ab</sup> n=7	3 ± 0.5 <sup>b</sup> n=7

Los resultados observados en el grupo tratado con AQDC son muy similares a los registrados en el experimento 1. En este experimento, el peso del hígado no se afectó. pero 5 animales presentaron hígado pálido y con los lobulillos marcados (cuadro IX). La frecuencia de litiasis disminuyó considerablemente con respecto al grupo de DLSP, y solamente un animal presentó cálculos de tipo pigmentario (cuadro IX); sin embargo, en 5 animales más se presentaron formaciones claras translúcidas gelatinosas.

Con este ácido biliar el flujo biliar fue similar al inducido por la DLSP sola (cuadro X). La concentración de fosfato disminuyó al comparar con la DLSP, pero no alcanzó valores normales (cuadro X), mientras que la secreción de este ión tendió a disminuir, pero no fue diferente de la del grupo con DLSP sola (cuadro XI). Contrariamente a lo que ocurre con fosfato inorgánico, la concentración y secreción de

calcio total tendieron a incrementarse ligeramente, aunque solo la primera fue significativa. Por su parte, la secreción y concentración de bilirrubina no variaron significativamente respecto a las observadas con **DLSP** sola (cuadros X y XI).

De manera similar a lo ocurrido con **DLG** y **AQDC**, con **DLSP** y **AQDC** la concentración y secreción de colesterol se incrementó significativamente respecto a **DLSP** (cuadros XII y XIII). La concentración y la secreción de fosfolípidos fue similar a la producida por **DLSP** sola, mientras que las de sales biliares tendieron a elevarse, pero no alcanzaron a ser significativamente diferentes de las del grupo con **DLSP** sola (cuadro XII y XIII).

**Cuadro XI. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la secreción de fosfato inorgánico, calcio total y bilirrubina total en la bilis hepática de hámsteres alimentados con DLSP.**

Grupos y Dietas	Fosfato inorgánico nm/min/100gpc	Calcio total nm/min/100gpc	Bilirrubina total nm/min/100gpc
1 Purina (DB)	7.6 ± 2.6 <sup>a</sup> n=8	0.57 ± 0.1 <sup>a</sup> n=8	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup> n=8
2 Dieta litogénica DLSP	1.7 ± 0.9 <sup>b</sup> n=7	1 ± 0.2 <sup>b</sup> n=7	0.4 ± 0.07 <sup>a</sup> n=7
3 DLSP + 0.1% AQDC	2.7 ± 0.6 <sup>b</sup> n=8	1.45 ± 0.4 <sup>b,c</sup> n=8	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> n=8
4 DLSP + 0.1% AUDC	2.6 ± 0.6 <sup>b</sup> n=8	1.2 ± 0.2 <sup>b</sup> n=8	0.3 ± 0.06 <sup>a</sup> n=8
5 DLSP + 0.1% ADHC	2.5 ± 1.4 <sup>b</sup> n=7	1.7 ± 0.4 <sup>c</sup> n=7	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup> n=7

Con **AUDC** el peso del hígado no se afecta, ni su morfología. Solo 2 animales presentaron cálculos pigmentarios; sin embargo, 7 animales presentaron las formaciones gelatinosas que ya se han mencionado (cuadro IX). El flujo biliar fue similar al inducido por **DLSP** (cuadro X). Con respecto a los componentes biliares, el **AUDC**, al igual que el **AQDC**, redujo la concentración de fosfato, y su secreción tendió a disminuir, pero no fue estadísticamente diferente a la del grupo con **DLSP** (cuadros X y XI). La concentración

y la secreción de calcio y de bilirrubina fueron similares a las observada con **DLSP** sola (cuadros X y XI). Respecto a los lípidos biliares, la concentración y la secreción de colesterol se elevó, pero menos que con **AQDC** (cuadro XII y XIII). La concentración de fosfolípidos fue la misma que la registrada en **DLSP** (cuadro XII), lo mismo que su secreción (cuadro XIII). La concentración de sales biliares aumentó, aunque no fue estadísticamente diferente con respecto a **DLSP**, tampoco la secreción fue diferente.

**Cuadro XII.** Efecto de los ácidos biliares **AQDC**, **AUDC** y **ADHC** sobre la concentración de colesterol, fosfolípidos y sales biliares en bilis hepática de hámsters alimentados con **DLSP**.

Grupos y Dietas	Colesterol μM	Fosfolípidos mM	Sales biliares mM
1 Purina (DB)	286 ± 34 <sup>a,b</sup> n=8	5.04 ± 1 <sup>a</sup> n=8	6.0 ± 1.2 <sup>a</sup> n=8
2 Dieta litogénica (DLSP)	87 ± 33 <sup>c</sup> n=7	4 ± 0.4 <sup>b</sup> n=7	1.7 ± 0.2 <sup>b</sup> n=7
3 DLSP + 0.1% AQDC	348 ± 93 <sup>a</sup> n=8	4 ± 0.6 <sup>b</sup> n=8	3.1 ± 1.3 <sup>b</sup> n=8
4 DLSP + 0.1% AUDC	220 ± 84 <sup>b,d</sup> n=8	4 ± 0.3 <sup>b</sup> n=8	2.7 ± 0.5 <sup>b</sup> n=8
5 DLSP + 0.1% ADHC	164 ± 45 <sup>c,d</sup> n=7	3.4 ± 0.5 <sup>b</sup> n=7	6 ± 1.3 <sup>a</sup> n=7

Por su parte, el **ADHC** al 0.1% incrementó significativamente el peso del hígado y la mayoría de éstos eran pálidos y con los lobulillos marcados (cuadro IX). A diferencia del grupo con DLG y 0.1% de **ADHC** del primer experimento, con **DLSP** y 0.1% de **ADHC** sólo 1 animal presentó cálculos de tipo pigmentario, aunque 5 de los 8 animales tratados presentaron formaciones gelatinosas (cuadro IX). Por otra parte, el flujo biliar se incrementó notablemente al compararlo contra el del grupo de **DLSP** sola (cuadro X). En cuanto a los componentes biliares, el **ADHC** retornó a niveles control la concentración de fosfato inorgánico y sin disminuir su secreción (cuadros X y XI). La concentración de calcio total fue la misma que la observada en las dietas de Purina y **DLSP**, pero aumentó

su secreción, mientras que la concentración y la secreción de bilirrubina fueron similares a las observadas con **DLSP** (cuadros X y XI). Respecto a los lípidos biliares, el **ADHC** incrementó la concentración de colesterol, pero no alcanzó a ser diferente a la observada con **DLSP** (cuadro XII), y tampoco la secreción fue diferente (cuadro XIII). La concentración de fosfolípidos no fue diferente en comparación con la inducida con **DLSP** (cuadro XII), y aunque su secreción si se incrementa, no alcanzó a ser estadísticamente diferente (cuadro XIII). La concentración de sales biliares se elevó notablemente hasta alcanzar valores similares al control de dieta de **purina**, de igual manera la secreción se incrementó casi 5 veces si se compara contra ese mismo grupo (cuadros XII y XIII).

**Cuadro XIII. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la secreción de colesterol, fosfolípidos y sales biliares en bilis hepática de hámsters alimentados con DLSP.**

Grupos y Dietas	Colesterol nm/min/100g pc	Fosfolípidos nm/min/100 g pc	Sales biliares nm/min/100 g pc
1 Nutricubos Purina	1.6 ± 0.3 <sup>a</sup> n=8	28 ± 7.2 <sup>a</sup> n=8	34 ± 11 <sup>a</sup> n=8
2 Dieta litogénica (DLSP)	1 ± 0.4 <sup>a</sup> n=7	44 ± 6 <sup>a,b</sup> n=7	20 ± 3.1 <sup>a</sup> n=7
3 DLSP + 0.1% AQDC	5.4 ± 3.5 <sup>a</sup> n=8	47 ± 13.5 <sup>b</sup> n=8	35 ± 11.3 <sup>a</sup> n=8
4 DLSP + 0.1% AUDC	2.5 ± 1.3 <sup>a</sup> n=8	41 ± 8 <sup>a,b</sup> n=8	28 ± 2.5 <sup>a</sup> n=8
5 DLSP + 0.1% ADHC	2.6 ± 1 <sup>a</sup> n=7	10 ± 3 <sup>a</sup> n=7	97 ± 10 <sup>a</sup> n=7

**Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUCD y ADHC sobre los perfiles de sales biliares en la bilis hepática de los animales alimentados con DLSP.**

Con DLSP sola se registró un incremento en el porcentaje de ursodesoxicolato, y el colato disminuyó en comparación con la dieta de Purina; asimismo, el quenodesoxicolato aumentó significativamente, siendo los conjugados con taurina los conjugados mayoritarios (cuadro XIV).

El AQDC incrementó la proporción de quenodesoxicolato, y en menor grado la de litocolato, los cuales se conjugaron principalmente con glicina. Con AUCD el perfil de sales biliares muestra que los conjugados de AUCD se incrementaron, sobre todo los glicos conjugados; asimismo, se incrementaron los conjugados de quenodesoxicolato. Con el ADHC al 0.1% la bilis se enriquece con colato, y a diferencia de lo observado en el tratamiento de ADHC al 0.1% en la dieta de glucosa (primer experimento), la proporción de desoxicolato se incrementó significativamente (cuadro XV).

**Cuadro XV. Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUCD y ADHC sobre el perfil de sales biliares en bilis hepática de hámsteres alimentados con DLSP.\***

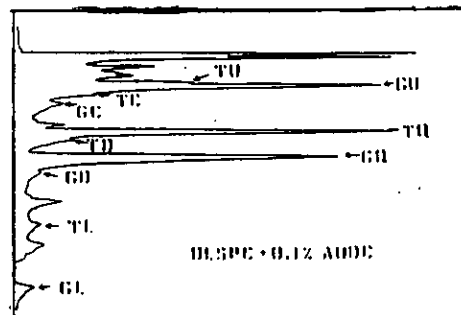
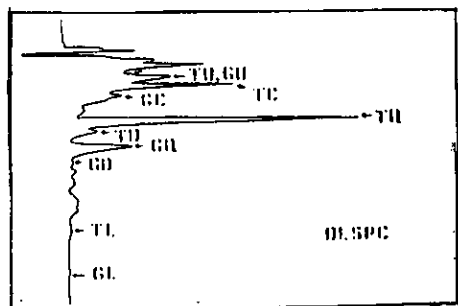
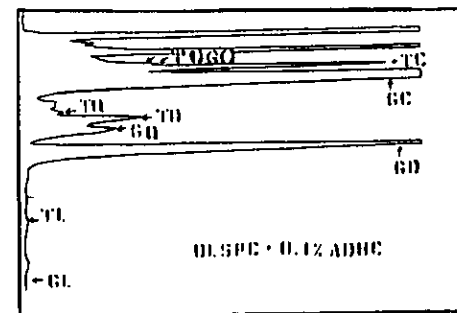
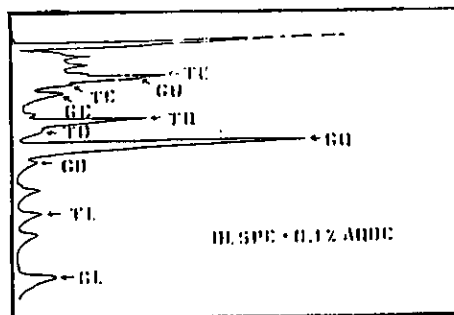
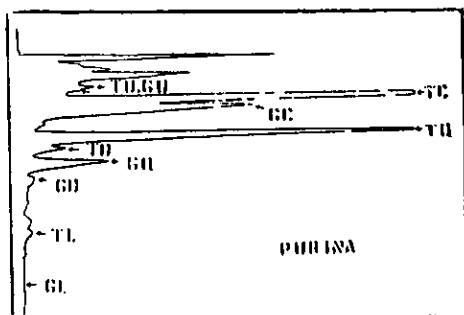
Grupos	Ursodesoxicolato	Colato	Quenodesoxicolato	Desoxicolato	Litocolato
1 Nutricubos Purina	5.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	62.3 ± 11.5 <sup>c</sup>	28 ± 13 <sup>b</sup>	3.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.7 <sup>a</sup>
2 Dieta litogénica (DLSP)	13.4 ± 6.7 <sup>a</sup>	37.4 ± 6 <sup>b</sup>	45.3 ± 7.5 <sup>b</sup>	3.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>
3 DLSP + 0.1% AQDC	14.3 ± 10.7 <sup>a</sup>	5.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	73 ± 20 <sup>c</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.2 ± 2.2 <sup>b</sup>
4 DLSP + 0.1% AUCD	38.1 ± 12 <sup>b</sup>	3.6 ± 1.7 <sup>a</sup>	53 ± 12 <sup>c</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.7 ± 1.4 <sup>a</sup>
5 DLSP + 0.1% ADHC	4 ± 2.5 <sup>a</sup>	55.7 ± 13.4 <sup>c</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	36.4 ± 9 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>

\*Porcentaje ± DS de cada ácido biliar, n = 5

Cuadro XIV. Perfil de sales biliares de la bilis hepática de hámsters alimentados con la DLSP y con los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC

Grupos	TU	GU	TC	GC	TQ	GQ	TD	GD	TL	GL
Purina	2± 021 <sup>a</sup>	3.24±0.3 <sup>a</sup>	43.8±10 <sup>c</sup>	18.5±1.5 <sup>b</sup>	20.4±8.1 <sup>b</sup>	7.4±1.5 <sup>a</sup>	2.6± 1 <sup>a</sup>	1 ± 0.08 <sup>a</sup>	1 ± 0.4 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
DLSP	5.33±3.23 <sup>a</sup>	8.14±3.5 <sup>a</sup>	25.1±4.7 <sup>b</sup>	12.3±1 <sup>b</sup>	28.5±1.6 <sup>b</sup>	17 ± 6 <sup>a</sup>	2.5± 1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
DLSP + 0.1 % AQDC	5.89±4.8 <sup>a</sup>	8.43±5.9 <sup>a</sup>	23±1.20 <sup>a</sup>	29±1.16 <sup>a</sup>	19.6± 7 <sup>a</sup>	5.33±13 <sup>c</sup>	1.2±0.07 <sup>a</sup>	1 ± 0.04 <sup>a</sup>	2 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.2±1.6 <sup>a</sup>
DLSP + 0.1 % AUDC	6.01±3.03 <sup>a</sup>	3.21 ± 9 <sup>b</sup>	1.34±0.88 <sup>a</sup>	2.30±0.86 <sup>a</sup>	17.4± 5 <sup>b</sup>	35.4±7 <sup>b</sup>	0.90±0.05 <sup>a</sup>	0.7±0.05 <sup>a</sup>	2 ± 0.9 <sup>a</sup>	2 ± 0.5 <sup>a</sup>
DLSP + 0.1 % ADHC	1.77±0.9 <sup>a</sup>	2 ± 0.16 <sup>a</sup>	15.6±4.74 <sup>b</sup>	40.1±8.7 <sup>a</sup>	0.67±0.02 <sup>a</sup>	3.42±0.1 <sup>a</sup>	6.3±2.35 <sup>b</sup>	30.1± 6.4 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.08±0.009 <sup>a</sup>

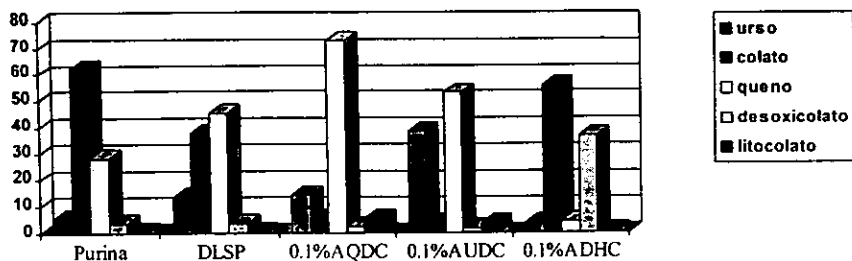
DLSP= dieta litogénica semipurificada; TU= tauroursodesoxicolato; GU= glicoursodesoxicolato; TC= taurocolato; GC= glicocolato; TQ= tauroquenedesoxicolato; GQ= glicoquenedesoxicolato; TD= taurodesoxicolato; GD= glicodesoxicolato; TL= taurolitocolato y GL= glicolitocolato.



**Cromatogramas de los perfiles de sales biliares de hámsters tratados con DLSP y los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC**

DLSP= dieta litogénica semipurificada; TU= tauroursodesoxicolato; GU= glicoursodesoxicolato; TC= taurocolato; GC= glicocolato; TQ= tauroquenodesoxicolato; GQ= glicokenodesoxicolato; TD= taurodesoxicolato; GD= glicodesoxicolato; TL= taurolitocolato y GL= glicolitocolato.





Gráfica de los perfiles de sales biliares en la dieta litogénica de caseína

### Composición química de los cálculos biliares.

La composición de los cálculos biliares obtenidos muestra que la proporción de colesterol fue mínima al compararla con la de calcio y fosfato, siendo mayor esta última, sin embargo, estos cálculos presentaron casi 10 % de sales biliares (cuadro XVI).

Con **AQDC**, la proporción de colesterol en los cálculos biliares disminuyó casi a la mitad al compararlos con los cálculos de la **DLSP**, así mismo el porcentaje de sales biliares fue menor y la de calcio muy similar, pero la de fosfato inorgánico disminuyó casi tres veces respecto a los de **DLSP**.

Con el **AUDC**, el porcentaje de colesterol se duplicó, el de sales biliares tendió a disminuir, el de calcio fue mucho mayor y el fosfato disminuyó considerablemente (cuadro V).

Con el **ADHC** los cálculos presentaron poca cantidad de colesterol, como el grupo de **DLSP**, no obstante, el porcentaje de calcio fue un poco mayor y el de fosfato tendió a disminuir. La proporción de sales biliares fue menor que en ese grupo (cuadro XVI).

**Cuadro XVI. La composición química de los cálculos biliares vesiculares obtenidos de los animales tratados con ácidos biliares AQDC, AUCD y ADHC y la DLSPcaseína**

Grupo	Masa analizada (mg)	Colesterol (%)	Sales biliares (%)	Calcio total (%)	Fosfato inorgánico (%)	Total identificado (%)	No identificado (%)
2 Dieta litogénica (DLSP)	1	1.6	9.46	6.3	14.6	32	68
3 DLSP + 0.1% AQDC	1	0.48	7.99	6.73	5.04	20.2	79.7
4 DLSP + 0.1% AUCD	2.4	3.17	6.3	8.5	4.35	22.3	77.7
5 DLSP + 0.1% ADHC	1.5	0.56	7.1	10.36	8.32	26.3	73.7

En resumen, la DLSP provocó efectos similares a los observados con la dieta de glucosa en el experimento 1; asimismo, el AQDC y el AUCD previnieron significativamente la litiasis, al parecer por disminuir la concentración de fosfato biliar. El cambio en los perfiles de sales biliares también fue semejante al observado en el experimento 1. Por su parte, el ADHC al 0.1% en la dieta DLSP previno la litiasis e incrementó la proporción de desoxicolato en la bilis.

## 4 Discusión

En términos generales, este trabajo se enfocó principalmente a estudiar el efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la litogenicidad de dos dietas que inducen la formación de cálculos biliares pigmentarios en el hámster dorado.

### *Elección de las dos dietas litogénicas.*

Con el objetivo de elegir las dietas sobre las cuales se estudió el efecto de los tres ácidos biliares, se realizó un serie de experimentos preliminares que se resumen en el diagrama 1. En todos ellos se analizó la frecuencia de litiasis y el cambio en la composición de la bilis. En ellos se observaron resultados interesantes y que pueden ser de utilidad en el establecimiento de los mecanismos que provocan la litiasis pigmentaria inducida por medios dietéticos en el hámster.

Primeramente, la elección de las dietas litogénicas se realizó de acuerdo a los antecedentes acerca de la litogenicidad presentada por la vitamina A, la glucosa y la mantequilla de leche de vaca en dietas no purificadas (Granados 1976, Cárdenas 1996); sin embargo, en un primer estudio en que se buscaba establecer si las 3 dietas afectaban la composición biliar y la frecuencia de litiasis de igual manera, se encontró que solamente la dieta de glucosa provocó que el 75% de los animales formara cálculos, mientras que las dietas de mantequilla y vitamina A indujeron muy baja frecuencia de litiasis. No obstante, los cambios inducidos por las 3 fueron muy similares, respecto a incrementar el flujo biliar y la concentración de fosfato inorgánico, y reducir la de bilirrubina, siendo la dieta de glucosa la que produjo el mayor efecto.

A pesar de la baja frecuencia de litiasis observada en este preliminar con las dietas de vitamina A y mantequilla, se pensó que el incremento en la concentración de fosfato inorgánico biliar es un evento importante en la etiología de la litiasis pigmentaria del hámster. Esta observación es importante para el planteamiento del objetivo principal de

este trabajo, es decir, se administrarían ácidos biliares dihidroxilados que previnieran la precipitación de sales de fosfato de calcio en forma de hidroxapatita (Qiu et al. 1992), y se estudiaría el efecto preventivo establecido para el ADHC (Granados y Cárdenas 1983).

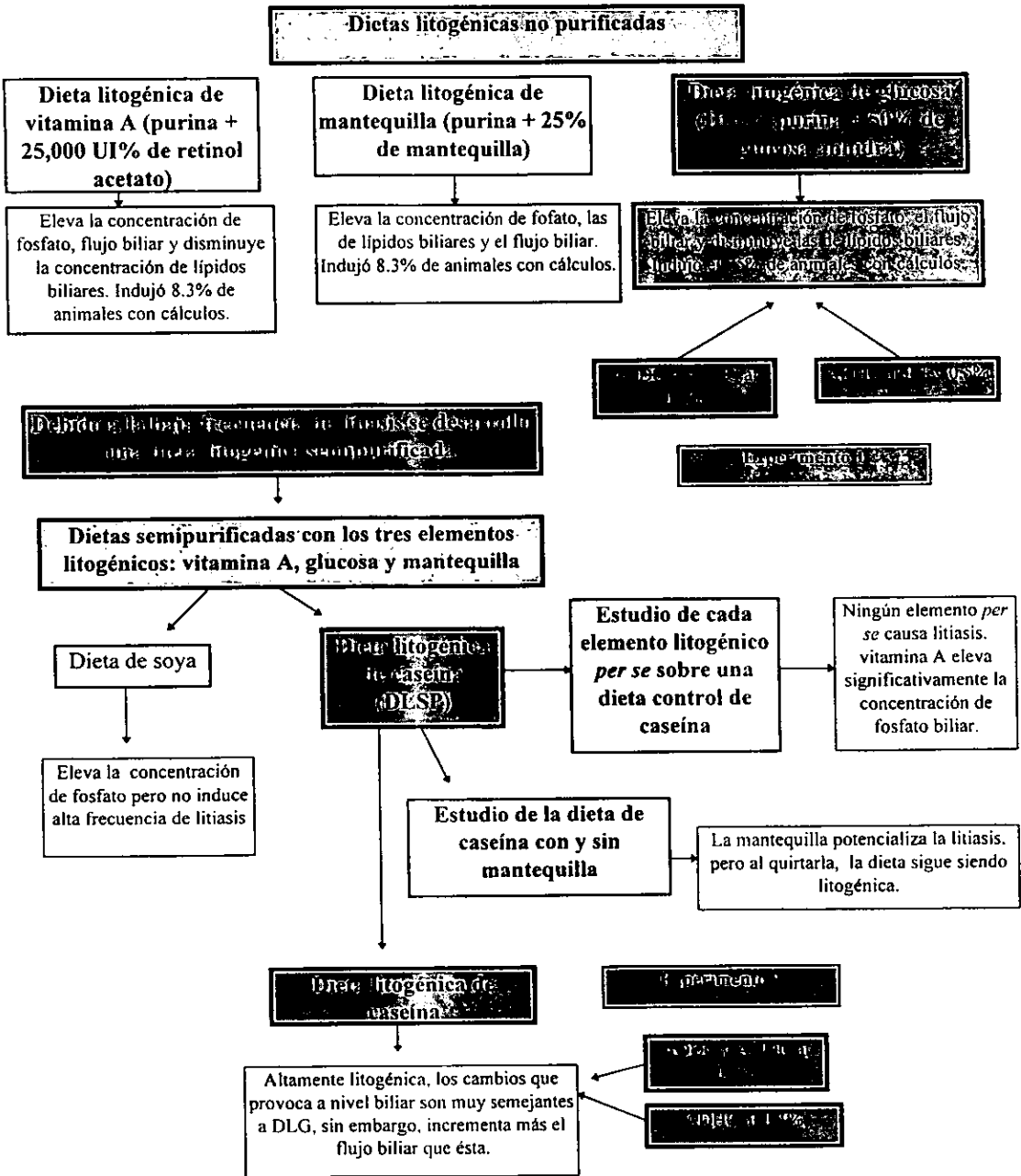
Después de realizar este preliminar, se tomó la decisión de elegir la dieta no purificada de glucosa que indujo cálculos pigmentarios en el 75% de los animales tratados.

Otra conclusión debida a la diferencia en la frecuencia de litiasis inducida por los 3 componentes en éste y otros experimentos es que la litogenicidad de la vitamina A, la glucosa y la mantequilla puede variar según la dieta no purificada utilizada.. Anteriormente se había observado que con la dieta de Albilab, de producción nacional, la vitamina A no inducía el desarrollo de cálculos pigmentarios en el hámster. Desgraciadamente la empresa productora desapareció del mercado, y no se pudo conocer los materiales de elaboración de esa dieta. La dieta no purificada empleada en el experimento señalado arriba fue Purina importada, recién introducida al inicio de este proyecto; anteriormente se tenía una Purina de producción nacional con la que la frecuencia de litiasis con vitamina A había sido consistentemente elevada.

Debido a lo anterior, se decidió producir una dieta en la que se controlara la composición, adicionando además aquellos elementos que han mostrado ser litogénicos en dietas no purificadas, para así tener una dieta litogénica semipurificada más reproducible.

Inicialmente se diseñaron dos dietas con diferente fuente de proteína, esto es, una con harina de soya y otra con caseína, ambas con 20% de proteínas, altas en glucosa y con ácidos grasos insaturados en baja proporción, además de los otros agentes litogénicos vitamina A y mantequilla. En este experimento preliminar se encontró que ambas dietas son capaces de inducir un incremento significativo en la concentración de fosfato inorgánico biliar; sin embargo, solo la de caseína indujo una alta frecuencia de animales con cálculos de tipo pigmentario después de un período de alimentación de tan solo 21 días.

Diagrama 1 Elección de las dietas litogénicas.



Posteriormente se realizaron dos experimentos más. En el primero se estudió cual de los elementos litogénicos *per se* desencadenaban la litiasis. Aunque por separado, cada elemento litogénico aumentó el fosfato inorgánico biliar en mayor o menor grado, únicamente el grupo de dieta litogénica de caseína adicionada de los tres componentes presentó cálculos semejantes y en igual frecuencia que en el experimento anterior.

En el segundo experimento se estudió si la combinación de vitamina A y glucosa provocaban litiasis, ya que fueron los que más incrementaron el fosfato inorgánico biliar, además de que la mantequilla es el componente más complejo y difícil de mantener constante. Se observó que ésta combinación producía una alta frecuencia de litiasis, pero la masa de cálculos era mayor con la dieta de caseína con los 3 componentes; así mismo, la concentración y secreción de fosfato inorgánico era mayor con la adición de mantequilla. Sin embargo, se mostró que la combinación de glucosa y vitamina A es suficiente para producir una alta frecuencia de litiasis pigmentaria. Por lo anterior se decidió utilizar la dieta litogénica semipurificada de caseína con vitamina A y glucosa (denominada DLSP) para el estudio de los ácidos biliares y compararla con la dieta litogénica no purificada de glucosa.

Efecto de los ácidos biliares AQDC, AUDC y ADHC sobre la frecuencia de litiasis y la composición de la bilis en hámsters alimentados con la dieta no purificada de glucosa y con dieta litogénica de caseína.

En este experimento, después de elegir las dietas litogénicas y de conocer la importancia del fosfato de calcio en la litiasis pigmentaria del hámster alimentado con dietas litogénicas no purificada de glucosa y semipurificada de caseína, se decidió determinar cual es el efecto de las sales biliares dihidroxiladas sobre la formación de estos cálculos ricos en fosfato y calcio, y que alteraciones en la composición biliar se asocia con estos tratamientos.

Se sabe que las sales biliares dihidroxiladas conjugadas con glicina inhiben eficazmente la precipitación de hidroxapatita al impedir el crecimiento de los núcleos de formación de ésta (Qiu *et al*, 1991 y 1992), por lo cual se hipotetizó que si la precipitación de hidroxapatita *in vitro* es inhibida por la acción de las sales biliares

dihidroxiladas conjugadas con glicina, especialmente el AQDC (Qiu et al, 1991), entonces la adición de este tipo de sales biliares a la dieta litogénica de glucosa prevendría la precipitación de hidroxapatita *in vivo* en el modelo del hámster y por lo tanto, la litiasis pigmentaria. Además, ya que el AUDC también es una sal biliar dihidroxilada, y ya que parte de este ácido biliar se puede convertir en AQDC, entonces prevendría la precipitación de hidroxapatita y la formación de cálculos pigmentarios.

Cohen *et al.* (1987) ya habían administrado AQDC y el AUDC, a dosis de 30 mg/Kg/día al hámster alimentado con una dieta litogénica con proteína de soya, alta en sacarosa y suplementada con colesterol y estrógenos durante 14 semanas, observando que ambos previenen la litiasis casi totalmente; sin embargo, no se determinó el posible mecanismo de prevención, ni la concentración de fosfato biliar, elemento que parece ser muy importante en la litiasis pigmentaria del hámster.

Por otra parte, se sabe también que el ADHC previene completamente la litiasis pigmentaria en el hámster alimentado con dietas no purificadas de vitamina A y glucosa, suministrado en la dieta al nivel de 0.5% (Granados y Cárdenas, 1983), no obstante, no se conocían los cambios producidos por este ácido biliar en la composición biliar. Por lo tanto, se decidió estudiar el efecto de este ácido biliar, a pesar de que ya se tenían antecedentes de su toxicidad, hipotetizándose que si la coleresis inducida por el ADHC provocaba que se diluyeran los componentes biliares, entonces la concentración de fosfato inorgánico disminuiría y se evitaría su precipitación.

### **Experimento 1. Efecto de AQDC , AUDC y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica no purificada de glucosa**

Los efectos de la dieta litogénica de glucosa son muy similares a los determinados por Cárdenas *et al.*, (1996) en la dieta litogénica de vitamina A. Después de analizar los resultados, los cambios en la composición biliar pueden estar relacionados a lo siguiente:

El incremento en la concentración biliar de fosfato inorgánico podría, estar relacionado con el funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{P}_i$  ATPasa que se encuentra en la membrana plasmática del hepatocito o a un aumento en la poza de fosfato inorgánico en

el hepatocito, como resultado del elevado metabolismo de glucosa, y sus intermediarios fosfatados, en los animales alimentados con estas dietas.

El incremento en el flujo biliar, provocado por esta dieta, podría ser atribuido al incremento en la concentración biliar de fosfato inorgánico, como resultado de la fuerza osmótica que ejerce éste en el canalículo biliar. A su vez este mayor flujo biliar puede causar la dilución de los lípidos biliares.

Por otro lado, la dilución de los lípidos biliares puede propiciar que se incremente la proporción de calcio libre en la bilis; es decir, este elemento ya no se asocia a las micelas mixtas biliares, dando como resultado que el calcio se encuentre fácilmente con el fosfato inorgánico y se precipiten en forma de sales de calcio

Ya que los ácidos biliares quenodesoxicólico (AQDC) y ursodesoxicólico (AUDC) son de naturaleza diferente al ácido dehidrocólico (ADHC) y sus efectos también lo son, se tratarán separadamente.

#### EL AQDC y el AUDC:

Inicialmente se probaron los ácidos biliares quenodesoxicólico (AQDC) y ursodesoxicólico (AUDC) a dosis de 0.03% en la dieta. Esta dosis corresponde entre 2 y 3 veces más a la utilizada en el humano en la litiasis de colesterol. Con esta dosis no se observó prevención aunque había una tendencia a disminuir la frecuencia de litiasis.

Posteriormente se suministraron estos ácidos biliares a dosis de 0.1%. Con esta dosis, el AQDC y el AUDC disminuyeron la frecuencia de litiasis significativamente.

Con AUDC la concentración de fosfato biliar es menor que la registrada en el grupo de DLNPG; sin embargo, este efecto es más pronunciado en el grupo que recibió AQDC. Parece probable que la disminución en la concentración de fosfato fue suficiente para evitar la formación de sales de fosfato de calcio, especialmente con AQDC. Es importante mencionar que si la concentración de fosfato hubiera sido igual en el grupo de glucosa y en los grupos que recibieron AQDC y AUDC, se pensaría en que la prevención se realizó mediante la inhibición de la precipitación de hidroxiapatita, es decir, que los núcleos de formación de hidroxiapatita no se desarrollaron por la interaccionaron de manera directa con estos ácidos biliares. Con la dosis de 0.1% de



AQDC y AUDC la concentración de fosfato disminuye, por lo que más bien parece probable que reduce su concentración a valores en que se evita la formación de estos núcleos y su posterior crecimiento. Sin embargo, no se puede descartar que la prevención pudo realizarse también mediante la inhibición de los núcleos, especialmente con AUDC.

Las concentraciones de bilirrubina total disminuye con DLG y no cambian significativamente en los grupos tratados con ácidos biliares, lo cual hace pensar que este pigmento no parece jugar un papel importante en el desencadenamiento de la litiasis pigmentaria del hámster, porque no se presenta sobresaturación aparente a nivel biliar.

Tanto el AQDC, como el AUDC tienden a incrementar la secreción y la concentración de lípidos biliares, lo cual es lógico pensar que se debe a que incrementan en la bilis la secreción de sales biliares totales, en general y en particular, las de AQDC o AUDC respectivamente, según se observa en los perfiles de ácidos biliares. Este efecto es más notable con AQDC, ya que este ácido biliar promueve más la secreción de lípidos biliares por molécula de ácido biliar, debido a su mayor efecto detergente, de aquí que también puede inducir mayor daño a los hepatocitos (Coleman, 1987).

Los perfiles de sales biliares en la bilis hepática mostraron que la bilis se enriqueció con los glico conjugados de quenodesoxicolato (en el grupo de AQDC y AUDC) y ursodesoxicolato (en el de AUDC), por lo que la inhibición en la formación de la hidroxipatita por estos glicoconjugados dihidroxilados podría presentarse.

En el caso del AUDC, la bilis también se enriquece con AQDC, muy probablemente porque parte del AUDC se convierte en AQDC (Matejka *et al.*, 1994).

Con respecto a los perfiles de sales biliares en la bilis se puede decir que los conjugados con glicina son comunes cuando se administran ácidos biliares exógenos, ya que los perfiles de los animales normales muestran una tendencia a conjugar más con taurina. Este fenómeno, tal vez se debe a que la conjugación con taurina esta condicionada por el suministro dietético de este aminoácido. Por tanto, cuando el hámster ingiere gran cantidad de ácidos biliares en la dieta, los conjuga con glicina. Es por esto que quizás, se ha mencionado frecuentemente que el hámster posee mayor proporción de conjugados con glicina (por ejemplo, Roda *et al.*, 1995); sin embargo, al menos en la cepa ChCM utilizada en el presente experimento parece ocurrir lo contrario. Al igual que en

otras investigaciones, los conjugados de colato disminuyen significativamente en presencia de AQDC, mientras que los conjugados de litocolato aumentan en la bilis (Nilsell *et al*, 1983, Tint *et al*, 1986).

Después de analizar los cambios en la composición biliar, la frecuencia de litiasis y el perfil de sales biliares en los diferentes grupos, se puede especular lo siguiente sobre el mecanismo de prevención.

En el caso de la administración del AQDC, éste alcanza una alta proporción en la bilis (conjugandose en su mayor parte con glicina) e induce una mayor secreción de lípidos biliares y proporción de flujo biliar del dependiente de sales biliares, lo cual produce la dilución del fosfato y una disminución en su concentración; igualmente, puede mantener baja la concentración de calcio ionizado, no permitiendo que las sales de  $\text{CaPO}_4$  se precipiten en forma de hidroxapatita, además de poder inhibir el crecimiento de los núcleos de formación de hidroxapatita. El AUDC posiblemente exhibe un mecanismo similar, quizás dependiendo más en inhibir la formación de hidroxapatita, pues reduce en menor grado la concentración de fosfato inorgánico. Es probable que el efecto del AUDC se deba a su conversión en AQDC, al menos parcialmente.

### **El ADHC**

El ADHC se administró a niveles de 0.5% (nivel preventivo antes estudiado, Granados y Cárdenas, 1983) y al 0.1% (para disminuir los efectos tóxicos y comparar contra los grupos que recibieron 0.1% de AQDC y AUDC, ya que son de naturaleza diferente.

El ADHC en la dieta litogénica de glucosa provocó cambios completamente diferentes a los observados en los tratamientos con AQDC y AUDC en la composición biliar. Cuando se administró al 0.1% la frecuencia de litiasis fue prácticamente igual a la del grupo de dieta de glucosa, pero se presentó mayor cantidad y tamaño de cálculos pigmentarios. Esta potencialización parece ser debida al incremento en la secreción de fosfato inorgánico observado, por lo que a pesar de que este ácido biliar es un potente colerético, que elevó el flujo biliar al doble del valor normal, la concentración de fosfato en este grupo fue la más elevada.

La potencialización exhibida por el ADHC al 0.1% podría también deberse al incremento en los glicoconjugados de desoxicolato en la bilis, ya que estas sales biliares tienden a precipitarse en forma de sales de calcio (Van der Meer *et al.* 1991); lo que puede contribuir incrementando la masa del cálculo. Desgraciadamente la proporción de sales biliares no fue estimada en estos cálculos.

Ahora bien, el aumento en la secreción de fosfato tal vez pueda deberse al tipo de metabolitos del ADHC en la bilis. La secreción de fosfato podría verse favorecida por un estímulo en el flujo biliar (colerésis) de tipo independiente de sales biliares, que en el caso de ADHC es provocada porque este ácido biliar y algunos de sus metabolitos, tiene una concentración crítica micelar muy elevada y no forman micelas en la bilis. Lo anterior causa mayor salida de agua, sin estimular la secreción de lípidos. Esto se detecta al observar que la estimulación de la secreción de lípidos por el ADHC fue la más baja de los tres ácidos biliares ensayados, inclusive la secreción de fosfolípidos no varió con respecto a la dieta de glucosa.

En el caso del ADHC al 0.5%, al igual que en investigaciones anteriores (Granados y Cárdenas, 1983) se observó prevención total de la litiasis. La prevención parece deberse al alto flujo biliar (5 veces mayor que el normal); el cual diluyó el fosfato inorgánico hasta alcanzar niveles normales, a pesar de una elevada secreción de este ion. Es importante señalar que la secreción de fosfato es 4 veces mayor que la secreción normal, pero similar, y no mayor, a la registrada con 0.1% de ADHC. Por otro lado, tal vez la interacción del fosfato con el calcio disminuye al incrementarse la concentración y la secreción de sales biliares, que debe producir mayor proporción de micelas mixtas, ya que aumenta la proporción de glicocolato y glicodesoxicolato. Esto último puede argumentarse además porque las concentraciones de lípidos biliares se incrementan considerablemente, a diferencia de lo que ocurre con 0.1% de ADHC.

Con respecto a los lípidos biliares se había mencionado que la administración de ADHC no aumenta significativamente la concentración y secreción de colesterol y sales biliares, y al parecer la de fosfolípidos disminuye debido al efecto colerético que produce este compuesto (Yousef *et al.*, 1990). Yousef y colaboradores, en 1990, encontraron que después de infundir ADHC a ratas la concentración de sales biliares aumentó al inicio y

decreció al final del periodo de infusión, y encontraron grandes cantidades de colato y derivados del ADHC, y aquellos como el desoxicolato, murocolato, AQDC e hidodesoxicolato desaparecieron después de la infusión. Estos autores sugieren que la disminución de los lípidos biliares no se debió al alto flujo biliar, ya que la disminución fue observada mucho después del incremento en el flujo biliar. Es importante recalcar que en ese estudio, se infundió ADHC en animales con fistula biliar y que la circulación enterohepática de sales biliares estaba interrumpida, por tanto, es diferente al administrar ácidos biliares *in vivo* en animales intactos y durante un largo periodo de tiempo, por lo que contrariamente a lo observado en aquellos trabajos, en el presente experimento, la concentración y la secreción de lípidos biliares aumentaron significativamente en presencia de ADHC al 0.5%. Una posible explicación puede ser que el hígado metaboliza al ADHC y lo convierte a varios derivados tales como el ácido 3 $\alpha$ -hidroxi-7,12-diceto-5 $\beta$  colánico, ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-12-ceto-5 $\beta$  colánico, ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$  colánico y AC. Ya que se puede convertir cierta parte en ácido cólico, la poza de este ácido biliar aumenta, lo cual se comprueba al analizar los perfiles de sales biliares presentados por este grupo. El ácido cólico es modificado por las bacterias en el intestino y es convertido a ácido desoxicólico, este ácido biliar vuelve al hígado mediante la circulación enterohepática incrementándose su proporción en la bilis. El ácido desoxicólico es el ácido biliar que tiene la mayor capacidad para estimular la secreción de colesterol (Beer *et al.*, 1996). Puesto que los fosfolípidos siguen la misma tendencia, entonces queda explicado su aumento en la bilis. La concentración y secreción de sales biliares se debe a la administración oral de este compuesto en alto nivel y su modificación en el hígado.

A pesar de la gran variedad de metabolitos que pueden derivarse de la modificación del ADHC, el ensayo de HPLC no muestra ningún metabolito adicional a los glico y tauro conjugados normales; ya que, el ensayo de HPLC es incapaz de detectar este tipo de componentes más polares que el AUDC, esto último quizás relacionado principalmente con el método de purificación.

Como ocurre con todos los grupos tratados con ácido biliares, la proporción de los ácidos biliares endógenos se reduce. Dicha reducción puede darse a nivel de la síntesis de

ácidos biliares mediante un proceso de retroalimentación, pero también puede deberse a la pérdida de ácidos biliares a nivel del transportador en el intestino, efectuada por la competencia entre estos ácidos biliares y los administrados.

En resumen, las sales biliares AQDC y AUDC sí reducen la formación de cálculos pigmentarios, en hámsters alimentados con la dieta de glucosa; por lo tanto, se cumplen las hipótesis planteadas. Además, después del análisis de los resultados puede observarse que el fosfato inorgánico juega un papel importante en la litiasis pigmentaria del hámster y que su precipitación puede ser inhibida *in vivo*. Sin embargo, queda por dilucidarse el mecanismo de prevención operante en la dieta de glucosa suplementada con AQDC y AUDC.

En cuanto al ADHC, al 0.1% potencializa la secreción de fosfato y como consecuencia los cálculos son más grandes y más numerosos, si se toma en cuenta este resultado puede decirse que no se cumplen las hipótesis planteadas, pero si se revisan los obtenidos con ADHC al 0.5% se puede decir que sí se cumple, porque el fosfato se diluye como consecuencia del elevado flujo, que depende de la dosis y que los conjugados de colato y desoxicolato se incrementan significativamente en la bilis, lo que produce mayor secreción de lípidos hacia ésta.

### ***Experimento 2. Efecto de AQDC, AUDC y ADHC sobre la litogenicidad y la composición biliar producida por la dieta litogénica semipurificada.***

La DLSP incrementó el flujo biliar casi al doble del grupo de Purina, al igual que en el caso de dieta litogénica de glucosa, asociado con elevada secreción de fosfato hacia la bilis, con la concentración de fosfato que se incrementó casi al triple al compararla con el grupo control de Purina. Los demás componentes biliares experimentaron cambios muy similares a los observados en la dieta de glucosa. Lo mismo ocurre en el perfil de ácidos biliares. Por lo tanto, un cambio en la concentración y secreción de fosfato y una disminución en la concentración de lípidos biliares, posiblemente sean suficientes para desencadenar el proceso de precipitación de fosfato de calcio, lo cual de alguna manera también es afectado por el tipo de proteína que se adiciona a la dieta, según los resultados obtenidos en los preliminares de dietas semipurificadas.

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

En este experimento se determinó la composición química parcial de los cálculos biliares obtenidos. En los cálculos humanos y de hámster que han sido analizados el fosfato se encuentra constituyendo hidroxapatita (Trotman y Soloway 1982; Granados 1971). Si lo mismo ocurre en el presente estudio entonces la hidroxapatita podría constituir hasta un 90% de la masa del cálculo.

Por otra parte, el AQDC fue igualmente efectivo en la prevención de la litiasis pigmentaria en el hámster dorado alimentado con la DLG y con DLSP. Los cálculos desarrollados por los animales del grupo con DLSP y AQDC contienen igual cantidad de calcio que el grupo de dieta de caseína sola; sin embargo, la concentración de fosfato disminuye a más de la mitad, por lo que se apoya la hipótesis de que el AQDC evita su precipitación. Así mismo, los cambios a nivel biliar son muy semejantes a los observados con DLG, esto es, se aprecia una disminución de la concentración y la secreción de fosfato, la concentración de calcio se incrementa y la de bilirrubina disminuye, sin afectarse su secreción. La concentración de sales biliares y de colesterol se eleva. Con los fosfolípidos ocurre algo muy diferente, ya que la concentración es la misma que con la DLSP. Parece que con DLSP la secreción de fosfolípidos es mayor que el valor normal (al igual que con dieta de glucosa), pero es una dieta más colerética, por lo que su concentración es menor. También con la DLSP los ácidos biliares exógenos suministrados no estimularon más la secreción de fosfolípidos, porque quizás ya se había alcanzado un valor máximo de secreción y por tanto su concentración disminuye.

En el grupo tratado con AUCD se comportó de manera muy similar al tratado con AQDC. La única diferencia notable fue su efecto sobre la concentración y secreción de colesterol, las cuales fueron menores con AUCD, hecho ya establecido para estos ácidos biliares, que se emplean en la disolución de cálculos de colesterol.

Por otra parte, sería importante dar seguimiento a las formaciones translúcidas que se desarrollan en los animales tratados con AQDC y AUCD, ya que probablemente en un lapso mayor de tiempo pudieran llegar a calcificarse y formar el típico cálculo pigmentario. Para resolver lo anterior se podría descontinuar el tratamiento para ver si estas formaciones desaparecen o son sustituidas por cálculos pigmentarios típicos. También se podría dar seguimiento al tratamiento hasta obtener resultados que permitan

conocer si se estaba retrasando la aparición de cálculos o se previene completamente durante la administración de ácidos biliares por periodos más largos de tiempo. En el humano, la bilis retorna a su estado litogénico después de terminar el tratamiento con ácidos biliares, lo cual muy probablemente ocurra en el hámster.

En cuanto a los perfiles de sales biliares, estos mostraron que efectivamente la bilis se enriqueció con el ácido biliar en cuestión, además en el caso del tratamiento con AUDC, también se incrementó el AQDC, muy probablemente por conversión de AUDC. En todos los casos los conjugados que se incrementaron fueron los glico conjugados, al igual que en el experimento 1. Por lo anterior es probable que se esté inhibiendo la formación de hidroxapatita, aunque no se puede decir que ese sea el mecanismo pues la reducción en la concentración de fosfato de calcio pudiera ser más importante en la prevención de los cálculos por estos ácidos biliares.

## **El ADHC**

A diferencia de lo ocurrido con la DLG, el ADHC al 0.1% en la DLSP previene la litiasis y no la potencializa. Con DLSP, a pesar de que la secreción de fosfato es igualmente elevada, la concentración de éste ion baja a niveles control. Lo anterior parece ser debido a que el flujo biliar presentado con esta dieta es mucho mayor que en la dieta litogénica de glucosa del primer experimento, por lo que otra vez se puede argumentar que el incremento del flujo biliar producido por 0.1% de ADHC y la DLSP, determinó la dilución del fosfato inorgánico y evitó su precipitación. Así con dieta de glucosa y ADHC, el flujo biliar se duplica; mientras que, en DLSP y ADHC se triplica.

Por su parte, el ADHC al 0.1% tiende a bajar la proporción de fosfato en los cálculos; sin embargo, su efecto no es tan marcado como con AQDC y AUDC, a pesar de haber diluido mucho más el fosfato biliar, esto sugiere que con AQDC y AUDC si se inhibe la formación de hidroxapatita y disminuye por tanto la proporción de fosfato en los cálculos que llegan a formarse.

En este experimento se intentó administrar ADHC al 0.5%; sin embargo, los animales comenzaron a morir a partir de los 14 días de iniciado el experimento.

En general se puede decir que las hipótesis planteadas se cumplen si se considera que ambas sales biliares dihidroxiladas previenen la litiasis, sin embargo el mecanismo de la inhibición de los núcleos de formación del cálculo no puede aceptarse, ni rechazarse, pues también puede realizarse a través de la dilución del fosfato que ya no alcanza a precipitar. Además es importante mencionar que el ADHC previene dependiendo de la dosis y la dieta, y que la prevención se relaciona con el grado de incremento del flujo biliar ocasionado por este fuerte colerético, que tiende a diluir significativamente el fosfato inorgánico.



## 5 CONCLUSIONES

- La dieta litogénica a base de Nutricubos Purina adicionados de 50% de glucosa anhidra (**DLG**) produce una alta frecuencia de hámsters con cálculos pigmentarios, lo cual se asocia con un incremento en el flujo biliar y en la concentración de fosfato inorgánico, una reducción en la de lípidos biliares y bilirrubina, y sin cambio en la de calcio total.
- La dieta semipurificada **DLSP** produce una elevada frecuencia de hámsters con cálculos pigmentarios, semejantes a los obtenidos con dietas litogénicas no purificadas, en tan sólo 21 días.
- Los cambios en la composición biliar encontrados con **DLSP** son muy similares a los observados con **DLG**.
- El **AQDC** y el **AUDC** previenen significativamente la litiasis inducida por la **DLG** y por la **DLSP**, lo cual se asocia con una disminución en la concentración biliar de fosfato inorgánico y una elevación en la de sales biliares, con mayor proporción de **AQDC** y **AUDC** conjugados con glicina.
- El **ADHC** al 0.1% potencializa la litiasis en la **DLG**, mientras que este mismo nivel la previene significativamente en la **DLSP**. La potencialización se asocia con una elevada concentración de fosfato inorgánico, y la prevención con una reducción en este parámetro y una mayor coleresis.
- El **ADHC** al 0.5% previene completamente la litiasis en la **DLG**, incrementa notablemente el flujo biliar y la concentración de lípidos biliares, y reduce la concentración de fosfato inorgánico a valores normales.

## 6 REFERENCIAS

1. Arias MI, Popper H, Schachter D and Shafritz DA. The liver Biology and Pathobiology. Raven Press. New York. USA. 430-431pp, 1988.
2. Bartlett GR. Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol. Chem.* 234: 466, 1959.
3. Batta AK, Aggarwal SK, Salen G and Shefer S. Selective reduction of oxo bile acids: Synthesis of 3 $\beta$ , 7 $\beta$ - and 12 $\beta$ -hydroxy bile acids. *J Lipid Res* 32:977-983,1991.
4. Beer Fkullack Ublick G-A, Paumgartner G, Münzing W and Hylemon BP. 7 $\alpha$ dehydroxylating bacteria enhance deoxycholic acid input and cholesterol saturation of bile in patients with gallstones. *Gastroenterology* 111: 1611, 1996.
5. Cardenas R, Jaime ME, Guzman L and Granados H. Gallstones in the golden hamster XXXVI. Pigment cholelithiasis produced by retinoic acid. *Arch Invest Med (Mex)*. 22:209-216, 1991.
6. Cardenas R, Estañol P and Galicia MA. Pigment cholelithiasis induced by vitamin A and its prevention by butylated hydroxytoluene. *Arch Med Res (Mex)*. 27: 71-75, 1996.
7. Cohen BI, Setoguchi T, Mosbach EM, McSherry K, Stenger RJ and Kuroki S. An animal model of pigment cholelithiasis. *Am J Surg*. 153: 130-138, 1987.
8. Coleman R. Biochemistry of bile secretion. *Biochem J*. 244: 249-261, 1987.
9. Crowther RS and Soloway RD. Pigment Gallstone Pathogenesis. From man to molecules. *Seminars in liver disease*. 10: 171-180, 1990.
10. Dam H. Nutritional aspects of gallstone formation with particular reference to alimentary production of gallstones in laboratory animals. *World Rev. Nutr. Diet*. 11:199-239. 1969.
11. Danzinger RG, Hofmann AF, Thistle JL Effect of oral Chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid composition in women with cholelithiasis. *J Clin Invest* 52:2809-21,1973.
12. Dumont M, Uchman S and Erlinger S. Hypercholesterolemia induced by ursodesoxycholic acid and 7-ketolithic acid in the rat: possible role of bicarbonate transport. *Gastroenterology* 79: 82. 1980.

13. Erlinger S and Dhumeaux D. Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes. *Gastroenterology* 66: 281-304, 1974.
14. Erlinger S. Hepatocyte bile secretion: current views and controversies. *Hepatology* 1: 352-359, 1981.
15. Erlinger S. Hypercholeretic bile acids. A clue to the mechanisms? *Hepatology* 11: 888-890, 1990.
16. Erlinger S. Mechanisms of hepatic transport and bile secretion *Acta Gastroenterol Belg.* 59:2, 159-62, 1996.
17. Ghishan FK, Rebeiz R, Honda T and Nakagawa N. Characterization and expression of a novel Na<sup>+</sup>-inorganic phosphate transporter at the liver plasma membrane of the rat. *Gastroenterology* 105: 519-526, 1993.
18. Gleeson D, Murphy GM and Dowling RH. Calcium binding by bile acids: in vitro studies using a calcium ion electrode. *J Lip. Res.* 31:781-791, 1990.
19. Granados H. Cálculos biliares en el jámster dorado alimentado con una dieta de mantenimiento. *Poeyana (Cuba).* 93: 1-19, 1971.
20. Granados H. Cálculos biliares en el jámster dorado VIII. Acción litogénica de la mantequilla de leche de vaca. *Patología (Mex)* 14:23-37, 1976a.
21. Granados H. Cálculos biliares en el jámster dorado IX. Ausencia de acción litogénica de la margarina. *Patología (Mex)* 14:215, 1976b
22. Granados H and Cardenas R. Cálculos biliares en el hámster dorado XIV. Prevención por el ácido dehidrocólico de la coleditiasis pigmentaria producida por la mantequilla y la vitamina A. *Arch. Invest. Med. (Mex).* 14: 23-27, 1983.
23. Gurantz D and Hofmann AF. Influence of bile acid structure on bile flow and biliary lipid secretion in the hamster. *Am J Physiol.* 247: G736-G748, 1984.
24. Hardison WG. Metabolism of sodium dehydrocholate by the rat liver: its effect on micelle formation in bile. *J Lab. Clin. Med.* 77: 811, 1971.
25. Hayes KC, Khosla P, Kaiser A, Yeghiazarians V and Pronczuck A. Dietary fat and cholesterol modulate the plasma lipoprotein distribution and production of pigment or cholesterol gallstones in hamster. *J Nutr.* 122: 374-384, 1991.

26. Heathcote EJ, Cauch-Duder K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CM. The Canadian multicenter double-blind randomized controlled trial ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 19: 1149-1156, 1994.
27. Kihira K, Yamauchi T, Kuramoto T, Uue M, Yoshii M and Hoshita T. Comparative studies of metabolism of simultaneously administered chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid in hamsters. *Steroids* 59: 431-435, 1994.
28. Kritchevsky D and Klurfeld DM. Gallstone formation in hamsters: effect of varying animal and vegetable protein levels. *Am J Clin. Nutr.* 37: 802, 1983.
29. Loria P, Carulli N, Medici G, Tripodi A, Lori R, Rovesti S, Bergomi M, Rosi A and Romani M. Determinants of bile secretion: effect of bile salt-structure on bile flow and biliary cation secretion. *Gastroenterology* 96: 1142-50, 1989.
30. Matejka MC, Vescina CN, Carducci A, Alayon A, Dios A, Scarlatto E and Marnianetti A. Effect of ursodeoxycholic acid administration on bile composition on hamster bile. *Pharmacol Res* 22: 297, 1990.
31. Maudgal DP and Northfield TC. A practical guide to the nonsurgical treatment of gallstones. *Drugs* 41: 185-192, 1991.
32. Mendez-Sanchez N, Pociano RG, Jessurun J, Alonso de Ruiz P, Romero LP and Uribe M. Gallstone Composition in Mexican Patients. *Arch Med Res.* 26: 415-419, 1995.
33. Mendez-Sanchez N, Cardenas-Vazquez R, Muñoz R, Uribe M and Carey MC. Zinc salts sequester unconjugated bilirubin from micellar bile salts solutions *in vitro* and inhibit enterohepatic cycling of bilirubin in the hamster. Abstract from American Association for the study of Liver Chicago, Illinois, Nov 8-12, 1996.
34. Moore EW. Role of calcium in the pathogenesis of gallstones with an hypothesis on structural requirements for Ca<sup>++</sup> binding to proteins and bile acids. In Barbara L, Dowling RH, Hofmann AF, Roda E des. *Recent advances in bile acid research.* New York; Raven. 109-43, 1985.
35. Moore EW and Preston P. High affinity pre-micellar Ca<sup>++</sup>-binding to bile salts I. The major bile acids of human bile. *Hepatology* 12: 999, 1990.
36. Nilsell K, Angelin BO, Leijd B and Einarsson K. Comparative effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid secretion in humans. *Gastroenterology* 85:150-158, 1984.

37. Qiu S-M, Soloway RD and Crowther RS. Interaction of bile salts with calcium hydroxyapatite: inhibitors of apatite formation exhibit high-affinity precellular binding. *Hepatology* 16:1280-1289, 1992.
38. Rahman K and Coleman R. Biliary lipid secretion and its control. *Biochem J.* 245:531-536, 1987a.
39. Rahman K and Coleman R. Output of lysosomal contents and cholesterol into bile can be stimulated by tauroursodeoxycholate. *Biochem J.* 245:289-292, 1987b.
40. Roda A, Pellicciari R, Polimeni C, Cerrè C, Cantelli Forti G, Sadeghpour B, Sapigni E, Gioacchini AM and Natani B. Metabolism, pharmacokinetics and activity of a new 6-fluoro analogue of ursodeoxycholic acid in rats and hamsters. *Gastroenterology* 108: 1204-1214, 1995.
41. Rossy SS, Converse JL and Hofmann A. High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in humans bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholic amides and the common conjugated bile acids. *J Lip. Res.* 28: 589, 1987.
42. Sarin SK, Brij DM, Kapur MS, Fams F and Tandon RK. Cholesterol and pigment gallstones in Northern India. A prospective analysis. *Dig Dis and Sci.* 31: 1041-1045, 1986.
43. Schoenfield LJ and Lachin JM. The Steering Committee. The National Cooperative Gallstone Study Group. Chenodiol (Chenodeoxycholic acid) for dissolution of gallstones. The National Cooperative Gallstone Study: a controlled trial of efficacy and safety. *Ann Inter Med* 95: 257. 1981.
44. Sherlock S. Diseases of the liver and biliary system. 7 th. Ed. Blackwell Scientific Publications. London. 727-737 pp. 1988.
45. Sleissenger HM and Fordtran JS. Enfermedades Gastrointestinales. Fisiopatología, Diagnóstico, Tratamiento. Vol. 2 Ed. Panamericana. #a ed. Argentina. 2344 pp. 1985.
46. Soloway RD, Hofmann AF and Thomas PJ. Triketocholanoic (Dehydrocholanoic) acid. Hepatic metabolism and effect on bile flow and biliary lipid excretion in man. *J Clin Invest.* 52: 715, 1973.
47. Stiehl A, Raedsch R, Rudolph G and Walker S. Effect of ursodeoxycholic acid on biliary acid and bile lipid composition in gallstone patients. *Hepatology* 4: 107-111, 1984.
48. Sutor JD and Wooley SE. The nature and incidence of gallstones containing calcium. *Gut* 14: 215-220, 1973.

49. Tanimura H. Experimental studies on the etiology of cholelithiasis. Arch Jap Chn. 34:1160-1177, 1965.
50. Takikawa H, Sano N and Yamanaka M. The ursodeoxycholate dose-dependent formation of ursodeoxycholate-glucuronide in the rat and the choleric potencies. Hepatology 11: 743-749, 1990.
51. Tint GS, Salen G and Shefer S. Effect of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on cholesterol and bile acid metabolism. Gastroenterology 91: 1007-18, 1986.
52. Trotman BW and Soloway RD. Pigment vs cholesterol cholelithiasis: Clinical and epidemiological aspects. Dig Dis 20(8):735-740, 1975.
53. Trotman BW and Soloway RD. Pigment gallstone disease: Summary of the National Institutes of Health-International Workshop. Hepatology 2: 879-884, 1982.
54. Turley SD and Dietschy JM. Reevaluation of the  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. J Lip. Res. 19: 924, 1978.
55. Van deer Meer R. Differential effects of calcium ions and calcium phosphate on citotoxicity bile acids. Am J Physiol 23: G142, 1991.
56. Varley H. Practical Clinical Biochemistry Vol. 1. General Topics and Common Tests. 5th Ed. London William Heinmann Medical Books LTD. 1980.
57. Wheeler HO. Biliary excretion of bile acids, lecithin and cholesterol in hamsters with gallstones. Gastroenterology 65: 92-103, 1973.
58. Yousef IM, Mignault D, Weber AM and Tuchweber B. Influence of dehydrocholic acid on the secretion of bile acids and biliary lipids in rats. Digestion 45: 40-51, 1990.