

FACULTAD DE CIENCIAS

64

24

ESTUDIO SOBRE LA PREVENCIÓN POR EL HIDROXITOLUENO
BUTILADO DE LA COLELITIASIS PIGMENTARIA PRODUCIDA
POR LA VITAMINA A EN EL JAMSTER DORADO

(Mesocricetus auratus auratus)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL GALICIA GALICIA

México, D.F.

1991

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

| | Pag. |
|---|------|
| INTRODUCCION | i |
| Revisión de la Literatura | |
| Primera Parte | |
| I. La Colelitiasis humana | 1 |
| A. Tipo de cálculos | 1 |
| B. Epidemiología | 3 |
| C. Patogénesis | 4 |
| D. Tratamiento | 6 |
| II. El jamster como modelo de colelitiasis | 7 |
| A. Colelitiasis producida con dietas purificadas | 8 |
| a) Cálculos de colesterol | 8 |
| b) Cálculos amorfos de pigmento | 11 |
| B. Colelitiasis producida con dietas no purificadas | 13 |
| a) Cálculos de colesterol | 13 |
| b) Cálculos de pigmento | 13 |
| i) Factores litogénicos y no litogénicos | 14 |
| ii) Factores modificadores de la colelitiasis pigmentaria | 17 |
| iii) Factores preventivos | 18 |
| Segunda Parte | |
| I. La peroxidación de lípidos y los antioxidantes | 22 |
| II. El Hidroxitolueno butilado. | 25 |
| A. Química. | 26 |
| B. Usos | 27 |
| C. Efectos del BHT en los organismos | 27 |

| | Pag. |
|--|------|
| D. Interacción del BHT y la vitamina A | 34 |
| Tercera Parte | |
| Sección Experimental | |
| A. Objetivo | 38 |
| B. Material y métodos | 39 |
| C. Resultados | 43 |
| D. Discusión | 53 |
| E. Conclusiones | 57 |
| Cuarta Parte | |
| Resumen general y Bibliografía | |
| 1. Resumen | 58 |
| 2. Bibliografía | 62 |

INTRODUCCIÓN

Los cánceres malignos humanos son un problema de salud en México y en el mundo, por lo que es importante realizar investigaciones para establecer su patogénesis y lograr mecanismos para su prevención y tratamiento. Con este objetivo se ha venido desarrollando en el Laboratorio de Biología Ambiental Experimental de la Facultad de Ciencias de esta Universidad, un proyecto sobre colitis crónica experimental en el jémeter dorado.

El presente trabajo forma parte de este proyecto como una aportación al estudio de la colitis crónica pigmentaria.

Previas investigaciones en este laboratorio han establecido la acción litogénica pigmentaria de la vitamina H en el jémeter dorado (1); esta colitis crónica ha sido agravada por sustancias con actividad antioxidante tales como el azul de metileno y la "Eppendaurina" (cancerocidina), la cual es rica en el antioxidante ácido mandeniloliguarético (62,63). Como continuación de estas investigaciones se ha puesto a prueba la acción del antioxidante sintético Hidroxitolueno Sulfonado, el cual además tiene efectos sobre el metabolismo de la vitamina H.

Parte de este trabajo fue presentado en el XIV Congreso Nacional de Gastroenterología, celebrado en Acapulco, Guerrero (1966).

Revisión de la Literatura

Primera Parte

1. La coleritiasis biliar

Un cálculo biliar, se define como un cuerpo duro presente en la vesícula biliar y/o vías biliares, el cual se produce, cuando una o varias sustancias que normalmente existen en la bile precipitan al aumentar su concentración relativa; este precipitado se asocia con glicoproteínas de las vías biliares hasta constituir un conglomerado.

A. Tipos de cálculos :

Los estancias de la bile que con mayor frecuencia forman cálculos son colesterol, pigmentos biliares y sales de calcio. En base a su constitución los cálculos se han clasificado en 2 tipos (2,3):

a) CALCULOS DE COLESTEROL: Estos cálculos contienen este lípido hasta en un 90% de su peso, son generalmente solitarios, cristalinos y translúcidos de forma redondeada u ovoidea y de superficie lisa o nodular; miden en el hombre de 1 a 4 cm. de diámetro. En este tipo de cálculos se han incluido a los múltiples de colesterol, los cuales son menos comunes y tienen la apariencia de una frambuesa.

b) CALCULOS DE PIGMENTO: Estos se dividen en dos tipos:

1) Cálculos de bilirrubinato de calcio:

Cálculos café de pigmento: los cuales son múltiples, de color café a anaranjado, laminados de consistencia blanda, y graso que contienen sales de calcio principalmente bilirrubinato de calcio, ácidos grasos (derivados de lecitina), fosfato y raramente carbonato; también contienen pequeñas cantidades de colesterol (hasta 10%). Se presentan tanto en los conductos extra como en los intrahepáticos. Se

asociar con infección biliar.

-Cálculos negros de pigmentos: son múltiples de consistencia dura y amorfos, contienen sales de calcio y bilirrubina (polimerizada fosfato y/o carbonato, una mínima cantidad de colesterol (1 a 3%) y ácidos grasos; usualmente se presentan en la vesícula biliar y no están asociados con biliar infectada. Tienen un tamaño de 3 a 8 mm.

ii)Cálculos pigmentarios de sales de calcio orgánicas o inorgánicas: están compuestos generalmente de sales de calcio, principalmente fosfato o maltrato, con una mínima cantidad de bilirrubinato y no se asocian con infección.

Estos tipos de cálculos de pigmento contienen cationes divalentes (Fe, Cu, Zn y Mn).

b) CÁLCULOS MIXTOS: son los más comunes y están constituidos por pigmentos biliares, sales de calcio, una matriz proteica y hasta 70% de colesterol, son numerosos de superficie dura y fectada por la presión con los demás cálculos biliares, por lo general son lisos y de color café claro u oscuro. Algunos de estos cálculos se encuentran estratificados teniendo una capa formada de colesterol y otras de pigmentos biliares que delimitan un hueco central.

Dado que estos cálculos contienen altos niveles de colesterol, generalmente se considera su epidemiología y patogénesis similar a la de los cálculos de colesterol.

5. epidemiología

Los datos sobre la frecuencia con que se presentan los cálculos de colesterol en la población son variables de una zona a otra, de un país a otro o entre diferentes grupos de edades. Se tiene estimado

que esta frecuencia de coledolitiasis es influenciada por varios factores; se asocian con un alto contenido calórico y de colesterol en la dieta y la obesidad predispone a la coledolitiasis, son tres veces más frecuentes entre los 20 y 40 años y su formación en la vesícula biliar ocurre en un 40% de las mujeres y sólo en un 24% en los hombres, existen diferencias raciales en la susceptibilidad a formar cálculos, ya que el 70% de los indios norteamericanos Pima padecen coledolitiasis hacia los 30 años, mientras que los indios de Trinidad Tobago muestran sólo una frecuencia de 0.07%; en los suecos la frecuencia es parcialmente elevada, en tanto que los Masai de África no presentan coledolitiasis; ha sido reportado que el 20.5% de familiares en primer grado de pacientes con cálculos, también presentan coledolitiasis, mientras que sólo el 3% de un grupo control la presentan, lo cual indica que existen factores hereditarios de esta enfermedad (4,5,6,7).

Existen pocos datos sobre la epidemiología de la coledolitiasis pigmentaria. Un estudio en Estados Unidos mostró que los cálculos pigmentarios constituyen el 27% de los casos de coledolitiasis en ese país; la frecuencia de este tipo de cálculos se incrementa con la edad, alcanzando un pico en la década de los 50's (26). Los cálculos de pigmento son un problema mayor en el mundo oriental que en el occidental; aunque en el oriente la occidentalización de las costumbres especialmente en las zonas urbanas, ha provocado un incremento en la frecuencia de los cálculos de colesterol. En general, mientras que los cálculos negros de pigmento se asocian con el mundo occidental, los cálculos blancos de pigmento se asocian con

las zonas rurales de oriende y con bilis infectada (8).

Un estudio reciente de amebiasis reveló que en México la coelitis se presenta con una frecuencia de 14.3%, siendo de 8.44 en el sexo masculino y de 20.4% en el femenino. La prevalencia ha aumentado de 12.0% en los años 50's a 15.9% en los 80's. Esto quiere decir que en el momento actual probablemente existen 5 millones de personas con intestino biliar en México. El principal tipo de cálculos que ocurre en México es el mixto con una frecuencia de 71.1%, mientras que los de colesterol se presentan con una frecuencia de 15.2% y los pigmentarios en un 13.5% (1).

C. Patogénesis

En condiciones normales, la bilis vesicular humana se comporta como un coloide constituido por un solvente (agua) y solutos en suspensión micelar, de estos últimos el 90-98% está constituido por tres lípidos: colesterol, lecitina y sales biliares, además de pigmentos, proteínas y sales de calcio (12).

Las sales biliares ayudan a mantener al colesterol y a la lecitina no conjugada en solución y a mantener bajo la concentración de iones de calcio libre; además normalmente existe un equilibrio entre las moléculas de colesterol, de lecitina y de sales biliares; cambios en la concentración relativa de alguno de estos lípidos, puede dar lugar a la formación de bilis litogénica, es decir, aquella bilis que estando concentrada por colesterol, otro lípido o iones de calcio es potencialmente capaz de dar origen a la formación de cálculos (13).

Entre las causas más importantes que producen la bilis

litogénica que puede conducir a la formación de cálculos de colesterol están (8):

- i) Defecto en las síntesis de ácidos biliares
- ii) Pérdida excesiva de ácidos biliares
- iii) Reducción en la retroalimentación de los ácidos biliares
- iv) Secreción excesiva de colesterol
- v) Reducción de ácidos biliares e incremento en la secreción de colesterol
- vi) Enfermedad primaria de cálculos extraneopáticos, salmonelosis, nutrición total parental, somatostatina y vagotomía

La sobresaturación de la biliar con colesterol parece ser un prerrequisito para la formación de los cálculos de este tipo; sin embargo la mayoría de la población presenta sobresaturación y no desarrolla cálculos, por lo que otros factores deben desempeñar un papel importante. Se ha observado que la biliar sobresaturada obtenida de pacientes con cálculos desarrolla cristales de colesterol más rápidamente (i.e., corto tiempo de nucleación) que la de individuos con biliar sobresaturada pero sin cálculos (i.e., largo tiempo de nucleación). Se han propuesto factores nucleantes (glicoproteínas) y/o deficiencia de factores antinucleantes (apolipoproteína A1) en la biliar de pacientes con cálculos, como causa de la rápida formación de cristales de colesterol (9,10).

En los cálculos de pigmento, el distearato de calcio (biliarina) y calcio es el componente principal de dos tipos de cálculos: roñosos y negros de pigmento; se considera que puede haber una nucleación a través de los cuales la biliar se satura de

bilirrubinato de calcio y esto se precipita:

i) Hidrólisis del bilirrubinato de glucuronido por la β -glucuronidasa de E. coli, resultando en ácido glucurónico y bilirrubina libre a la cual se le combina el calcio (11).

ii) Incremento en la actividad de los iones de calcio libre debido a un decremento en las concentraciones de sales biliares y de otros agentes que normalmente interaccionan con el calcio o a un incremento en el calcio total, provocando así la presencia de sales de calcio (bilirrubinato, CO_3 , PO_4 y ácidos grasos) en bilis (84).

iii) Decremento en los factores que solidifican el bilirrubinato de calcio, se ha sugerido que la presencia de calcio la solubilidad del anión bilirrubinato es aumentada por los ácidos biliares y disminuida por la adición de lecitina; así de este modo, una disminución de sales biliares o un aumento de la concentración de lecitina contribuirían a la precipitación del bilirrubinato de calcio (13).

Además, la formación de estos cálculos se asocia a infecciones e infestaciones del tracto biliar (café de pigmento), procesos hemolíticos (negros de pigmento) y cirrosis hepática (1,3,14).

Asimismo, en la formación tanto de los cálculos pigmentarios como los radiopacos de colesterol, el incremento de un anión orgánico (ácidos grasos o ácidos biliares) o inorgánico (CO_3 o PO_4) puede dar lugar a la formación de sales insolubles de calcio que constituyen por sí el cálculo o que se agregan a este. Se ha propuesto que alteraciones en el intercambio de H por Na puede provocar incremento del anión CO_3 en la bilis (15).

D. Tratamientos:

En la actualidad el principal tratamiento es quirúrgico por colecistectomía; sin embargo, existen varios tratamientos no quirúrgicos para la colelitiasis de colesterol (16): i) Administración oral de ácidos queudesoxicólico y/o ursodesoxicólico de 6 meses a 2 años, usualmente cálculos radiolúcidos de colesterol; sin embargo después de la terapia estos pueden presentarse nuevamente; ii) La perfusión de monoctanoína vía un tubo T o colocación de un catéter por endoscopia percutánea transhepática o retrógrada, se emplea principalmente para disolver cálculos en los ductos biliares; iii) Fragmentación de los cálculos por acción de ondas de choque (litotricia); iv) Combinaciones de los métodos anteriores.

Entre los métodos no quirúrgicos requieren que los cálculos no se encuentren calcificados y sean pequeños o de regular tamaño.

No existen agentes disolventes de los cálculos pigmentarios vesiculares (16), como en la colelitiasis de colesterol; sólo los cálculos pigmentarios recurrentes y radiolúcidos han sido disueltos con una mezcla de monoctanoína, EDTA, ácido queudesoxicólico y colase.

uso de ácidos que no son desoxicólicos y/o ácidos desoxicólicos de 6 meses a 2 años, disuelven cálculos radiolúcidos de colesterol; sin embargo después de la terapia estos pueden presentarse nuevamente; ii) La perfusión de monoctanoína vía un tubo T o colocación de un catéter por endoscopia percutánea transhepática o retrógrada, se emplea principalmente para disolver cálculos en los ductos biliares; iii) Fragmentación de los cálculos por medio de ondas de choque (litotricia); iv) Combinaciones de estos métodos.

Todos los métodos no quirúrgicos requieren que los cálculos no se encuentren calcificados y sean pequeños o de regular tamaño.

No existen agentes disolventes de los cálculos pigmentarios vesiculares (16), como en la colelitiasis de colesterol; sólo los cálculos pigmentarios recurrentes y radiolúcidos han sido disueltos con una mezcla de monoctanoína, EDTA, ácido ursodesoxicólico y colato (13).

II. El júnster como modelo de colelitiasis

Existen varios modelos de colelitiasis, los cuales pueden incrementar nuestro conocimiento sobre esta enfermedad. Los modelos dietéticos de la colelitiasis han sido útiles en el estudio del papel de la dieta en la producción de los cálculos. Hasta la fecha no ha habido mayor modelo animal para el estudio de la colelitiasis que el júnster dorado, pues en él se pueden producir diversos tipos de cálculos en variadas condiciones dietéticas (15, 17).

Podemos dividir los estudios de colelitiasis en el júnster en 2: los

que emplean dietas purificadas y los de dietas no purificadas.

A. Colelitiasis producida con dietas purificadas.

a) Cálculos de colesterol:

El jéster fue utilizado por primera vez en el estudio de la colelitiasis en 1954 por Dam y sus colaboradores, cuando reportaron la ocurrencia de cálculos, principalmente de colesterol, en jústeres alimentados con una dieta semipurificada libre de grasas y alta en carbohidratos refinados (16). Entre investigadores llevaron a cabo numerosos e importantes estudios sobre la colelitiasis, de los cuales se desprende lo siguiente:

En el jéster se producen tres tipos principales de cálculos biliares (17):

- i) Cálculos cristalinos amarillo claro o blanco, constituidos casi exclusivamente de colesterol.
- ii) Cálculos amorfos de pigmento (café o verdes) libres de colesterol, pero con un alto contenido de calcio, fosfato y ácidos biliares conjugados con glicina.
- iii) Cálculos mixtos, los cuales contienen diferentes niveles de colesterol.

Para obtener una buena producción de cálculos de colesterol es necesario utilizar animales jóvenes al comienzo del experimento (17). Mikasa et al (18) han confirmado la influencia de la edad, pues produjeron cálculos de colesterol en todos los jústeres jóvenes alimentados con una dieta semipurificada (80% sacarosa, 20% caseína y 10% grasa de mantquilla), mientras que sólo el 60% de los jústeres viejos los presentaron.

La frecuencia de los cálculos de colesterol es un tanto mayor entre los machos que entre las hembras (17).

La producción y el tipo de cálculo biliar están influenciados por los componentes dietéticos. Das (17) reportó que la dieta libre de grasa y de colesterol, pero con un contenido de 74.5% de glucosa como fuente de carbohidrato da por resultado una alta producción de cálculos de colesterol y una baja frecuencia de cálculos amorfos de pigmento y miltos.

Los análisis sobre la influencia de las grasas en la formación de cálculos, empleando una dieta basal libre de grasas y conteniendo 62.3% de glucosa y 12% de almidón de arroz, mostraron que la manteca de cerdo, los aceites de hígado de bacalao completo y libre de vitamina A, los aceites de soya y de sabafo, y los ácidos grasos destilados del aceite de sabafo y sus ésteres atípicos, al nivel de 2% en dieta, disminuyen la frecuencia de los cálculos de colesterol (17,20).

Posteriormente, un estudio comparativo entre la mantequilla y la margarina (conteniendo 40% de ácido linoléico) a nivel de 10% en dieta basal a expensas de la glucosa, mostró que con la mantequilla el 60% de los animales desarrolla cálculos de colesterol, mientras que con la margarina sólo el 4.6% presentan estos cálculos; la disminución en la frecuencia de cálculos de colesterol por la margarina parece deberse a su alto contenido de ácido linoléico (21). Cuando a la dieta con 10% de mantequilla se le adiciona 1% de colesterol se reduce grandemente la frecuencia de calculosis (22).

Estudios acerca de la influencia de los carbohidratos en la

Estudios acerca de la influencia de los carbohidratos en la producción de cálculos biliares empleando la dieta litogénica adicionada de 2% de manteca de cerdo, mostraron que la glucosa y la sacarosa inducen una alta frecuencia de cálculos de colesterol; aunque la sacarosa es menos consistente (17,23). La sustitución de glucosa por almidón de arroz, de papa o lactosa causa que no se formen cálculos de colesterol (23). La frecuencia de cálculos de colesterol disminuye conforme se sustituye el nivel de glucosa por almidón de arroz, hasta que no se producen cuando sólo hay 1/3 de glucosa (23).

El suplemento de 3% de colestiramina en la dieta litogénica de glucosa libre de grasa da por resultado una reducción en la colelitiasis de colesterol (24).

Se ha demostrado que con la dieta libre de grasa y rica en glucosa, la frecuencia de cálculos de colesterol va disminuyendo conforme la caseína es substituída por proteína de soya. Esta reducción de la litogénicidad de la dieta, está asociada a una reducción de colesterol biliar y a un aumento en la proporción de sales biliares/colesterol (25).

Diferentes condiciones hormonales influyen en la producción dietética de cálculos biliares empleando la dieta semipurificada de 72.3% de sacarosa con 2% de manteca de cerdo. La gonadectomía disminuye los cálculos de colesterol y aumenta los de pigmento en ambos sexos; el mismo efecto también ocurre por tratamiento de hembras intactas con progesterona y en ambos sexos por ingestión de glándula tiroides desecada (26).

La formación de cálculos con las dietas de Daw altas en glucosa o sacarosa y libres de grasas se debe a un incremento de la síntesis de colesterol; además, en la bilis vesicular la concentración de colesterol se eleva, mientras que las de fosfolípidos y ácidos biliares se reducen en comparación con las concentraciones en la bilis vesicular de jámsteres mantenidos con la dieta que contiene almidón de arroz (17,27).

b) Cálculos amorfos de pigmento:

Como ya se ha mencionado los cálculos amorfos de pigmento también se producen con las dietas semipurificadas de Daw, sin embargo, su frecuencia es baja y su producción variable al repetir un experimento (17). Variaciones en la composición de la dieta pueden aumentar la frecuencia de estos cálculos. Así, cuando se varían las proporciones entre la glucosa y el almidón de arroz, y entre la sacarosa y el almidón de arroz en dietas litogénicas con 2% de manteca de cerdo, los cálculos amorfos de pigmento se producen en una frecuencia máxima (150%) cuando ambos carbohidratos están presentes en cantidades aproximadamente iguales (23). También, la adición de aceites ricos en ácidos grasos insaturados, tales como el de hígado de bacalao y el de soya, favorecen la producción de este tipo de cálculos (19,20).

La adición de 1% de colesterol en la dieta alta en carbohidratos y adicionada de margarina o mantecquilla incrementa en tres veces la frecuencia de colelitiasis pigmentaria entre las hembras, pero no afecta considerablemente la de los machos (22).

Con las dietas de Daw la producción de cálculos amorfos de

pigmento es más alta entre las hembras que entre los machos; asimismo, mientras mayor sea la edad de los animales al iniciar el experimento mayor será el porcentaje de animales con este tipo de cálculos (17).

Cohen et al (14) reportan que una dieta semipurificada alta en sacarosa y con 0.2% de colesterol y 150 ug% de etiril estradiol producen una alta frecuencia (50%) de cálculos pigmentarios en jaimsteres machos; señalan que el colesterol dietético puede ser el causante de esta coleritiasis, ya que aumenta el calcio biliar y quizás la nucleación de sales de calcio se favorezca por los elevados niveles de colesterol biliar que se producen.

Por otro lado, Washimoto ha producido cálculos de pigmento empleando una dieta compuesta de alfa-almidón, 20% de manteca y 13% de colesterol más neomicina; mientras que Shioda los produce con 60% de sacarosa, 5% de manteca de cerdo y 2% de aceite de hígado de bacalao (15).

Bergman y Van der Linden demostraron que tanto la hormona tiroidea l-tiroxina, así como su diisomero al nivel de 50mg/kg de una dieta semipurificada baja en grasas y alta en almidón de arroz producen la formación de cálculos de pigmento (28, 29).

El mucus secretado por la mucosa de la vesícula biliar está involucrado en la formación de cálculos pigmentarios (17).

Recientemente, Maist et al encontraron que una dieta semipurificada alta en glucosa incrementa la secreción de mucus tanto antes de la formación de los cálculos como durante su formación, regresando después al nivel de secreción normal, a pesar de que continúe

suministrando la dieta litogénica. Sin embargo, no parece actuar como núcleo para los cálculos de pigmento, pero sí tener un papel importante en su crecimiento (30).

B. Colelitiasis producida con dietas no purificadas

a) Cálculos de Colesterol

En jánsteres la adición de colesterol (0.24%) a una dieta estándar de mantenimiento y la administración de etinil estradiol (15 µg/Kg/d) producen una bilis saturada de colesterol debido a un incremento en la síntesis de éste y de fosfolípidos, lo cual conduce a la formación de cálculos de colesterol en 90% de los animales en 12 semanas; si además se les suministra ácido quencés² ácido α uracéd²inolónico (20 mg/Kg/d) se previene la formación de cálculos debido a una reducción en las enzimas hidroximetil glutaril Co A reductasa y colesterol 7-alfa hidroxilasa (31).

b) Cálculos de Pigmento

Estudios sobre la producción de cálculos biliares pigmentarios con dietas no purificadas fueron iniciados por Granados en 1971, en la Habana, Cuba (32); al reportar que una dieta de mantenimiento para ratones produce cálculos biliares, amorfos de color negro o verde oscuro, y que no contienen colesterol pero sí hidroxapatita; observó que este tipo de cálculos se presenta con mayor frecuencia en los machos que en las hembras, en contraste a lo encontrado por Day y colaboradores (17), donde las hembras son más susceptibles a padecerlos. Granados demostró que con esta dieta litogénica de

mantenimiento los suplementos de zanahoria y leche de vaca, juntos o por separado no influyen apreciablemente en la producción de estos cálculos, y que la sustitución de 3% de azúcar (sacarosa) por 3% de miel final (melaza) contenida en la dieta litogénica de mantenimiento no tiene efecto sobre la litogenicidad de la dieta (33).

Posteriormente en 1972, Granados introdujo en México la misma cepa de Jámsteres, y sus observaciones desde el establecimiento de la colonia e inicio de los experimentos, demostraron que aquí al igual que en Cuba, el macho también exhibe una mayor susceptibilidad a la colelitiasis pigmentaria que la hembra, por lo cual los experimentos que revisaremos en seguida se han llevado a cabo en machos.

1) Factores litogénicos y no litogénicos:

Granados encontró que una dieta comercial (Purina Laboratory Chow for Rats, Mice and Hamsters) suplementada con leche de vaca y zanahoria produce una alta frecuencia de cálculos pigmentarios (34). En un estudio subsiguiente halló que la leche de vaca tiene acción litogénica, ya sea esta procesada, pasteurizada, homogenizada, cruda o hervida (35); posteriormente ensayando fracciones de la leche de vaca, encontró que la fracción grasa (mantequilla y crema) es la responsable de la colelitiasis; así de este modo, se estableció una dieta litogénica no purificada constituida por 75% de Purina Laboratory Chow for Rats, Mice and Hamsters y 25% de mantequilla pura de leche de vaca.

Granados y colaboradores han reportado que la frecuencia y masa de los cálculos producidos por la mantequilla están determinados por la

edad de los animales a la que inicia el experimento (36), ya que cuando la dieta litogénica se suministra a jámsteres de 22 y 112 días de edad la frecuencia de cálculos es muy similar, pero esta disminuye cuando se suministra a los 202 días; por el contrario el peso promedio de los cálculos es apreciablemente mayor cuando se emplean jámsteres de 112 y 202 días de edad.

En la búsqueda de otras sustancias con posible acción litogénica, Granados y colaboradores ensayaron la margarina y seis Aceites Vegetales Comestibles que se expenden comercialmente en México (Aceite de Maíz, Aceite de Soya, Aceite de Ajonjolí, Aceite de Girasol, Aceite de Cártamo y Aceite de Algodón, a nivel de 25% en dieta respectivamente), sin que tuvieran acción litogénica alguna (37).

Posteriormente probaron que la manteca de cerdo a un nivel de 25% en dieta basal de purina exhibe una acción litogénica que es menor a la exhibida por la mantquilla (38). Estos resultados en conjunto indican que las grasas de origen animal son litogénicas, mientras que las de origen vegetal no lo son.

Por otro lado, empleando una dieta con 40% de sacarosa, 10% de mantquilla y 50% de purina, producen cálculos de pigmento con una frecuencia más elevada que la dieta litogénica con sólo 25% de mantquilla (39). En un estudio subsiguiente, Granados y colaboradores compararon la litogenicidad de carbohidratos refinados de fácil absorción tales como : sacarosa, glucosa y fructosa a nivel de 50% en la dieta de purina, encontrando que la sacarosa y la glucosa producen una frecuencia muy alta de cálculos biliares, mientras que la fructosa la hace de una manera moderada (40).

Cabe hacer mención que estos azúcares cuando se adicionan en dietas purificadas sin grasa y con bajo contenido de esta, producen casi siempre sólo cálculos de colesterol (40), mientras que cuando se incorporan en dietas no purificadas como mencionamos, producen sólo cálculos de pigmento.

Por otra parte, considerando el contenido de vitamina A de la mantquilla de leche de vaca, Granados y colaboradores pusieron a prueba la posible acción litogénica de esta vitamina adicionada en la purina (41). Los resultados demostraron que la vitamina A per se produce una alta frecuencia de cálculos de pigmentos en el páncreas, la cual es proporcional con la dosis suministrada, en el rango de 1500 a 15000 UI% en dieta; además, con el nivel mayor de vitamina A los animales no exhiben síntomas clínicos de hipervitaminosis A. Como continuación del estudio litogénico de la vitamina A, pusieron a prueba la posible acción litogénica de la forma ácida de la vitamina A, el *trans*-ácido retinoico (42), el cual no se almacena en el hígado ni sustituye al retinol en sus funciones en el sistema reproductivo, pero sí en el crecimiento y diferenciación de epitelios. El ácido retinoico a los niveles de 10.5 y 15.75 mg% (24 000 y 35 000 UI% de vitamina A respectivamente) en la dieta produce una alta frecuencia de coleditiasis la cual es similar a la producida por niveles equivalentes de acetato de retinol; además el ácido retinoico reduce los niveles hepáticos de vitamina A, lo cual indica que no hay relación entre el almacenamiento de grandes cantidades de vitamina A y la coleditiasis pigmentaria.

Posteriormente un análisis hematológico, mostró que la coleditiasis

pigmentaria producida por la vitamina A en el Jánster, no está relacionada con alteraciones en los valores hematológicos (hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, reticulocitos y bilirrubina plasmática) que indiquen anemia o hemólisis que conduzcan a la producción de un exceso de bilirrubina (43), como ocurre en el hombre con los cálculos negros de pigmento.

Asimismo, el análisis de algunos factores en bilis vesicular, mostró que la colelitiasis no está asociada a un exceso de bilirrubina o de calcio totales en la bilis vesicular y que no hay alteración del pH de esta, pero que sí se acumula un volumen de bilis vesicular mayor en animales con cálculos en ayuno por 12 hrs.; además, el nivel de vitamina A suministrado (25 000 UI) no produce hipercalcemia (44).

11) Factores modificadores de la colelitiasis pigmentaria:

a) Dieta básica

Un estudio comparado del efecto litogénico de la mantequilla al adicionarse a diferentes dietas de mantenimiento para roedores mostró que dependiendo de la dieta de mantenimiento usada la frecuencia de colelitiasis producida por la mantequilla varía desde una ausencia en la producción de cálculos con una dieta para roedores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, hasta una alta frecuencia con Purina pasando por una producción menos frecuente con la dieta de Apt-rata, lo cual indica una interrelación de la acción litogénica de la mantequilla con algún componente (s) de las dietas básicas (45,46).

b) Hormonales

Los machos son más susceptibles a la coleditiasis producida tanto por la mantequilla como por la vitamina A (47). La orquidectomía disminuye notablemente la coleditiasis, siendo esta una evidencia de que los andrógenos están implicados en la formación de los cálculos pigmentarios (48). En un estudio subsiguiente, suministrando testosterona al jéster macho normal, Granados y colaboradores observaron que esta aumenta notablemente la acción litogénica de la mantequilla (49). Contrario a lo que ocurre con la orquidectomía la ovariectomía incrementa apreciablemente la coleditiasis producida tanto por la vitamina A como por la glucosa (50). Probablemente las hormonas sexuales juegan un papel importante en la etiología de los cálculos biliares de pigmento.

ii) Potencializadores

Granados y colaboradores investigaron si la zanahoria tiene una acción potencializadora de la litogenicidad de la mantequilla y la vitamina A, encontrando que la zanahoria potencializa marcadamente la acción de ambos agentes, pero que la zanahoria al nivel de 35% en dieta no tiene acción litogénica por se (51,52).

Asimismo, la adición dietética de los aceites de olivas (20%) y de cártamo (20%) puros potencializan apreciablemente la coleditiasis pigmentaria producida por la vitamina A (53).

iii) Factores preventivos

Granados y sus colaboradores han realizado estudios en la búsqueda de un agente preventivo de la coleditiasis pigmentaria. Probaron el producto comercial DRENCHEPOR, el cual contiene coleducticos, colagogos y hepatoprotectores, observando que al nivel de 2% en la

dieta previene completamente la coledocistitis pigmentaria producida por la vitamina A, tanto en las hembras como en los machos; sin embargo provoca un menor crecimiento en los animales que lo reciben, reflejando así que tiene efectos tóxicos (54). Del DRENCHEPAR la fracción con los coledocéticos y hepatoprotectores a nivel de 1.5% en la dieta (0.35% de ácido dehidrocólico, 0.35% de ácido desoxicólico, 3.30% de glucuronolactona, 0.48% de cloruro de calcio fosforilcolina) previenen la coledocistitis pigmentaria, no así los colagogos, ni el excipiente (55). En investigaciones posteriores hallaron que el ácido dehidrocólico al nivel de 0.48% o 0.5% en la dieta previene completamente la coledocistitis; sin embargo, sigue habiendo un menor crecimiento en los animales (56,57).

La posible acción preventiva del preparado comercial POLIFAT KA-02, fue probada. El POLIFAT KA-02 es un derivado del aceite de cártamo, cuya composición es: ácido palmítico 6.5%, ácido esteárico 2.5%, ácido oléico 12.0%, ácido linoléico 77.0% y ácido linolénico 2%; este derivado, al nivel de 15% en dieta, previene completamente la formación de cálculos biliares de pigmento producidos tanto por la vitamina A como por la glucosa, y no produjo efectos macroscópicos de toxicidad (58,59).

El POLIFAT KA-02 reduce las concentraciones hepáticas y plasmáticas de vitamina A cuando se suministran 25 000 UI% de vitamina A en la dieta; sin embargo, la reducción de los niveles hepáticos y plasmáticos de vitamina A no es la vía por la cual se previene la coledocistitis, ya que con menores niveles dietéticos de vitamina A (15 000 UI%) se logran concentraciones hepáticas y

plasmáticas similares a las producidas por POLIFAT KA-02 con la dieta más alta en vitamina A (25 000 UIX) y sin embargo aun se presentan los cálculos con elevada frecuencia (60).

Tomando en cuenta la acción preventiva del POLIFAT KA-02, Granados y colaboradores, investigaron la posible acción preventiva de los derivados de otros aceites vegetales, tales como el POLIFAT US-2, rico en ácido oléico y el POLIFAT S-02 el cual contiene un menor porcentaje de ácido linoléico y una mayor de ácido linolénico que el POLIFAT KA-02, encontrando que estos dos derivados carecen de acción preventiva. De este modo, señalan que el agente preventivo parece ser exclusivo del POLIFAT KA-02, y sugieren que probablemente durante la elaboración del POLIFAT KA-02 se produce un isómero de algún ácido graso que pudiera ser responsable de esta prevención o que el agente preventivo fuese separado de un antagonista o tóxico presente en el aceite completo (61).

Por otra parte, considerando la tradición popular en México y otros países acerca de que ciertos vegetales previenen la formación de cálculos biliares y otras enfermedades hepáticas, Granados y colaboradores pusieron a prueba la posible acción preventiva del extracto hidroalcohólico de hojas de GOBERNADORA (Cassia siliquata) y del bulbo de AJG (Allium sativum) al nivel de 4% en la dieta respectivamente (62), encontrando que la GOBERNADORA previene totalmente la formación de cálculos biliares de pigmento producidos por la vitamina A, pero exhibe una alta toxicidad en los jumentos que la ingieren, mientras que el extracto de AJG previene parcialmente esta colicitiasis y no produce signos macroscópicos de

toxicidad. Al suministrar bulbo de AJO entero desecado al nivel de 12% en la dieta se aumenta el grado de protección; sin embargo, se inhibe notablemente el crecimiento (63).

Por otro lado, Granados y colaboradores pusieron a prueba la posible acción preventiva del antioxidante biológico vitamina E (a nivel de 300 mg% en la dieta) y la de un antioxidante artificial, el azul de Metileno (a nivel de 126 mg% y 200 mg% respectivamente), ya que la GOBERNADORA tiene un elevado contenido del antioxidante Ácido Nordihidroguaiaretico y se ha sugerido que en la patogénia de la coliclitiasis pudiesen estar involucrados fenómenos de peroxidación (64). Los resultados mostraron que la vitamina E no previene la coliclitiasis pigmentaria, mientras que el azul de metileno, a los niveles empleados si la previene notablemente, sin embargo, inhibe apreciablemente el crecimiento (65).

En relación a la posible acción preventiva de los antioxidantes se pusieron a prueba dos antioxidantes artificiales que se usan como aditivos para la conservación de lípidos alimenticios: Butilhidroxianisoi y Butilhidroquinona terciaria a nivel de 300 mg% en la dieta, pero ninguno de los dos antioxidantes previno la coliclitiasis pigmentaria producida por la vitamina A (66).

Segunda Parte

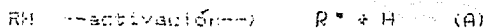
I. La peroxidación de lípidos y los antioxidantes

Con el fin de tener un mejor entendimiento acerca del papel del hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante en los sistemas biológicos y no biológicos, a continuación haremos una breve revisión del mecanismo de peroxidación de los lípidos y su prevención por los antioxidantes.

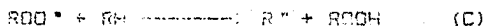
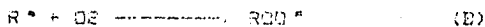
Se define la peroxidación o autooxidación como la oxidación espontánea de una sustancia en contacto con el oxígeno molecular. El deterioro oxidativo de los lípidos en los alimentos que contienen grasas, es de gran importancia, ya que afecta la aceptabilidad del alimento al cambiar su sabor (rancidez) y color, además de disminuir su valor nutritivo y producir efectos tóxicos al consumirlos. En los sistemas biológicos la oxidación de lípidos también tiene profundas consecuencias, por ejemplo, la degradación de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular por la peroxidación está involucrada en lesiones del hígado inducida por varios agentes químicos. La peroxidación es debida a la producción y propagación de radicales libres. Los lípidos más susceptibles a la peroxidación son los ácidos grasos insaturados, especialmente aquellos que tienen más de una doble ligadura (57,60).

El mecanismo general de la peroxidación de lípidos es la vía denominada del "Hidroperóxido", la cual, fue propuesta hace más de treinta años por Farmer y colaboradores(58). Según esta teoría, la reacción de peroxidación se realiza a través de un mecanismo de radicales libres, que consiste en los siguientes pasos, donde RH representa una molécula de lípido:

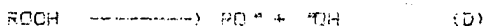
Etapa 1: Iniciación



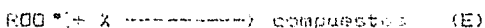
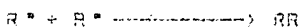
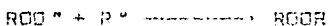
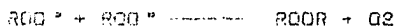
Etapa 2: Propagación



Etapa 3: Descomposición



Etapa 4: Terminación



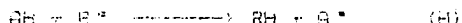
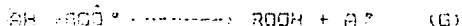
estables

Durante la primera etapa, unas pocas moléculas de lípido (RH) resultan activadas por el calor, la luz o un catalizador metálico, etc., para descomponerse en radicales libres inestables.

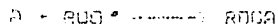
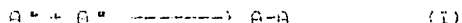
Inmediatamente y en presencia de oxígeno molecular, se produce una interacción entre el radical libre (R^\bullet) y el oxígeno, resultando el radical peróxido (ROO^\bullet). Este radical reacciona entonces con otra molécula de lípido sin activar (RH) generándose el hidroperoxido ($ROOH$) y un radical libre (R^\bullet), a través del cual se propaga la reacción. En esta etapa se siguen formando los radicales libres sin necesidad del activador inicial. La reacción continúa y se generan más hidroperoxidos a partir de moléculas de lípidos. La reacción termina cuando los radicales libres (R^\bullet , ROO^\bullet) se combinan entre sí (RR , $ROOR$) o con inactivadores de radicales libres (representados

por X) para dar compuestos estables que se acumulan en el sistema. La descomposición de los hidroperóxidos se produce a medida que aumenta su concentración en el sistema, produciendo radicales alcoxilo, hidroxilo y otros, los cuales pueden propagar la peroxidación.

Los antioxidantes son sustancias que retardan la peroxidación o autooxidación. Una sustancia puede actuar como antioxidante en una variedad de formas, tales como por unión competitiva con el oxígeno, por retardo de la etapa de iniciación, por bloqueo de la propagación destruyendo o uniendo radicales libres, por inhibición de catalizadores de la activación, por estabilización de los hidroperóxidos, etc. Todos estos mecanismos pueden ocurrir tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos, aunque el más importante parece ser el del bloqueo de la propagación. En este mecanismo, el antioxidante AH actúa como donador de hidrógeno a un radical libre:



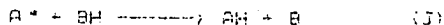
El radical libre antioxidante A es inactivo, es decir, no inicia un proceso de propagación en cadena, sino que entra en reacciones de terminación tales como



El antioxidante puede

regenerarse si se halla presente un donador de hidrógeno secundario

(BH), si el potencial de óxido-reducción de la siguiente reacción resulta favorable:



El retardo en la peroxidación de lípidos es aproximadamente proporcional a la concentración de antioxidante, hasta llegar a cierto nivel. Una concentración excesiva de antioxidante puede resultar ineficaz o aún provocar una inversión en el efecto protector.

II. El hidroxitolueno butilado

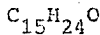
El hidroxitolueno butilado (BHT) ha sido ampliamente utilizado en los Estados Unidos como aditivo en los alimentos desde 1954 y desde 1956 en Japón (69), para prevenir el deterioro oxidativo de los ácidos grasos dietéticos (70,71). En 1963 el Comité de Estándares de los Alimentos de Estados Unidos recomendó que el BHT no debería ser empleado en los alimentos porque podría representar un posible peligro para la salud (70). Sin embargo, en 1965 el Comité para la Protección de Alimentos en su publicación 1274, titulada "Sustancias Químicas Utilizadas en el Procesamiento de Alimentos", enumeró unos 3000 aditivos para alimentos en doce grupos principales, siendo uno de estos grupos el de los antioxidantes y entre estos los principales son los compuestos fenólicos sintéticos: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (PB), y ácido nordihidroguaiarético (NDGA), el cual fue posteriormente prohibido debido a su toxicidad. Los otros antioxidantes se emplean en concentraciones de hasta 200 ppm sobre base de grasa. Además, también se incluyen como antioxidantes compuestos tan diversos como el ácido

ascórbico, el cloruro estañoso y tocoferoles (vitamina E), los cuales por sí solos tienen poco efecto en la peroxidación de lípidos, pero al combinarse con los antioxidantes principales tienen un efecto sinérgico. Sin los antioxidantes, las papitas fritas, cereales para desayuno, nueces saladas, alimentos deshidratados que contienen grasa, galletas saladas y muchos otros alimentos grasos no podrían almacenarse más que por cortos períodos de tiempo en los estantes del supermercado sin que desarrollaran rancidez (63, 72).

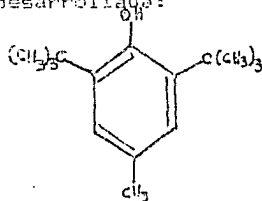
La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha estimado que el hombre consume 2.5 mg/kg de peso corporal/día de BHT y BHA (63, 73).

A. Química.

El hidroxitolueno butilado (BHT), también denominado como butilhidroxitolueno o 4-metil-2,6-di-*t*-butilfenol o 2,6-di-*t*-butil-*p*-cresol. Tiene un peso molecular de 220.4 y las siguientes fórmulas condensada y semidesarrollada:



Fórmula condensada



Fórmula desarrollada

El BHT es un polvo blanco cristalino, inodoro e insípido, con un punto de fusión de 70 °C, un punto de ebullición de 265 °C, un punto de ignición de 260 °F (127 °C), y una densidad de 1.048, es insoluble en agua, glicerol y glicolpropileno, prácticamente insoluble en soluciones alcalinas, fácilmente soluble en tolueno, soluble en

acetona, etanol, metanol, isopropanol, benceno, éter, cloroformo, parafina líquida, aceites fijos y en muchos otros solventes hidrocarbonados. Tiene un índice de acidez no mayor de 0.05 (70,71,74).

B. Usos.

Además de emplearse en los alimentos a concentraciones de 200 ppm en base de lípidos, el BHT también se utiliza en productos del petróleo, goma sintética, plásticos, jabón y como antidesprendedor de pinturas y estucos (71).

C. Efectos del BHT en los organismos.

El BHT ha revelado ser un efectivo inhibidor de la inducción de tumores por diferentes tipos de carcinógenos, incluso fué de los primeros antioxidantes que se utilizaron para este fin (75,76).

El efecto producido por los antioxidantes sobre la carcinogénesis inducida por agentes químicos ha sido analizado por numerosos investigadores (77). Mc Cormick et al. encontraron que tanto el BHT como el acetato de retinol reducen la frecuencia de cáncer mamario inducido por el 7,12-dimetilbenceno(a)-antraceno (DMBA) en ratas: este efecto es mucho mayor cuando se suministran juntos el BHT y el acetato de retinol, es decir tienen una acción sinérgica; sin embargo, se produce una hepatotoxicidad expresada como hiperplasia biliar y fibrosis hepática, las cuales son menos frecuentes y menos severas en los animales que sólo reciben BHT o acetato de retinol (75,79).

Así mismo se ha reportado que el BHT protege al DNA de los hepatocitos de rata contra daños provocados por

N-2-acetilaminofluoreno (2AAF) o N-Hidroxil-2AAF (N-OH2AAF) (80).

Se han postulado los siguientes mecanismos para explicar la inhibición de la carcinogénesis por los antioxidantes: 1) previniendo la activación metabólica de un precarcinógeno por a) inhibición de la enzima activadora o b) alteración del patrón metabólico del carcinógeno vía inducción enzimática selectiva. 2) previniendo la reacción entre el carcinógeno final y el DNA por a) interacción directa con la especie carcinogénica, b) incremento en la detoxificación debida a la inducción de enzimas por el antioxidante o c) competencia entre el carcinógeno y el antioxidante en el proceso de unión al tejido o al DNA (76, 77, 80).

Sin embargo, aunque el BHT es reconocido como seguro por la Administración de Alimentos y Drogas (73), varios reportes establecen que también puede ser un agente coadyuvante de procesos carcinógenos. Por ejemplo, a dosis superiores al 5% en la dieta el BHT promueve la carcinogénesis de la vejiga urinaria, tiroides y esófago, a la vez que inhibe la carcinogénesis del conducto auditivo y de la glándula mamaria (77). Asimismo, Lindscheid et al. (81) alimentaron a una cepa de ratones susceptibles a desarrollar tumores espontáneos, con una dieta conteniendo 0.5% o 0.05% de BHT durante 18 meses, encontrando que los machos tuvieron un incremento significativo en la frecuencia de tumores en el hígado, el cual no se encontró en las hembras. Similarmente, Kouki et al. (69) al suministrar en la dieta BHT a los niveles de 2% (osis de tolerancia máxima) y 1% durante 104 semanas a ratones de la cepa B6C3F1 (que también son susceptibles a desarrollar tumores espontáneos) encontraron que en los machos se

presentan tumores hepatocelulares con una frecuencia dependiente de las dosis, mientras que en las hembras la frecuencia es menor pero estadísticamente no significativa; además encontraron que se produce leucemia linfóide (cuya incidencia es más alta en las hembras que en los machos) y otros tipos histológicos que no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados y los controles. Sin embargo, hay que considerar que este efecto del BHT es sobre ratones muy susceptibles a desarrollar tumores y/o a dosis muy elevadas (7 o 8 1.0%).

No obstante que el BHT generalmente exhibe un efecto inhibitorio cuando se administra antes y/o simultáneamente con el carcinógeno, en algunos casos provoca lo contrario, es decir potencializa al agente carcinógeno; por ejemplo, a dosis de menos del 1% aumentó la carcinogénesis en la vejiga urinaria de rata iniciada con 2AAF (77). Landenscheid et al. (81), dando una dieta conteniendo 0.5% de BHT a ratones de la cepa C3H tratados con dimetilhidracina o metilnitrosourea, encontraron que el BHT incrementa significativamente la frecuencia de tumores en el colon inducida por la dimetilhidracina, pero no la inducida por el metilnitrosourea.

Ha sido reportado por Taffe y Kensler (75) que el metabolito hidropéroxido del BHT, el 2, 6 -di- t- butil -4- hidroperoxil -2,5- ciclhexadignona (BHTOOH) a dosis de 2 μ mol, 8 μ mol y 20 μ mol tiene una actividad promotora de tumores en el modelo multistadio de piel de ratón previamente iniciados con DMBA. Sin embargo, al aplicar BHTOOH en ratones no iniciados con DMBA no se desarrolla ningún papiloma o carcinoma, lo cual indica que el BHT no es un carcinógeno completo.

Sin embargo, el BHT no es un promotor de tumores en este modelo previamente iniciado con DNBA (61), lo cual apoya la hipótesis de que el BHT requiere de activación metabólica para tener actividad como promotor de tumores.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el efecto del BHT en el desarrollo de tumores depende de la cepa y órgano blanco examinado, así como de la dosis y posiblemente también del carcinógeno químico utilizado.

Por otro lado, se ha reportado en varios estudios que el BHT causa un efecto tóxico en pulmones de ratón (82,83), el cual se caracteriza por necrosis temprana de las células alveolares tipo II, probablemente debido a la unión covalente del metabolito BHT-quinone methide con macromoléculas pulmonares (82). Mizutani et al. (83) sugieren que la forma de detoxificación del pulmón podría ser mediante una conjugación del BHT-quinone methide con el glutatión (GSH), y que en el hígado no ocurre toxicidad porque presenta una mayor concentración de GSH que el pulmón. En apoyo a esta idea en un estudio subsiguiente encontraron que una combinación de BHT (200-500 mg/kg suministrados oralmente a ratones machos de la cepa ddY) y un inhibidor de la síntesis de GSH, la sulfoximina butionina (BSO) da por resultado una hepatotoxicidad, la cual se caracteriza por un incremento en la actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica, además observaron que se produce un incremento que va de marginal hasta el doble en la concentración de Ca hepática cuando se combina BHT (200mg/kg) y BSO. En contraste, el BHT no combinado (hasta 300 mg/kg) no produce evidencia de daño hepático (84).

Se ha reportado que el BHT afecta la composición y cantidad de lípidos en el hígado. Kato et al. (84) encontraron que la adición dietética de compuestos xenobióticos, entre ellos el BHT a 0.2% en la dieta, incrementan los lípidos totales en el hígado de rata y eleva el colesterol plasmático. Takahashi e Hiraga (85) hallaron que el BHT a dosis de 1.22% en la dieta durante una semana afecta la composición lipídica del hígado de rata de la siguiente manera: incrementa significativamente los ésteres de colesterol y fosfolípidos, pero disminuye los triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y los diglicéridos; también aumenta el contenido de fosfatidilserina o disminuye fosfatidilinositol y lisofosfatidilcolina. Se ha sugerido que estos cambios son debidos al incremento de retículo endoplásmico liso que acompaña a la inducción del sistema metabolizador de drogas que provoca el BHT. La composición de ácidos grasos dentro de cada clase de lípidos también se vio alterada y también se redujeron las proporciones 16:1/16:0, 18:1/18:0 y 20:4/18:2 de lípidos totales, de los ácidos grasos no esterificados y de fosfolípidos, lo cual sugiere que el BHT reduce la actividad de desaturasas en el hígado. A pesar de que el peso relativo del hígado se incrementó significativamente, el contenido de lípidos por gramo de hígado no fue significativamente alterado.

Thompson y Milneus (86) en estudios de toxicidad in vitro con hepatocitos de rata indican que la citotoxicidad del BHT y del BHA (a concentraciones de 500 μ m y 750 μ m respectivamente) es debida a los efectos de estos compuestos per se y no de metabolitos de estos,

sobre las membranas celulares, particularmente sobre la membrana mitocondrial; señalar que los efectos se deben a un drástico efecto de desacoplamiento sobre la respiración que provoca un incremento en la hidrólisis de ATP y subsiguiente inhibición de la respiración, lo cual ocasiona efectos deletéreos en muchas de las actividades celulares incluyendo la capacidad de la célula para mantener el gradiente iónico de calcio a través de la bomba de Ca dependiente de ATP (conservada a 100 μ m de BHT y 100 μ m de BHA) (87), la polimerización de actina y el mantenimiento del citoesqueleto y dañando críticamente la capacidad de la célula para responder a la provocación tóxica.

Por otro lado ha sido reportado por Meyer et al (88) que el BHT es un inductor de lesión renal. Ellos observaron que se produce nefropatía con una marcada dilatación de varios túbulos en la zona medular y cortical del riñón cuando se suministra 1% de BHT dietético (por 48 días) a ratas hembras; y que una dieta semisintética tiene un efecto marcado en la severidad de la lesión. En un estudio posterior alimentaron a ratas hembras con una dieta semisintética que induce nefrocalcinosis con o sin 1% de BHT, con el objeto de determinar la influencia del BHT, encontraron que éste produce nefropatía independientemente de la nefrocalcinosis (89).

Existe una relación entre la dosis de BHT suministrado y la proporción de muerte hemorrágica, la cual ocurre en ratas cuando el BHT se suministra en cantidades por encima de 526mg/kg.día (89). Los animales muertos exhiben hemorragia pasiva en las cavidades pleural y peritoneal. No ocurre necrosis de las células del hígado, lo cual

indica que esta no es la causa de la hemorragia; a pesar de que hay una disminución en el índice de protrombina, esta no propicia la hemorragia, ya que para que esta se de se requiere que estén alterados los demás elementos del sistema de coagulación (vasos sanguíneos, plaquetas, coagulación y fibrinólisis).

Poco se conoce acerca del mecanismo exacto de como el BHT causa toxicidad o carcinogenicidad (72). La mayoría de los estudios sugieren que se requiere de la activación metabólica del BHT dependiente de citocromo P-450 para volverlo tóxico. Se han empleado inhibidores de citocromo P-450 como el SKF-525A, piperonil butóxido y el disulfido de carbón en combinación con el BHT, logrando prevenir el efecto tóxico o carcinógeno de este último. Indicando así que el BHT tiene que ser activado por una reacción metabólica dependiente de citocromo P-450 para que se de el efecto tóxico o carcinógeno (75, 32, 33). El BHT en el hígado parece seguir dos vías principales para su metabolismo, una involucra la hidroxilación de un sustituto alquilo y la otra la oxidación del sistema electron II (75). La primer vía metabólica involucra la oxidación secuencial del grupo *o*-metil al alcohol *o*-benzil, después a aldehído y finalmente a ácido carboxílico, el cual es conjugado y excretado principalmente como glucurónido. La vía oxidativa electron II lleva a la formación de productos con una estructura ciclohexadienona (OHTDOH), los cuales presumiblemente surgen a través de la formación de un radical BHT-feroxil intermediario, el cual, puede además unirse covalentemente a proteínas y formar productos diméricos. Este radical intermediario se forma *in vitro*, mediante la oxidación del BHT

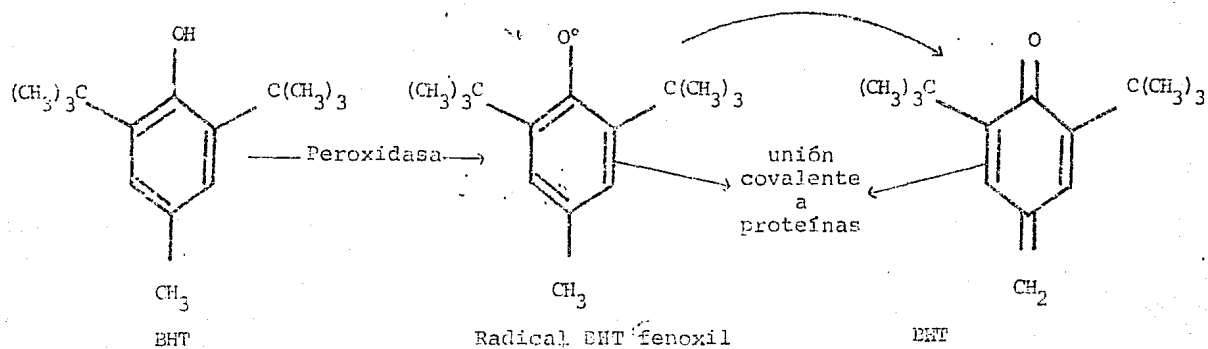


Fig 1. Formación del EHT quinone methide.

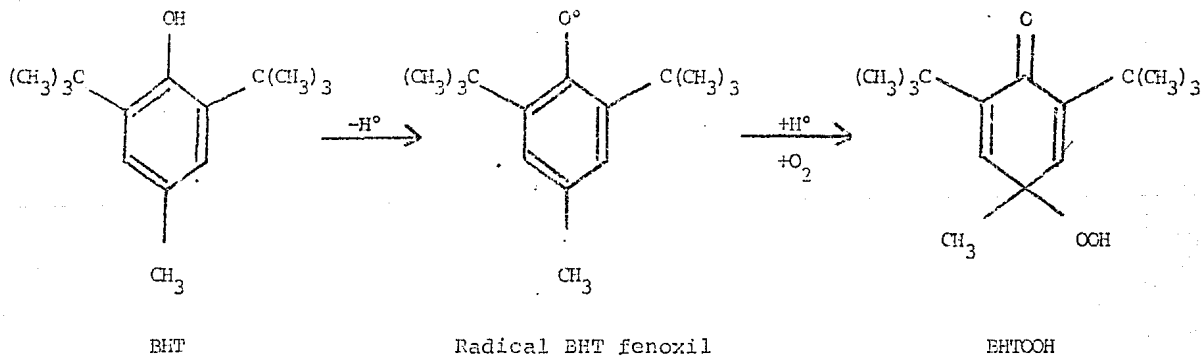


Fig 2. Formación de EHTOOH mediante la vía de oxidación del sistema electron II.

catalizada por la peroxidasa del rábano o la peroxidasa de la prostaglandina H sintetasa (73, 92), resultando en la formación de un potencialmente tóxico BHT quinone methide (Fig.1); además cuando se agrega glutatión a esta reacción, el BHT quinone methide desaparece, tal vez debido a la formación de un conjugado BHT quinone methide-glutatión o posiblemente a la formación de glutatión oxidada y a la reducción de la quinone methide de vuelta a BHT. El BHTOOH se forma con la adición de oxígeno molecular al radical BHT fenoxil en la posición 6 del anillo, seguida por una electro-reducción (Fig.2).

Por el contrario Thompson y Moldava (86) reportan que la citotoxicidad del BHT y también del BHA en hepatocitos de rata (in vitro) no está relacionada con la formación de metabolitos reactivos, ya que los inhibidores de citocromo P-450, no tuvieron efecto en la prevención de la citotoxicidad. Kouki et al. (69) desprenden de sus estudios que la alta frecuencia de tumores hepatocelulares que se presentan en los ratones que más tiempo sobreviven, tal vez sea debido a una disminución en la función del citocromo P-450 del hígado asociado al envejecimiento.

D. Interacción del BHT y la Vitamina A.

Varios xenobióticos afectan los niveles hepáticos de vitamina A. Kato et al. (54), encontraron que la adición dietética de compuestos xenobióticos tales como BHT (0.2%), bifenilpoliclorinado (PCB, 0.2%) o 1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano (DDT, 0.25%) reducen los niveles hepáticos de vitamina A en ratas; por el contrario estos xenobióticos aumentan los niveles de colesterol en plasma, y sus

efectos se incrementan con una dieta alta en proteína.

Por otro lado, Lep et al (90), considerando que el consumo crónico de etanol reduce los niveles hepáticos de vitamina A en roedores, babuinos y humanos (90, 91), estudiaron el efecto de otros xenobióticos en la reducción de la vitamina A hepática producido por el alcohol; trataron a ratas machos durante un mes con dietas líquidas adicionadas con BHT (1.2 mg/ml), fenobarbital (8.3 mg/ml) o etanol (sustituido isocenergicamente por carbohidratos a 36% del total de energía) solos o en combinaciones. Se produjo una reducción de los niveles hepáticos de vitamina A cuando se administraron los tres compuestos por separado; así mismo, el BHT y el fenobarbital potencializaron el efecto del etanol, llevando los niveles hepáticos de vitamina A a menos del 5% del de los animales normales. Especialmente la combinación etanol-BHT produjo una comprendable reducción hepática tanto de ésteres de retinilo como de retinol libre hasta niveles insignificantes, a pesar de que se suministraron 6000 UI de Vit. A/1000Kcal. Por otra parte, a diferencia del etanol, el BHT no eleva los niveles de ésteres de retinilo y retinol libre de pulmón, riñón y plasma, lo que indica que el etanol, pero no el BHT, provoca una movilización de la vitamina A del hígado hacia los tejidos.

Mc Cormick et al. (79), hallaron que en ratas el BHT reduce la concentración hepática de vitamina A, aun cuando se administra acetato de retinol extra en la dieta. En los animales que no recibieron suplemento extra de Vit. A, el BHT redujo en aproximadamente 1/3 las reservas hepáticas de Vit. A.

Se ha sugerido que los compuestos xenobióticos que reducen los niveles hepáticos de vitamina A, lo hacen induciendo la actividad de una o más isoenzimas del citocromo P-450, y en consecuencia incrementan la actividad del sistema enzimático microsomal metabolizador de droga (EMMD) o algún otro sistema relacionado tal como peroxidasa o glucuronil transferasa, los cuales también podrían degradar vitamina A conduciendo a la reducción de los niveles hepáticos de vitamina A en el hígado, y a otros efectos adversos tal como toxicidad por el exceso de estos metabolitos; esta idea está apoyada por el hecho de que el metabolismo de ciclofosfamida y nicotina en los microsomas del hígado es inhibida competitivamente por el retinol, sugiriéndose así que el retinol y estos xenobióticos reaccionan en el mismo centro activo del sistema EMMD (30, 30, 31).

Kato et al. (34), encontraron que la inducción del sistema EMMD está acompañada por un incremento en el requerimiento de vitamina A, lo cual acelera el inicio de la deficiencia de Vit. A, especialmente cuando se suministra una dieta alta en proteínas.

En el caso del alcohol, además de este mecanismo, se sugiere que la reducción hepática de vitamina A puede ser debida a la movilización del hígado hacia los tejidos, resultando en un incremento de vitamina A en estos. Esta movilización pueda ocurrir no solamente como retinol unido a proteína ligadora de retinol (PLR), sino también como retinol asociado con lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); así mismo, después del consumo crónico de etanol hay un incremento en la secreción de lipoproteínas, lo cual podría acelerar la movilización de la vitamina A.

Cuando se suministran altos niveles de vitamina A en la dieta esta puede producir efectos tóxicos (23). Esta toxicidad por hipervitaminosis A puede ser aumentada por el BHT. Mc Cormick et al. (79), caracterizaron esta interacción hepatotóxica empleando 125 o 250 mg de acetato de retinol y 2500 o 5000 mg de BHT por Kg. de dieta, encontrando que mientras el BHT aumenta los efectos del retinol (e.g. alteración de la morfología hepática, aumento en el número de células de Ito y fibrosis hepática) el acetato de retinol no afecta la hepatomegalia producida por el BHT, lo cual refleja que el BHT tiene un efecto potencializador de la actividad hepatotóxica del acetato de retinol. Por otro lado, en los animales que sólo recibieron BHT no se observó ni toxicidad hepática ni elevación del nivel de transaminasas séricas, lo cual concuerda con lo hallado por Hirose et al. (78) quienes suministran a ratas dosis de 2500 y 10 000 mg de BHT/Kg. de dieta durante dos años.

Vencera Parba

Sección Experimental

A. Objetivo

En el presente estudio se puso a prueba el efecto del antioxidante fenólico sintético Hidroxitolueno butilado (BHT) sobre la litogénesis de la vitamina A, puesto que sustancias con actividad antioxidante tales como el azul de metileno y la Superóxido Dismutasa (SOD) previenen esta coliclitiasis (62,65), y se ha sugerido que fenómenos de peroxidación pueden estar involucrados en la patogénesis de la coliclitiasis pigmentaria (64).

Por otra parte, el BHT potencializa el efecto hepatotóxico de la hipervitaminosis A, por lo que podría también tener este efecto sobre la coliclitiasis.

Astísimo, en el presente estudio se determinó el efecto del BHT sobre las reservas hepáticas de vitamina A de jirafones alimentados con la dieta litogénica, ya que ha sido publicado que el BHT conduce a una reducción del contenido de vitamina A hepática (66).

B. Materiales y Métodos.

En los dos experimentos realizados, se utilizaron jirafones de ambos sexos, de la cepa GDM, recién destetados, la cual hasta hoy no ha producido mutantes del color del pelaje.

Los miembros de cada camada fueron distribuidos en tal forma que participaran más o menos por igual en los distintos grupos. Estos animales proceden de la colonia del bioterio de la Facultad de Ciencias, y fueron mantenidos en el mismo bioterio en jaulas experimentales de malla galvanizada con piso de malla metálica, alimentados ad libitum con las diferentes dietas y agua corriente.

Antioxi...

fueron pesados semanalmente para determinar las curvas de crecimiento como un parámetro de su estado de salud.

Primer experimento.

Se utilizaron 50 jumentos de 70 días de edad promedio divididos en dos grupos iguales y alimentados con las siguientes dietas durante 70 días: Grupo 1, Nutricubos Farina para Raciones Pequeñas, de Farina S.A., México, D.F., pulverizados + 25 000 UI% de acetato de retinol, tipo 500, de Productos Roche, S. R. México, D.F. (Dieta litogénica); Grupo 2, Dieta litogénica + 300 mg% de Hidroxitolueno butilado, procedente de Egon Meyer S.A., Tlalneapantla, Edo. de Méx.

Segundo experimento.

Se formaron 3 grupos de 21 jumentos de 36 días de edad promedio cada uno, los cuales fueron alimentados con las siguientes dietas durante 97 días: Grupo A, Dieta básica, pulverizada + 25 000 UI% de acetato de retinol, tipo 500 (Dieta litogénica); Grupo B, Dieta litogénica + 250 mg% de hidroxitolueno butilado. Los primeros 37 días experimentales se utilizó como dieta básica Nutricubos Farina para Raciones Pequeñas, y los siguientes 70 días fue alimento para Raciones de Laboratorio elaborado por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Al final del período experimental, los animales fueron puestos en ayuno por 12 horas, anestesiados con éter y sangrados por punción cardíaca con jeringas de 5 ml. y agujas de 25G. Se sacrificaron por fractura de la nuca y se sacrificaron inmediatamente después. Se diseccionó el líquido, sepanó y se conservó a 4°C, para determinar su contenido de Vitamina A. La sangre se dejó a temperatura ambiente por

30 a 60 minutos para permitir la coagulación y luego fue centrifugada a 2 500 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Adams-Rayno con caperal de corruipa CF-1350, el suero fue separado y mantenido a 0 C, hasta el momento del análisis de las transaminasas. Los análisis de vitamina A y transaminasas se realizaron en el transcurso de los tres días siguientes al sacrificio de los animales.

Vitamina A Hepática: La determinación del contenido de vitamina A hepática se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de Gibson (9): cada hígado fue pesado en una balanza analítica modelo Mettler A3M, colocado en una caja de petri de 50 x 15 mm y finalmente fue picado y molido homogéneamente. Se tomó una alícuota de 0.5g, la cual se colocó en un vial de 20 x 25 cm con tapón de rosca, se le agregó 1 g. de sulfato de sodio anhidro y se macho con una varilla de vidrio hasta obtener una masa de consistencia pastosa e inmediatamente después se le adicionaron 5 ml de cloroformo. Los viales fueron tapados y mantenidos a 0 C durante toda la noche. Una alícuota de 10 microlitros del extracto cloroformico se diluyó con 3 ml de etanol absoluto en una cubeta de cuarzo de 5 ml de capacidad por 1 cm de paso, y se leyó la absorbancia a 300, 330 y 380 nm en un espectro fotómetro Leas PMU11. Finalmente, el contenido de vitamina A en hígado se calculó con la siguiente fórmula:

$$A \text{ 330 corregida} = 0.5 (2.27 \times A \text{ 330} - A \text{ 380})$$

$$\mu\text{g retinol/g hígado} = A \text{ 330 corregida} \times \text{factor de dilución} \times 0.1535$$

Transaminasas:

Aspartato: El oxoglutarato amino transferasa o transaminasa glutámica pirúvica (SGPT): esta enzima fue determinada por el método de Reitman

y Frankel (93), con juegos de reactivos Merck-México, S.A, México D.F. de la siguiente manera : en un tubo de 100 X 13 mm fueron colocados 250 ul de la solución amortiguadora sustrato, la cual contenía 100 mM de amortiguador de fosfato de sodio a pH 7.4, 200 mM de DL-alanina / 2 mM de alfa-cetoglutarato; se incubó por 5 minutos a 37 C y posteriormente se agregaron 0.05 ul de suero, continuandose la incubación por 30 minutos. Inmediatamente después se añadieron 250 ul de una solución 1.5 mM de 2,4-dinitrofenilhidracina y se mantuvo 20 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este período se agregaron 2.5 ul de 0.4 N de NaOH y se determinó la absorbancia a 546 nm en el espectrofotómetro, entre 5 y 30 minutos después de agregar el NaOH. Las determinaciones se hicieron por duplicado y se leyeron contra un blanco consistente de la misma mezcla a la cual se agregó el suero después de la solución de 2,4-dinitrofenilhidracina.

L-Aspartato: L-oxoglutarato aminotransferasa o transaminasa glutámica oxaloacética. Esta enzima fue determinada por el método de Reisman y Frankel (93) y es igual al método para L-alanina L-oxoglutarato aminotransferasa, excepto que se emplearon solo 25 ul de suero y la solución amortiguadora-sustrato contenía 100 mM de L-Aspartato en vez de 200 mM de DL-alanina.

El análisis estadístico de los resultados se hizo por pruebas de chi-cuadrada y t de student.

C. Resultados.

Primer experimento:

En este experimento se puso a prueba el efecto del BHT, al nivel de 300 mg% sobre la coledocistitis pigmentaria y las reservas hepáticas de vitamina A.

Los resultados del primer experimento respecto a la frecuencia de coledocistitis se presentan en la Tabla 1, la cual muestra que los animales que recibieron la dieta litogénica (Grupo I) exhibieron una moderada frecuencia de coledocistitis (48.0%), mientras que el grupo que recibió la dieta litogénica adicionada con 300 mg% de BHT sólo presentó un animal con cálculos biliares (4.0%), siendo la diferencia significativa ($P < 0.001$). En cuanto al peso promedio de los cálculos, este fue mayor en el grupo litogénico, en el cual se presentaron 0.361 mg/animal con cálculos; mientras que en el grupo con BHT, el único animal que presentó cálculos exhibió una masa muy baja (0.110 mg), menos de un tercio del promedio del grupo litogénico.

En relación con el efecto del BHT sobre la vitamina A hepática, los resultados que se presentan en la Tabla 2, indican que no hubo diferencias ni en la concentración, ni en la cantidad total de esta entre el control litogénico (Grupo I) y el que recibió 300 mg% de BHT. Asimismo, la Tabla 2 muestra que no hubo diferencias significativas en el peso absoluto, ni en el peso porcentual del hígado. El peso porcentual que exhibieron estos dos grupos es similar al de cámaras de la misma edad mantenidas con dieta de mantenimiento. Estos resultados se obtuvieron del análisis de muestras tomadas a 10 animales de cada grupo: del Grupo I, 6 animales

TABLA 1

FRECUENCIA DE CALCULOS BILIARES EN EL PRIMER EXPERIMENTO.

| GRUPOS Y DIETAS | No TOTAL ANIMALES | No ANIMALES CON CALCULOS | % ANIMALES CON CALCULOS | PESO PROMEDIO DE CALCULOS |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 1 DIETA LITOGENICA (DL) | 25 | 12 | 48.0 | 0.381 |
| 2 DL + 300 mg% DE BHT | 25 | 1 | 4.0 | 0.110 |

TABLA 2

PESO DEL HIGADO Y VITAMINA A HEPATICA EN EL PRIMER EXPERIMENTO *.

| GRUPOS Y DIETAS | PESO DEL HIGADO (g) | PESO % DEL HIGADO | VITAMINA A HEPATICA (μ g/g HIGADO) | VITAMINA A TOTAL (g/HIGADO) |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 DIETA LITOGENICA (DL) | 3.33 \pm 0.33 (n=12) | 3.25 \pm 0.19 (n=12) | 2076.7 \pm 191.7 (n=12) | 6890.1 \pm 687.6 (n=12) |
| 2 DL + 300 mg% DE BHT | 3.24 \pm 0.45 (n=12) | 3.29 \pm 0.20 (n=12) | 2083.9 \pm 311.8 (n=12) | 6656.5 \pm 649.9 (n=12) |

* media \pm D.S.

fueron con cálculos y B sin cálculos; sin embargo, no hubo diferencias entre ellos en el peso porcentual del hígado, ni en el contenido de vitamina A hepática. En el análisis de muestras del Grupo B se incluyó al jámster que presentó cálculos, el cual tuvo valores de vitamina A y peso del hígado semejantes a los del resto de su grupo.

En cuanto al crecimiento, los resultados se presentan como incremento de peso semanal en la Tabla 3, y la curva de incremento de crecimiento se muestra en la Fig. 3; en estas se observa que el grupo que recibió la dieta litogénica adicionada con 300 mg% de BHT (Grupo 2) disminuyó su crecimiento desde el comienzo del experimento, mostrando al término de este un crecimiento promedio menor en 3 gramos, con respecto al grupo litogénico (Grupo 1); sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($P < 0.1$).

Segundo experimento:

En este experimento se incrementó el nivel dietético de BHT hasta 500 mg%, ya que la prevención de la colicistitis con 500 mg% no fue total y no produjo signos marcados de toxicidad.

Los resultados de este experimento respecto a la frecuencia de colicistitis se presentan en la Tabla 4, la cual muestra que los animales del grupo litogénico (Grupo 4) exhibieron al igual que en el primer experimento una moderada frecuencia de colicistitis (50.0%), mientras que ninguno de los animales que recibieron la dieta litogénica adicionada con 500 mg% de BHT (Grupo 5) presentaron cálculos biliares. En cuanto a la masa de cálculos que ocasionó el grupo litogénico, esta fue de 0.100 mg.

TABLE 3

| SEMANAS | GRUPOS | |
|---------|------------|------------|
| | 1 | 2 |
| 1 | 8.8 ± 4.0 | 7.6 ± 4.8 |
| 2 | 15.7 ± 4.6 | 12.7 ± 5.8 |
| 3 | 20.0 ± 5.2 | 16.8 ± 6.5 |
| 4 | 23.7 ± 5.4 | 20.0 ± 6.8 |
| 5 | 27.5 ± 5.9 | 23.3 ± 7.9 |
| 6 | 30.0 ± 6.2 | 26.0 ± 8.3 |
| 7 | 31.7 ± 6.3 | 27.4 ± 8.5 |
| 8 | 32.7 ± 6.6 | 28.8 ± 8.8 |
| 9 | 34.5 ± 7.0 | 30.3 ± 9.1 |
| 10 | 34.4 ± 7.4 | 29.8 ± 9.4 |

* media ± D.S.

Incremento de crecimiento, en gramos, del Primer Experimento: Grupo 1, Dieta litogénica (DL); Grupo 2, DL + 300 mg de BHT.

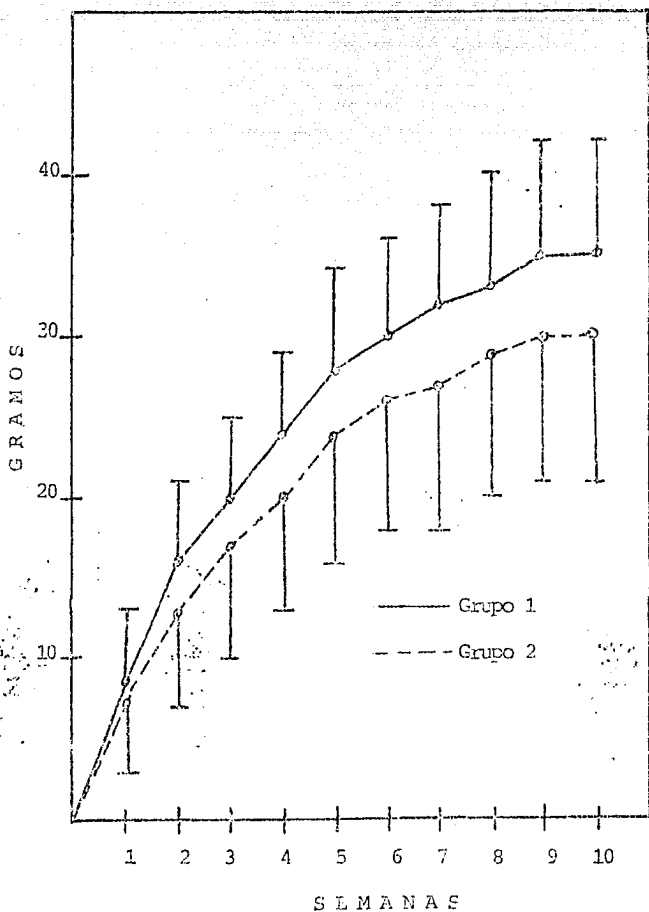


Fig 3. Curvas de incremento de crecimiento de los grupos del Primer Experimento: Grupo 1, Dieta litogénica (DL); Grup. 2, DL + 300 mg⁸ de BHT.

TABLA 4

FRECUENCIA DE CALCULOS BILIAPES EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO.

| GRUPOS Y DIETAS | No TOTAL ANIMALES | No ANIMALES CON CALCULOS | % ANIMALES CON CALCULOS | PESO PROMEDIO DE CALCULOS |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| A DIETA LITOGENICA (DL) | 21 | 11 | 52.4 | 0.534 |
| B DL + 500 mg% DE BHT | 21 | 0 | 0 | --- |

TABLA 5

PESO DEL HIGADO Y VITAMINA A HEPATICA EN EL SEGUNDO
EXPERIMENTO *.

| GRUPOS Y DIETAS | PESO DEL HIGADO (g) | PESO % DEL HIGADO | VITAMINA A HEPATICA (µg/g HIGADO) | VITAMINA A TOTAL (g/HIGADO) |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|---|-----------------------------------|
| A DIETA LITOGENICA (DL) | 3.70 ± 0.39 (n=12) | 3.55 ± 0.25 (n=12) | 2516 ± 257.7 (n=12) | 9277.4 ± 1150 (n=12) |
| B DL + 500 mg% DE BHT | 3.97 ± 0.36 (n=12) | 4.2 ± 0.29 (n=12) | 3127 ± 126.9 (n=10) | 8430.3 ± 676.7 (n=10) |

* media ± D.S.

En relación a las reservas de vitamina A en el hígado, los resultados se presentan en la Tabla 5, la cual muestra que la concentración de vitamina A hepática del grupo con BHT (2127 +/- 126.3) fue menor a la del grupo litogénico (2515 +/- 257.7), siendo esta diferencia significativa (P<0.001); asimismo, el contenido total de vitamina A en el hígado de los animales del grupo con BHT (8430 +/- 576.7) fue ligeramente menor con respecto al del grupo litogénico (9277.4 +/- 1150), siendo la diferencia significativa (P<0.05).

Respecto al peso del hígado, la Tabla 5 muestra que el peso absoluto del hígado fue muy similar en ambos grupos; sin embargo, el peso porcentual fue significativamente mayor (P<0.001) en el grupo que recibió BHT respecto al del grupo litogénico, lo cual indica que el nivel de 500 mg% de BHT produce hepatomegalia.

En este experimento se determinaron las actividades de 2 transaminasas en suero para evaluar función hepática. Los valores tanto para la transaminasa glutámica oxalacética (GOT) así como para la transaminasa glutámica pirúvica (GPT), que se presentan en la Tabla 6, fueron muy similares en ambos grupos (A y B).

De las muestras analizadas de los animales del Grupo A (control litogénico) 4 fueron de animales con cálculos y 3 de juveniles sin cálculos; al igual que en el Primer Experimento, no hubo diferencias en ninguno de los parámetros determinados entre animales con y sin cálculos, e incluyendo la dieta litogénica (Grupo B).

En cuanto al crecimiento, los resultados se presentan en la Tabla 7, Fig. 4; en los cuales se observa que el grupo con BHT (Grupo B) exhibió un menor crecimiento desde el comienzo del experimento,

TABLA 6

VALORES DE TRANSAMINASAS EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO *.

| GRUPOS Y DIETAS | GOT mU/ml | GPT mU/ml |
|---|---------------------------|---------------------------|
| A DIETA LITOGENICA (DL) | 18.9 ± 6.27 (n=12) | 14.6 ± 3.01 (n=12) |
| B DL + 500 mg ³ DE BHT | 19.0 ± 6.31 (n=11) | 12.7 ± 3.56 (n=12) |

* media ± D.S.

mostrando al término del ensayo una diferencia promedio de 9 grados, con respecto al grupo control (Grupo B), siendo esta diferencia significativa (P<0,001).

A la necropsia de los animales que recibieron 500 mg% de BHT (Grupo B) se observaron lesiones renales consistentes en puntos blancos bien definidos sobre la superficie del riñón.

II. Discusión

En los 2 experimentos realizados hay algunas diferencias metodológicas que merecen ser discutidas. En el 1er. experimento se emplearon animales de 70 días de edad, mientras que en el 2o. la edad promedio de los animales al inicio del experimento fue de 38 días. Anteriormente se hizo reportado que la frecuencia de coelicitias pigmentaria producido por la martaquilla es similar cuando se emplean animales de 33 y 110 días de edad (35) en la coelicitias producida por la vitamina A tóxica. Lo cual de los animales entre 33 y 100 días de edad parece afectar la frecuencia de coelicitias (observaciones no publicadas).

Otras diferencias entre los 2 experimentos son la dieta básica empleada y el periodo experimental. La dieta básica afecta la frecuencia de coelicitias (35,46), por lo que esta es un factor importante. En los presentes experimentos se cambió la dieta básica en el 2o experimento debido a disponibilidad de esta en el mercado; debido a este cambio de dieta, el periodo experimental se extendió a 37 días para obtener a los animales 70 días de experimentación empleando la misma dieta básica.

A pesar de estas diferencias, la frecuencia de coelicitias fue similar en ambos experimentos. Al extender el tiempo de vida de

TABLA 7

| SEMANAS | GRUPOS | |
|---------|------------|------------|
| | A | B |
| 1 | 10.3 ± 2.2 | 9.5 ± 2.4 |
| 2 | 20.2 ± 3.4 | 18.0 ± 4.8 |
| 3 | 27.2 ± 4.1 | 24.0 ± 6.2 |
| 4 | 31.7 ± 4.5 | 27.5 ± 6.5 |
| 5 | 36.4 ± 4.8 | 29.5 ± 7.2 |
| 6 | 39.5 ± 6.2 | 32.8 ± 7.6 |
| 7 | 41.7 ± 6.6 | 34.1 ± 7.5 |
| 8 | 45.0 ± 6.3 | 37.4 ± 7.9 |
| 9 | 47.7 ± 6.5 | 39.4 ± 7.7 |
| 10 | 48.2 ± 6.7 | 38.8 ± 7.8 |
| 11 | 50.3 ± 6.5 | 41.0 ± 7.7 |
| 12 | 51.1 ± 6.4 | 42.0 ± 8.0 |
| 13 | 51.6 ± 6.8 | 41.3 ± 7.7 |
| 14 | 51.2 ± 7.0 | 42.1 ± 8.4 |

* media ± D.S.

Incremento de crecimiento, en gramos, de los grupos del Segundo Experimento: Grupo A, Dieta litogénica (DL); Grupo B, DL + 500mg% de BHT.

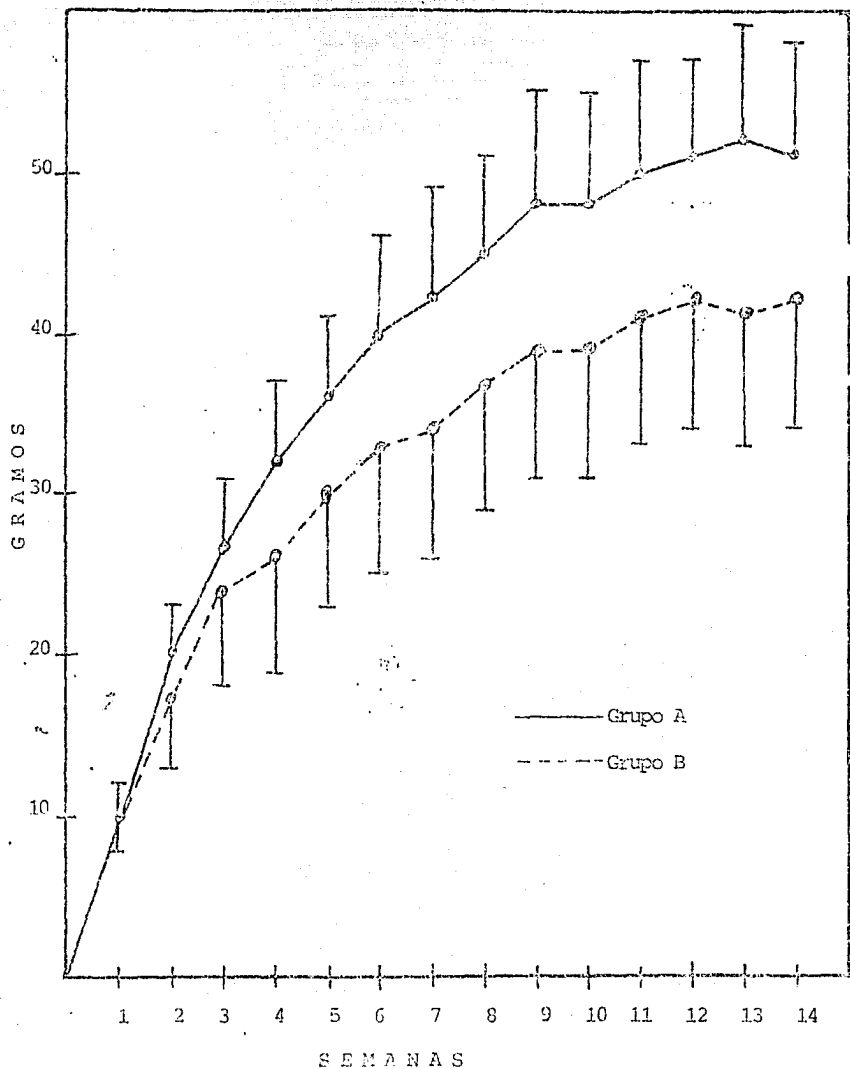


Fig. 4. Curvas de incremento de crecimiento de los grupos del Segundo Experimento: Grupo A, Dieta litogénica (DL); Grupo B, DL + 500 mg de BHT.

vitamina A fue mayor en el 2o. experimento, cuyos animales recibieron dietas con 25 200 UIA de vitamina A por 27 días más.

En el desarrollo de las investigaciones durante los últimos 3 años el efecto de la dieta básica sobre la litogenicidad de la vitamina A ha sido variable: en algunos experimentos la frecuencia de coleditiasis producida por la vitamina A se ha reducido casi a 0, y la máxima frecuencia para vez excede de 60%. Anteriormente, empleando la Purina elaborada en Estados Unidos (Purina Laboratory Chow 5001, for Rats, Mice and Hamsters) la frecuencia de coleditiasis alcanzaba a menudo el 100%, y para vez descendía de 60%. Estas diferencias probablemente sean debidas a la composición y calidad de la dieta básica, la cual en México se elabora según la disponibilidad de materias primas, por lo que cambia ligera, pero tal vez significativamente, no sólo de un fabricante a otro, sino de un lote de producción a otro.

Por lo tanto, se hace muy necesario emplear una dieta básica cuyos componentes de elaboración sean constantes de lote a lote y de una misma calidad. Asimismo, es necesario investigar el efecto de diferentes fuentes de los componentes (proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales) de la dieta básica sobre la litogenicidad de la vitamina A.

No obstante las diferencias entre los experimentos, en el presente estudio se ha demostrado que el entoxidante fenólico sintético hidrocortisono utilizado previene la coleditiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el pester torado. De los niveles estudiados el más bajo (200 UIA) tuvo una acción preventiva

casi total, mientras que con el nivel más elevado (500 mg) la solubilización se previene completamente.

El mecanismo de acción por el cual el BHT previene esta solubilización no ha sido establecido, sólo se pueden hacer algunas especulaciones al respecto. Esta prevención puede ser debida directamente al efecto antioxidante del BHT en la bilis, al impedir el entrecruzamiento por peroxidación entre proteínas y lípidos biliares y/ entre lípidos biliares (e.g. matriz proteica y polímeros de bilirrubina en el cálculo). Procesos de peroxidación han sido sugeridos en la formación de cálculos pigmentarios en el hombre (64). Para demostrar este efecto sería necesario determinar el efecto antioxidante de la bilis de animales tratados con BHT, y específicamente evitar la formación de polímeros de bilirrubina *in vitro*.

Por otra parte, la acción preventiva del BHT pudiera ser debida a su acción sobre el metabolismo de la vitamina A. El BHT incrementa la expresión de la vitamina A por aumentar las enzimas metabolizadoras de drogas (20). Este efecto podría estar relacionado con la producción de cálculos; sin embargo, la aumentada expresión de vitamina A no parece ser la causa de la prevención, pues el ácido retinoico, el cual se acumula en el hígado y es rápidamente excretado, es similarmente litogénico al acetato de retinol; de igual manera, la disminución en las reservas hepáticas de vitamina A por el BHT tampoco parece ser la causa de la prevención, puesto que el ácido retinoico tiene un efecto mayor sobre los niveles hepáticos de vitamina A que el BHT.

vitamina B hepática no variaron significativamente por el suministro de 300 mg% de BHT, pero sí tuvo una acción preventiva significativa. Por todo lo anterior parece muy probable que la acción preventiva del BHT no tenga que ver con su efecto sobre el almacenamiento y expresión de la vitamina B.

Otro posible mecanismo por medio del cual el BHT podría prevenir la formación de cálculos es alterando el metabolismo del colesterol y de los lípidos hepáticos, ya que ha sido reportado que el BHT incrementa los niveles de colesterol hepático, en particular los ésteres de colesterol, así como los lípidos hepáticos totales, también tiende a elevar la proporción de ácidos grasos saturados (64,85). Alteraciones sobre el contenido de colesterol y fosfolípidos de las membranas del hepatocito pueden producir cambios en la secreción y/o composición de la bilis por un efecto general sobre la fluidez de las membranas, procesos de transporte (97), lo cual podría conducir a la prevención de los cálculos. La relación al efecto del BHT directamente sobre el hígado se ha mencionado que este produce hiperplasia de los ductos biliares, lo cual podría estar asociado con una mayor coleseresis, la cual podría ser la causa de la acción preventiva de la coledolitiasis por el BHT.

Esas futuras investigaciones podrán establecer el mecanismo por el cual el BHT previene la coledolitiasis pigmentaria del júnster producida por la vitamina B. Entre estas podríamos mencionar el análisis de lípidos tanto de bilis hepática como vesicular; además, es necesario un estudio histológico del hígado y determinar si existe a los niveles de vitamina B y BHT empleados y a los tiempos de

exposición, una hiperplasia de los ductos biliares y una colangiosis.

En relación al efecto del BHT sobre el metabolismo de la vitamina A en estos experimentos se encontró que sólo el nivel de 500 mg% tuvo un ligero efecto sobre las reservas hepáticas de la vitamina. En ratas con un suministro dietético normal de vitamina A el BHT, al nivel de 1400 mg por 100 ml de dieta durante un mes, reduce en aproximadamente un 50% los niveles hepáticos de vitamina A (76), el mismo efecto ha sido observado con dosis de 200 mg de BHT por 100 g de dieta en un periodo de 90 días (84), lo cual difiere de lo observado en el presente trabajo, y sugiere que el jāmston es menos susceptible que la rata al efecto del BHT sobre el metabolismo de la vitamina A; sin embargo, en otro estudio donde los niveles de vitamina A en la dieta fueron de aproximadamente 35 000 y 75 000 UI%, el BHT (250 y 500 mg%), suministrado a ratas durante 150 días, tuvo un efecto menor sobre las reservas hepáticas de vitamina A (79), por lo que es posible que en el jāmston el alto nivel de vitamina A suministrado 35 000 UI% y el corto período de tiempo (70 días) no hayan permitido una disminución mayor en las reservas hepáticas de la vitamina.

No obstante la deficiencia adición preventiva del BHT, este mostró claros signos de toxicidad con el nivel más elevado (500 mg%). En la rata ha sido demostrado que, suministrado durante 180 días, el BHT (500 mg%) potencializa la toxicidad de la vitamina A (75 000 UI%), provocando una marcada hepatomegalia, fibrosis hepática focal e hiperplasia biliar, asociados con un ligero incremento en GP; asimismo, el BHT por sí solo produce un incremento de 34 a 44% en el peso

del ratado con dosis de BHT de 250 y 500 mg% respectivamente suministrado durante 30 días (79). La comparación de estos resultados con los del presente estudio indican que el jánster es menos susceptible al efecto hepatotóxico del BHT, así como al de potencializador de la toxicidad de la vitamina A, puesto que en nuestro estudio el nivel de 300mg% durante 70 días no provocó hepatomegalia, y al nivel de 500 mg% solo se observó una ligera hepatomegalia y no hubo cambios significativos de las transaminasas. Asimismo, el BHT (500 mg%) produjo lesiones renales definidas tales como necrosis focales. Esta necrosis renal ha sido observada en ratas con 1% de BHT con lacto (88), por lo que respecto a la toxicidad renal del BHT esta es igual tanto en jánster y rata. El tercer signo de toxicidad observado en el jánster fué la reducción del crecimiento, el cual fue 9 y inferior al del grupo control litogénico. Este ligero efecto reductor del crecimiento también ha sido observado en ratas (85, 88, 89). Los definidos signos de toxicidad del BHT lo descartan como una posible droga para uso humano; sin embargo, pueda ayudar para tener una mejor comprensión de la patogénesis de la coleritis.

E) Conclusiones:

Las conclusiones de este estudio fueron las siguientes:

1) El Hidroxitolueno butilado al nivel de 300 mg% en la dieta previene casi totalmente la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jánster durante sin producir efectos tóxicos aparentes en los animales.

2) El BHT al nivel de 500 mg% en la dieta previene totalmente la colelitiasis; sin embargo, exhibe claros signos de toxicidad, tales como reducción del incremento de crecimiento, lesiones renales definidas y hepatomegalia sin elevación de las transaminasas.

3) La acción preventiva de la colelitiasis por el BHT no está relacionada con una reducción de las reservas hepáticas de vitamina A.

Cuarta Parte

Resumen y Bibliografía

1. Resumen:

El presente estudio reporta dos experimentos realizados con el objeto de poner a prueba la posible prevención por el hidroxitoluano butilado de la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster dorado, ya que ha sido reportado que este antioxidante fenólico sintético reduce las reservas hepáticas de vitamina A por aumentar su excreción, además, de otras interacciones con la vitamina. Este estudio consta de las siguientes partes:

Primera Parte: se divide en dos secciones, la primera contiene una revisión sobre la colelitiasis en general, la cual incluye la descripción de los principales tipos de cálculos biliares, y los conocimientos actualizados acerca de la epidemiología, patogénesis y tratamiento de esta enfermedad. La segunda sección es una revisión sobre la colelitiasis pigmentaria del jámster dorado producida con dietas purificadas y no purificadas, que incluye la influencia de los componentes dietéticos y sustancias potencializadoras y preventivas de esta colelitiasis.

Segunda Parte: comprende la revisión del proceso de oxidación y el mecanismo de acción de los antioxidantes en general así como una revisión actualizada sobre la química, metabolismo y usos del hidroxitoluano butilado (BHT), y de la interacción de éste con la vitamina A en el organismo.

Tercera Parte: corresponde a la sección experimental, la cual comprende el objetivo, material, métodos, resultados, discusión y

Conclusiones de los dos experimentos realizados en este estudio, en los cuales se puso a prueba la posible acción preventiva de 2 niveles dietéticos de BHT. En ambos experimentos se utilizaron jámsteres donados machos de la cepa C57BL. Los animales fueron alimentados con las diferentes dietas y agua corriente ad libitum y pesados semanalmente para determinar sus curvas de crecimiento; al final del período experimental fueron sacrificados por fractura de la nuca, y las necropsias se realizaron inmediatamente después. En ambos experimentos se determinó Vitamina A hepática; además, en el segundo experimento se determinaron las actividades de las transaminasas GPT y GUT en suero.

Primer experimento: 50 jámsteres de 70 días de edad promedio se dividieron en 2 grupos iguales, y se alimentaron con las siguientes dietas durante 70 días: Grupo 1, Nutricubos Purina para Roedores Pequeños pulverizados + 25 000 UI% de acetato de retinol (dieta litogénica: DL); Grupo 2, DL + 300 mg% de Hidroxitolueno butilado.

Segundo experimento: se formaron 2 grupos de 21 jámsteres cada uno, de 56 días de edad promedio, los cuales fueron alimentados durante 97 días con las siguientes dietas: Grupo A, Alimento para Ratonés de Laboratorio (Fac. Med. Vet. Zoot., UNAM) pulverizado + 25 000 UI% de acetato de retinol (DL); Grupo B, DL + 300 mg% de Hidroxitolueno butilado. El análisis estadístico de los resultados se hizo por pruebas de χ^2 cuadrado y t de Student.

Los resultados del primer experimento mostraron que el BHT al nivel de 300 mg% ejerció una acción preventiva casi total de la colestibiosis (98%). El contenido hepático de vitamina A no creció

diferencias significativas en los dos grupos, lo cual indica que el BHT a este nivel no afecta las reservas hepáticas de vitamina A de jumentos alimentados con una dieta adicionada de 25000 UI% de acetato de retinol. Este nivel de BHT no afectó significativamente el crecimiento de los animales; a la necropsia no se observaron signos macroscópicos de toxicidad, y el peso porcentual del hígado no fue estadísticamente diferente entre los dos grupos.

En el segundo experimento se estudió el efecto de un nivel más elevado de BHT buscando una prevención total de la colelitiasis y un efecto sobre el status de vitamina A de los animales. Los resultados de este experimento mostraron que con el nivel dietético de 500 mg% de BHT se previene totalmente la colelitiasis, la cual se asocia sólo con una pequeña disminución de las reservas hepáticas de vitamina A, aunque estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Este nivel de BHT produjo signos de toxicidad en los animales como una reducción significativa del incremento del crecimiento ($P < 0.001$), y a la necropsia necrosis focales renales así como un ligero incremento en el peso porcentual del hígado ($P < 0.001$); sin embargo, esta ligera hepatomegalia no se acompañó de una elevación de las transaminasas.

Las conclusiones de este estudio fueron las siguientes: 1) El Hidroxitolueno butilado al nivel de 300 mg% en la dieta previene casi totalmente la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A en el jumento corado sin producir efectos tóxicos aparentes en los animales; 2) El BHT al nivel de 500 mg% en la dieta previene totalmente la colelitiasis, sin embargo, exhibe claros signos de

toxicidad, tales como reducción del incremento de crecimiento, lesiones renales definidas y hepatomegalia sin elevación de las transaminasas; 3) La acción preventiva de la colicistitis por el BHT no esta relacionada con una reducción de las reservas hepaticas de vitamina A.

2. Bibliografía:

1. - Méndez, M., Uribe, M., Jassurán, J., Cervera, E. y Bosques, F.: Características de la litiasis biliar en México. *La Rev. Invest. Clin. (Méx.) (supl.)* 42: 43-52, 1990
2. - Trotman, R.W. y Saloway, R.D.: Pigment gallstone disease. summary of the National Institutes of Health - International Workshop. *Hepatology*, 2 (6): 879-884, 1982.
3. - Cadenas, H.: Estudio sobre las posibles alteraciones producidas por la vitamina A que inducen colestasiática pigmentaria del hígado donado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1989.
4. - Thornton, J.G., Bawaze, H.M. y Hinton, R.W.: Diet and gallstones. *Gut*, 24: 2, 1983.
5. - Heaton, K.H.: Epidemiology of gallstones and suggested etiology. *Clin. Gastroenterol.*, 3: 67-83, 1973.
6. - Llagarriaga, J.: Los cálculos humanos. *Neurología, México* 4: 19-21, 1973.
7. - Gilat, T., Feldman, C., y Halpern, Z. et al.: An increased familial frequency of gallstones. *Gastroenterol.*, 84: 242-246, 1983.
8. - Baconnier, L.A.B.: Debts and credits: a current account of cholesterol gallstones disease. *Gut*, 25: 1021-1026, 1984.
9. - Burnstein, J.M., Ilse, G., Petrova, M.C., Taylor, R.D., y Strasberg, S.M.: Evidence for a potent nucleating factor in the gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterol.*, 85: 801-807, 1983.
10. - Sallagan, B., Harvey, R.C., Strassman, A.S.: Chelation of calcium does not affect cholesterol nucleation time in human

Gallbladder bile. Hepatology, 5: 969, 1985.

11. - Mahi, T.: Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstones: role of E. coli glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. Ann. Surg., 164: 90-100, 1966.

12. - Villalobos, P. J.: Gastroenterologia. Vol. II. 2a. e. Ed. Rio. Mérida, Mexico, 1985.

13. - Berman, M.D.: Influence of pH on the solubility of unconjugated bilirubin. Gastroenterol., 70: 1141, 1976.

14. - Conde, E.L., Setoguchi, T., Moshach, E.H., Mc Sherry, E.M., Steger, R.J., Kuroki, S., y Soloway, R.D.: An animal model of pigment urolithiasis. Amer. J. Sur., 153: 153-158, 1977.

15. - Regg, G.V., y Nunnald, E.L.: Animals models of pigment gallstone disease. J. Surg. Res., 43: 196-203, 1977.

16. - ^{Essaoui, O., Baumgartel H., Goss, J.} Investigation of calcium binding capacity and solubility of gallstone dissolution. ⁱⁿ Role acid and cholesterol in health and disease - Ed. Baumgartel, G., Stehl, P., Gock, W. Balk Symposium 33. ITP Res. Int. pp. 302-311, 1980.

17. - Dam, H.: Nutritional aspects of gallstones formation with particular reference to alimentary production of gallstones in laboratory animals. World Review of Nutrition and Dietetics, 11: 199-239 Karger, 1963.

18. - Dam, H. y Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 10. The effect of orally ingested bile acids on development of cholesterol gallstones in hamsters fed a fat-free diet with glucose as carbohydrate component. Z. Ernahrungswiss., 21: 154-159, 1982.

19. - Dam, H. y Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 6. Influence of dietary fat. Z. Ernahrungswiss., 21: 36-41, 1981.

- 20.- Christensen, F., Prange, I. y Dam, H.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 13. Influence of highly unsaturated fats and certain minerals on gallstone production. *Z. Ernahrungswiss.*, 4: 156-192, 1964.
- 21.- Dam, H., Prange, I. y Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 17. Influence of butter fat and the fat of a dietetic margarine rich in linoleic acid on gallstone formation and composition of the gallbladder bile. *Z. Ernahrungswiss.*, 6: 97-106, 1965.
- 22.- Dam, H., Prange, I. y Sondergaard, E.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 26. Influence of dietary cholesterol on gallstones formation. *Z. Ernahrungswiss.*, 9: 43-48, 1968.
- 23.- Dam, H. y Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 9. Influence of different carbohydrate sources on gallstone formation, diarrhea and growth. *Z. Ernahrungswiss.*, 2: 91-102, 1961.
- 24.- Sondergaard, E., Prange, I. y Dam, H.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 22. The influence of a non absorbable bile acids binding resin, cholestyramine on formation of gallstones in hamsters. *Z. Ernahrungswiss.*, 9: 174-179, 1969.
- 25.- Kritchevsky, D. y Klarfeld, D.M.: Gallstones formation in hamster: effect of varying and vegetable protein levels. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27: 802-804, 1963.
- 26.- Dam, H. y Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamster. 15. Production of gallstones under varied hormonal condition. *Z. Ernahrungswiss.*, 5: 149-153, 1963.

- 27.- Malsbarn, T.R.: Animal models of cholesterol gallstone disease. *Hepatology*, 4(5): 191-196, 1965.
- 28.- Bergman, F. y Van der Linden, W.: Influence of D-Thyroxine on gallstone formation in hamsters. *Acta Chir. Scand.* 129: 547-552, 1964.
- 29.- Bergman, F. y Van der Linden, W.: Further studies on the influence of thyroxin on gallstone formation in hamsters. *Acta. Chir. Scand.* 131: 319-320, 1966.
- 30.- Malet, P.F., Dang, S.G. y Spoway, S.D.: Gallbladder mucin and cholesterol and gallstone formation in hamsters. *Scand. J. Gastroenterol.*, 24: 1855-1860, 1983.
- 31.- Pearman, B.J., Honorris, G.G., Phillips, M.J., Chan, A., Vinadela, S., Marks, J.W., y Schoenfield, L.J.: Cholesterol gallstones formation and prevention by chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. *Gastroenterol.*, 77: 634-641, 1979.
- 32.- Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado (*Mesocricetus auratus*) alimentados con una dieta de mantenimiento. *Poeyana (La Habana)* No. 93, p.19., 1971.
- 33.- Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. III. Efecto del azúcar de caña en reemplazo de la miel final. III Cong. Soc. Latinoam. Nutr. Resúmenes, p.23, Guatemala, 1970.
- 34.- Granados, H.: Gallstones in the golden hamster. IV. The effect of supplementing a stock commercial ration with milk and carrots. XXVth. Internat. Congr. Physiol. Sci. New Delhi. Abstracts of Volunteer Papers (Vol. XI), abstracts 235 p.35. New Delhi, 1974.
- 35.- Granados, H.: Gallstone in the golden hamster. V. The lithogenic

effect of cow's milk. Xth Internat. Cong. Nutr., Kyoto, Abstracts, p.123, Abst. 4247, 1975.

36.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XX. Influencia de la edad en la frecuencia de coledolitias pigmentaria. VII Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol., Mex., 43: 326, 1976.

37.- Escada, L., Soriano, M., Cárdenas, R., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XII. Comparación de la acción litogénica de la mantequilla de leche de vaca con la de 6 aceites vegetales. X. Congr. Nal. Gastroenterol. México D.F., Resúmenes. T-2, 1976.

38.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Gallstones in the golden hamster. XIV. Lithogenic action of lard. XXVII Congr. Internat. Scia. Physiol., Paris, Res. des Commun., Vol. XIII, p. 379. Resúmen 816, 1977.

39.- Granados, H., Cárdenas, R., Castillo, G.R. y Soriano M.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXIII. Colelitiasis pigmentaria producida por una dieta no purificada alta en sacarosa. XIII Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Mex., 44: 353, 1979.

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

41.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XV. Acción litogénica de la vitamina A. XIII

Congr. Latinoamer. Cien. Fisiol. y XX Congr. Nal. Cien. Fisiol. Mexico, D.F., Resúmenes de comunicaciones, p.172, 1977.

42.- Cárdenas, R., Jaime, M.E., Guzmán, L., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXVI. Acción litogénica del ácido retinico. XXIII Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F. Rev. Gastroenterol. Mex., 54 (4): 322 (resumen), 1969.

43.- Cárdenas, R., Zaccara, F., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXIX. Valores nematológicos en animales con cálculos pigmentarios producidos por la vitamina A. XVIII Congr. Nal. Gastroenterol., Guadalajara, Jal., Rev. Gastroenterol. Méx., 45(4): 319 (resumen), 1964.

44.- Cárdenas, R., Berdez, N., Cadena, A. Ma., y Granados, H.: Bilirrubina calico y pH biliares en jámsteres con colelitiasis pigmentaria. XX Congr. Nal. Gastroenterol., Morelia, Mich., Rev. Gastroenterol., Méx., 51: 299 (resumen), 1966.

45.- Granados, H., Cárdenas, R., Soriano, M., y Estrada, E.: Cálculos biliares en el jámster dorado. X. Comparación de la acción litogénica de la mantequilla mezclada con 4 dietas diferentes. VI Congr. Latinoamer. Nutr., Caracas, Resúmenes de trabajos, 1976.

46.- Granados, H., Cárdenas, R., y Soriano, M.: Gallstones in the golden hamster. XIX. Comparison of the lithogenic action of butter mixed with 3 different diets. XI Internat. Congr. Nutr., Rio de Janeiro, Resúmenes temas libres, p. 255, abstract 390, 1978.

47.- Granados, H., Soriano, M., y Zaccara, F.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXVII. Susceptibilidad de las hembras a la colelitiasis pigmentaria producida con la vitamina A. XVI Congr. Nal.

Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 43: 226, 1978.

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

49.- Granados, H., Cárdenas, R., Lavrada, E. y Soriano, M.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XI. Acción sinérgica de la testosterona en la coleditiásis producida por la mantequilla de leche de vaca. V Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Resumen, I-1, 1976.

50.- Granados, H., Zamora, F., y Soriano, M.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XVIII. Efecto de la ovariectomía en la coleditiásis producida por glucosa y visamina A. XVII. Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 45: 257 (resumen), 1983.

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

52.- Cárdenas, R., Castillo, A.R., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXII. Acción potencializadora de la zanahoria en la coleditiásis pigmentaria producida por la vitamina A. XII Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 44: 255, 1979.

53.- Granados, H., y Soriano, M.: Potencialización por algunos aceites vegetales de la coleditiásis pigmentaria producida por la vitamina A en el jámster dorado. XV Congr. Nal. Gastroenterol.,

- Mexico, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 46: 275 (resumen), 1981.
- 54.- Granados, H.: Gallstones in the golden hamster. XVI. Prevention of pigment cholelithiasis by drenchepar. VI World Congress of Gastroenterol, Madrid, Abstracts, p. 155, 1978.
- 55.- Granados, H., y Cárdenas, R.: Gallstones in the golden hamster. XVII. Prevention of pigment cholelithiasis by certain components of drenchepar. VI World Congr. Gastroenterol., Madrid, abstract, p.155, 1978.
- 56.- Granados, H., y Cárdenas, R.: Prevention by dehydrocholic acid of pigment gallstones in the golden hamster. Internat. Assoc. Study Liver Meeting, Fuengirola, Malaga, abstracts, p.47, 1979.
- 57.- Granados, H., y Cárdenas, R.: Gallstones in the golden hamster. XXIV. Prevention by means of dehydrocholic acid of pigment cholelithiasis produced by butter and vitamin A. Grm. Invest. Med. (Méx.), 21-23, 1983.
- 58.- Granados, H., y Soriano, M.: Prevención de la coledolitiasis pigmentaria por el "Polifat KA-02" en el jánster dorado. XIV Congr. Nal. Gastroenterol. Mexico, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 43: 327 (resumen), 1980.
- 59.- Granados, H., y Soriano, M.: Gallstones in the golden hamster. XXVI. Prevention of pigment cholelithiasis by "Polifat KA-02". XI Trienn. World Congr. Pathol., Jerusalem, abstracts, p. 108, 108.
- 60.- Cárdenas, R., Cadena, R.M., Soriano, M., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jánster dorado. XXXI. Relación entre la prevención de la coledolitiasis pigmentaria por el polifat KA-02 y los niveles hepáticos y plasmático de vitamina A. XII Congr. Nal.

- Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 50 (4): 362 (resumen), 1982.
- 61.- Jaime, M.E., Cárdenas, R., y Granados, H.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXVIII. Comparación de la acción preventiva del polifat KA-22 con la de otros derivados de aceites vegetales. XXIII Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Méx., 54(4): 321 (resumen), 1989.
- 62.- Granados, H., Cárdenas, R., y Rodríguez, R.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXII. Acción preventiva de gobernadora (Gallina tridentata) en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. Reun. Internac. Conmemor. 45 Aniv. Hosp. Cent. Milit., México, D.F., Rev. Sanid. Milit. (México), 11: 264 (resumen), 1987.
- 63.- Granados, H., Cárdenas, R., Soriano, M., y Villa, J.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXIV. Acción preventiva del ajo (Allium sativum) en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XXII Congr. Nal. Gastroenterol., Puebla, Pue., Rev. Gastroenterol. Méx., 53 (4): 370 (resumen), 1988.
- 64.- Ostrow, D.J.: The etiology of pigment gallstones. Hepatology, 4(5): 215S-223S, 1984.
- 65.- Granados, H., y Cardenas, R.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXXIII. Acción preventiva del azul de metileno en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XXI Congr. Nal. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Mex., 52 (4): 304 (resumen), 1987.
- 66.- Granados, H., y Cardenas, R.: Cálculos biliares en el jámster dorado. XXVII. Acción de acción preventiva de 8 antioxidantes

- artificiales. (XIII Congr. Nat. Gastroenterol., México, D.F., Rev. Gastroenterol. Mex., 54(4): 322 (resumen), 1989.
67. - Berk, Z.: Introducción a la Bioquímica de los alimentos. Cap. 15. Oxidación de lípidos. Ed. El manual moderno, México, D.F., 1980.
68. - Sevanian, A. y Hochstein, P.: Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. Ann. Rev. Nutr. 5: 365-70, 1985.
69. - Inaj, K., Kobuke, I., Nambu, S., Takemoto, T., Kou, E., Nishina, H., Fujihara, M., Yoshizawa, S., Suehiro, S., Tsuya, T., Horikuchi, K., y Tokooka, S.: Hepatocellular tumorigenicity of butylated hydroxytoluene administered orally to B6C3F1 mice. Jpn. J. Cancer Res. (Oncol), 79: 46-58, 1988.
70. - Martindale. The extra pharmacopoeia, twenty-seven edition. The pharmaceutical press, London, 1977, p.1277.
71. - The Merck Index. An encyclopedia of chemical and drugs, ninth edition, Merck & Co., Inc. 1978, p.128.
72. - Potter, M.M.: La ciencia de los alimentos. Edutex, S.A. Mexico, D.F., 1975, p.606.
73. - Thompson, D.C., Cha, Y.N., y Tush, M.A.: The peroxidase-dependent activation of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene (BHT) to reactive intermediates. J. Biol. Chem., 264 (7): 3957-3966, 1989.
74. - Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, quinta edición, Mexico, 1968, p.586-587.
75. - Taffe, E.S., y Kensler, T.W.: Tumor promotion by a hydroperoxide metabolite of butylated hydroxytoluene, 2,5-di-tert-butyl-4-hydroperoxy-1-methyl-2,5-cyclohexadienone, in mouse skin. Fed. Comp. Chem. Pathol. Pharmacol., 61 (3): 291-293, 1988.

76. - Kozumbo, W.J., Seed, J.L., y Kensler, T.M.: Inhibition by 2 (3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole and other antioxidants of aspicermal ornithine decarboxylase activity induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, 43: 2553-2559, 1983.

77. - Ito, H., y Hirose, M.: The role of antioxidants in chemical carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78: 1011-1026, 1987.

78. - Mc Cormick, D.L., May, C.M., Thomas, C.F., y Detrisac, C.J.: Anticarcinogenic and hepatotoxic interactions between retinyl acetate and butylated hydroxytoluene in rats. *Cancer Res.*, 46: 5264-5269, 1986.

79. - Mc Cormick, D.L., Hultin, T.A., y Detrisac, C.J.: Potentiation of vitamin A hepatotoxicity by butylated hydroxytoluene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 90: 1-5, 1987.

80. - Chipman, J.K., y Davies, J.E.: Reduction of 2-(4-acetylamino)fluorene-induced unscheduled DNA synthesis in human and rat hepatocytes by butylated hydroxytoluene. *Mutation Res.*, 227: 193-199, 1988.

81. - Lindenschmidt, R.C., Tryka, A.F., Goss, M.E., y Witschi, H.F.: The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicol.*, 38: 151-160, 1986.

82. - Mizutani, T., Yamamoto, K., y Tajima, K.: Isotope effects on the metabolism and pulmonary toxicity of butylated hydroxytoluene in mice by deuteration of the 4-methyl group. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 69: 263-270, 1983.

83. - Mizutani, T., Nomura, H., Nakanishi, K., y Fujita, S.: Hepatotoxicity of butylated hydroxytoluene and its analogs in mice

- deplet of hepatic glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 97: 156-175, 1987.
- 84.- Kato, N., Katom., Kimura, T., y Yoshida, A.: Effect of dietary addition of PCB, DDT or BHT and dietary protein on vitamin A and cholesterol metabolism. *Nutr. Rep. Int.*, 12: 437-445, 1976.
- 85.- Takahashi, O., y Hiraga, K.: Effect of butylated hydroxytoluene on the lipid composition of rat liver. *Toxicol.*, 22: 161-170, 1981.
- 86.- Thompson, G., y Mulcahy, P.: Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 37(11): 2201-2207, 1986.
- 87.- Sokolove, P.M., Albuquerque, E.X., Kaufman, F.C., Spence, T.F., y Daly, J.W.: Phenolic antioxidants potent inhibitors of the (Ca²⁺ Mg)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Letters.*, 200(2): 121-126, 1986.
- 88.- Meyer, G.A., Kristiansen, E., y Murtzen, G.: Effects of dietary protein and butylated hydroxytoluene on the kidneys of rats. *Laboratory Animals*, 23: 175-179, 1989.
- 89.- Takahashi, O., y Hiraga, K.: Dose-response study of hemorrhagic death by dietary butylated hydroxytoluene (BHT) in male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43: 399-406, 1978.
- 90.- Lee, K.A., Lowe, N., y Lieber, C.S.: Potentiation of ethanol-induced hepatic vitamin A depletion by phenobarbital and butylated hydroxytoluene. *J. Nutr.*, 117: 70-75, 1987.
- 91.- Effect of xenobiotics on hepatic vitamin A storage. *Nutr. Rev.*, 45(9): 274-275, 1987.
- 92.- Valotti, M., Sips, H.J., Scargill, G., y Mason, R.D.: Free

- radical intermediates during peroxidase oxidation of 2-(4-butyl-4-methoxyphenyl), 2,6-Dimethyl-4-butyl-4-methoxyphenol and related phenol compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 169(2): 423-432, 1969.
93. - Bush, M.E. y Darms, D.R.: Fatal hypervitaminosis A in a neonate. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108: 633-642, 1984.
94. - Olson, J.A.: A simple dual assay for vitamins A and carotenoids in human liver. *Nutr. Rep. Internat.*, 19: 807-813, 1979.
95. - Reitman, S., y Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamate oxalacetate and glutamate pyruvate transaminases. *Amer. J. Clin. Path.*, 28: 56-63, 1957.
96. - Cardenas, R., Galicia M.A., Jaime, M.E., y Granados, H.: Calculos biliares en el jamster domado. XXXIX. Prevencion por el Hidroxicolimeno oxidado de la coledolitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. XXIV Cong. Nal. Gastroenterol., Acapulco, Gro., Rev. Gastroenterol. Mex, 55: 341 (Resumen), 1990.
97. - Arias, I.M., Popper, H., Schachter, D. y Shafritz, D.A. (Editores): *The Liver: Siology and Pathobiology*. New York, Raven Press, pp.726, 735, 1982.
98. - Trotman, W.B. y Soloway, D.R.: Pigment vs. Cholesterol cholelithiasis: clinical and epidemiological aspects. *Am. J. Dig. Dis.* 20 (8): 735-740, 1975.