

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS

EFFECTO DE LA CARENCIA DE PROTEINAS EN LA DIETA SOBRE EL
TRANSPORTE HEPATICO DE ANIONES ORGANICOS

JOAQUIN VALENTIN RODRIGUEZ

Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica

Director: Prof. Dr. EMILIO ALBERTO RODRIGUEZ GARAY

INSTITUTO DE FISILOGIA EXPERIMENTAL
(IFISE)

año 1985

A Raquel y Jimena por haberme brindado tanto tiempo

a mis padres

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publi-
cados y/o presentados en reuniones científicas según se detalla
a continuación:

Publicados

Effect of dietary protein on hepatic handling of Sulfobromo-
phthalein.

Rodriguez J.V., Carrillo M. C., Morisoli L. S. y Rodriguez
Garay E. A.

Medicina (Buenos Aires) 41 : 446-452 (1981).

Influence of a protein-free diet on bile secretion in the rat.

Rodriguez J.V., Dubin M., Carrillo M.C., y Rodriguez Garay E.A.

Nutrition Reports International 26 : 147-155 (1982).

Effect of a protein-free diet on biliary lipids and protein
secretion in the rat.

Rodriguez J.V., Dubin M., Carrillo M.C., Monti J.A. and

Rodriguez Garay E.A.

Nutrition Reports International 27 : 1261-1267 (1983).

Reuniones Científicas

Efecto de la dieta aprroteica sobre la metabolización hepática
de Bromosulfoftaleína.

Rodriguez J.V., Carrillo M.C., Morisoli L.S. y Rodriguez Garay
E.A.

Presentado en XXV Reunión Anual de Investigación Clínica reali-
zada en Mendoza (Nov.1980).Publicado en Medicina 40:754 (1980)

Estudio de la secreción biliar de ratas alimentadas con dieta carente de proteínas.

Rodriguez J.V., Dubin M., Carrillo M.C. y Rodriguez Garay E.A.
Presentado en la XXVI Reunión Anual de Investigación Clínica realizada en Mar del Plata (Nov.1981). Publicado en Medicina 41 : 668 (1981).

Efecto de la carencia proteica en la dieta sobre la secreción biliar de lípidos y proteínas en la rata.

Rodriguez J.V., Carrillo M.C., Dubin M., Monti J.A. y Rodriguez Garay E.A.

Presentado en VI Congreso Latinoamericano de Nutrición realizado en Buenos Aires (Agosto 1982).

Efecto de la carencia proteica en la dieta sobre la captación hepática de Sulfobromoftaleína.

Rodriguez J.V., Carrillo M.C., Monti J.A. y Rodriguez Garay E.A.
Presentado en la XXVII Reunión Anual de Investigación Clínica realizada en Mar del Plata (Nov. 1982). Publicado en Medicina 42: 788 (1982).

Alteraciones hepáticas producidas por la administración en ratas de una dieta carente de proteínas.

Rodriguez J.V., Carrillo M.C., Hernandez H. y Rodriguez Garay E.A.

Presentado en la XXVIII Reunión Anual de Investigación Clínica realizada en Mar del Plata (Nov. 1983). Publicado en Medicina 43: 867 (1983).

Transporte hepático de Dibromosulfoftaleína en ratas alimentadas con dieta aproteica.

Rodriguez J.V., Carrillo M.C., Galeazzi S.A., Pellegrino J.M. y Rodriguez Garay E.A.

Presentado en la XXVIII Reunión Anual de Investigación Clínica realizada en Mar del Plata (Nov. 1983). Publicado en Medicina 43: 865 (1983).

Fijación de Bromosulfoftaleína a la fracción proteica "Y" hepática en ratas alimentadas con dieta carente de proteínas.

Pellegrino J.M., Rodriguez J.V. y Rodriguez Garay E.A.

Presentado en la XXVIII Reunión Anual de Investigación Clínica realizada en Mar del Plata (Nov. 1983). Publicado en Medicina 43: 866 (1983).

Kinetic analysis of organic aniones transport in rat liver.

Carrillo M.C., Rodriguez J.V., Monti J.A. y Rodriguez Garay E.A.
1st. International Symposium on Mathematical Modelling of Liver dye excretion.

Slovak Academy of Sciences, Comenius University, Slovak Technical UN.V., Bratislava, Czechoslovakia, 19-22/06/84.

Abreviaturas

ADN	=	ácido desóxirribonucleico
AP	=	albúmina plasmática
AB	=	ácidos biliares
ARN	=	ácido ribonucleico
BSF	=	bromosulfoftaleína
CDNB	=	1-Cloro-2,4-dinitrobenceno
Cis - BSF	=	conjugado cisteína - bromosulfoftaleína
CO	=	colesterol
DA	=	dieta aprotéica
DBSF	=	dibromosulfoftaleína
DN	=	dieta normal
% D	=	porcentaje de la dosis inyectada excretada al cabo de 60 minutos
DTNB	=	ácido 5-5' ditiobis nitrobenzoico
FB	=	flujo biliar
FIAB	=	flujo biliar independiente de ác. biliares
FL	=	fosfolípidos
Fu	=	fracción del colorante unido a proteínas plasmáticas
Glí - BSF	=	conjugado glicina - bromosulfoftaleína
GSH	=	glutathion reducido
GSH - BSF	=	conjugado glutathion - bromosulfoftaleína
GST	=	glutathion s-transferasa
PC	=	peso corporal
PH	=	peso de hígado
PTB	=	proteínas totales biliares
PTH	=	proteínas totales hepáticas
PTP	=	proteínas totales plasmáticas

OS = osmolaridad
S = capacidad relativa de almacenamiento hepático
TCA = ácido tricloroacético
Tm = transporte máximo
VEB = velocidad de excreción biliar
VIC = verde de indocianina
VP = volumen plasmático

INDICE GENERAL

<u>CAPITULO I</u>		<u>Pag</u>
	Introducción	
1	Modelos experimentales utilizados para el estudio de los efectos de la deficiencia proteica en la dieta	1 2
2	Alteraciones fisiológicas y bioquímicas producidas por la deficiencia proteica en la dieta	3
2.1	Crecimiento y desarrollo. Peso corporal. Distribución de líquidos corporales	3
2.2	Alteraciones histológicas hepáticas. Síntesis de proteínas hepáticas	3
2.3	Síntesis de proteínas plasmáticas	7
2.4	Enzimas metabolizadores de drogas	8
2.5	Farmacocinética de drogas	8
3	Fisiología de la secreción biliar	11
3.1	Introducción	11
3.2	Consideraciones anatómicas	11
3.3	Factores determinantes de la formación de la bilis	15
3.4	Transporte hepático de ácidos biliares	17
3.5	Flujo biliar dependiente de ácidos biliares	19
3.6	Flujo biliar independiente de ácidos biliares	21
3.7	Métodos de estudio de la secreción biliar	24
4	Fisiología del transporte hepático de aniones orgánicos	26

	<u>Pag</u>	
4.1	Aniones orgánicos	26
4.2	Captación hepática	28
4.3	Fijación a proteínas citosólicas hepáticas	30
4.4	Conjugación y Excreción biliar	33
	 <u>CAPITULO II</u>	 37
	Objetivos y plan de trabajo	37
	 <u>CAPITULO III</u>	 38
	Material y Métodos	38
1	Animales de experimentación y preparación de dietas	38
2	Desarrollo experimental	40
2.1	Análisis del efecto de la dieta aproteica (DA)	40
2.1.1	Estudio del consumo de dieta	40
2.1.2	Efecto de la DA sobre el peso corporal (PC), peso de hígado (PH), proteínas totales hepáticas (PTH), y glutatión hepático (GSH)	41
2.1.3	Efecto de la DA sobre las concentraciones plasmáticas de albúmina (AP), proteínas totales (PTP), y sobre el volumen plasmático (VP)	42 43
2.1.4	Efecto de la DA sobre la distribución de agua en hígado	43
2.1.5	Efecto de la DA sobre el número, tamaño, y contenido proteico de células hepáticas	44
2.2	Estudio de la secreción biliar	46

	<u>Pag</u>	
2.2.1	Determinación del flujo biliar (FB) basal	46
2.2.2	Análisis de la composición de la bilis	46
2.2.3	Estudio de la fracción del FB independiente de los ácidos biliares (FIAB)	47
2.2.4	Estimación del FB canalicular	48
2.2.5	Análisis farmacocinético de bromosulfoftaleína (BSF) y de dibromosulfoftaleína (DBSF)	49
2.3.1	Consideraciones teóricas	49
2.3.2	Parámetros farmacocinéticos	51
2.3.3	Técnica experimental	53
2.4	Análisis de la excreción biliar de BSF y DBSF	53
2.4.1	Velocidad de excreción biliar de BSF y DBSF	53
2.4.2	Análisis de los conjugados de BSF en bilis	54
2.5	Actividad Glutation s-transferasa hepática (GST)	54
2.5.1	Consideraciones generales	54
2.5.2	Técnica experimental	56
2.6	Estudio del transporte máximo (Tm) y de la capacidad relativa de almacenamiento hepático(S)de BSF	59
2.6.1	Consideraciones teóricas	59
2.6.2	Técnica experimental	61
2.7	Distribución intracelular hepática de BSF y DBSF	62
2.7.1	Introducción	62
2.7.2	Técnica experimental	63

	<u>Pag</u>	
2.8	Estudio de la fijación de BSF y DBSF a proteínas citosólicas hepáticas	64
2.8.1	Consideraciones generales	64
2.8.2	Protocolo experimental	65
2.9	Análisis de la fijación de BSF y DBSF a proteínas plasmáticas	66
2.9.1	Introducción	66
2.9.2	Técnica experimental	67
2.10	Procedimientos analíticos	68
2.10.2	Determinación de las concentraciones de PTP,AP y PTH	68
2.10.2	Determinación de la conc. hepática de GSH	69
2.10.3	Determinación del VP	70
2.10.4	Determ. del agua total y del espacio de inulina en cortes de hígado	70
2.10.5	Det. de ADN en homogenados hepáticos	73
2.10.6	Det. de ácidos biliares (AB), colesterol (CO), fos folípidos (FL), proteínas totales (PTB) y osmolari dad (OSM) de la bilis	73
2.10.7	Det. de las conc. de BSF y DBSF en plasma y bilis	75
2.10.8	Det. de BSF y DBSF en sobrenadante hepático y "pellet" de 105000 g	76
2.10.9	Separación cromatográfica de los conjugados de BSF en bilis	77
2.11	Análisis estadísticos	78

	<u>Pag</u>
2.12	Drogas y productos químicos utilizados 78

CAPITULO IV

Resultados

1	Efectos generales de la DA 79
1.1	Estudio del consumo de dieta 79
1.2	Efecto de la DA sobre el PC, PH,PTH y GSH hepático 82
1.3	Efecto de la DA sobre AP, PTP y VP 83
1.4	Efecto de la DA sobre la distribución de agua en hígado 83
1.5	Efecto de la DA sobre el número de células, contenido proteico y tamaño celular en hígado 84
1.6	Efecto de la DA sobre la actividad GST hepática 86
2	Efecto de la DA sobre la secreción biliar 88
2.1	Influencia de la DA sobre el FB basal y la velocidad de excreción biliar de AB 88
2.2	Influencia de la DA sobre la FIAB 89
2.3	Efecto de la DA sobre el FB canalicular 89
2.4	Efecto de la DA sobre la composición de la bilis 89
2.5	Conclusiones 92

CAPITULO V

	Influencia de la DA sobre el transporte hepático de BSF 96
1	Análisis farmacocinético de BSF 96

	<u>Pag</u>	
1.1	Resultados	96
1.2	Discusión	96
2	Efecto de la DA sobre la excreción biliar de BSF	100
2.1	Resultados	100
2.2	Discusión	101
3	Efecto de la DA sobre el Tm y el S de BSF	103
3.1	Resultados	103
3.2	Discusión	103
4	Influencia de la DA sobre la distribución intracelular hepática y la fijación de BSF a proteínas citosólicas hepáticas	104
4.1	Resultados	104
4.2	Discusión	106
 <u>CAPITULO VI</u>		
	Influencia de la DA sobre el transporte hepático de DBSF	107
1	Análisis farmacocinético de DBSF	107
1.1	Resultados	107
1.2	Discusión	110
2	Efecto de la DA sobre la excreción biliar de DBSF	110
2.1	Resultados	110
2.2	Discusión	112
3	Influencia de la DA sobre el Tm y el S de DBSF	113

	<u>Pag</u>	
3.1	Resultados	113
3.2	Discusión	113
4	Efecto de la DA sobre la distribución intracelular hepática la fijación de DBSF a proteínas citosó- licas hepáticas	114
4.1	Resultados	114
4.2	Discusión	116
5	Influencia de la DA sobre la fijación de BSF y DBSF a proteínas plasmáticas	117
5.1	Resultados y Discusión	117
	<u>CAPITULO VII</u>	121
1	Conclusiones	121
2	Resumen	124
3	Agradecimientos	129
4	Bibliografía	131

CAPITULO I

Introducción

Existe abundante literatura referente a la importancia del estado nutricional sobre la toxicidad de drogas y agentes químicos. Alteraciones del balance nutricional pueden aumentar la toxicidad por mecanismos fisiológicos, bioquímicos o inmunológicos.

De los componentes de la dieta los más estudiados han sido las proteínas y la mayor parte de la información obtenida ha sido sobre las enzimas metabolizadoras de drogas, localizadas en el retículo endoplasmático de la célula hepática.

Es reconocida la importancia del hígado en el metabolismo de los componentes de la dieta. Precisamente debido a este vital papel, dicho órgano es muy vulnerable a la ingesta de dietas deficientes y/o de agentes tóxicos, los cuales pueden inducir rápidamente cambios estructurales y de la función.

Es de importancia destacar que a pesar de lo extenso de la bibliografía, existe una carencia de información que relacione la carencia proteica en la dieta con los mecanismos del transporte hepático de aniones orgánicos.

1 Modelos experimentales utilizados para el estudio de los efectos de la deficiencia proteica en la dieta

Se han desarrollado distintos modelos experimentales para estudiar la influencia de la deficiencia proteica en la dieta sobre distintos parámetros fisiológicos y bioquímicos (1-2). La mayor parte de ellos se han hecho en ratas aunque también se han utilizado otros animales como perros (3), ovejas (4), ratones (5) y aves (6). La rata ha sido el animal de elección debido a su bajo costo, a su relativamente fácil manejo, a la posibilidad de su mantenimiento en grandes colonias y al moderado grado de mortalidad de los animales mantenidos durante varias semanas con dietas deficientes en proteínas. Se han utilizado en la mayor parte de los estudios, ratas recién destetadas o en crecimiento ya que el efecto de la deficiencia proteica en animales adultos, es menos marcada (2)(7). Otros importantes elementos a considerar son la calidad, cantidad y duración del régimen dietario. Se han observado diferencias en la toxicidad de pesticidas (2) y agentes quimioterápicos (8) en animales alimentados con cantidades equivalentes de proteínas de distinto origen, como caseína, soja o gluten (9). Además, se han descrito incrementos de toxicidad de pesticidas en relación con la disminución del porcentaje de proteínas en la dieta (9). Generalmente se considera que el porcentaje óptimo de proteína en la dieta de la rata es de 21 % (aprox. 25 % caseína). En tal forma, en la preparación de dietas deficientes, se puede reducir la proporción de proteína manteniendo la dieta isocalórica, mediante sustitución con sacarosa o almidón.

Las ratas pueden ser mantenidas varias semanas con dietas que

tengan $1/4$ ó $1/8$ del requerimiento proteico (10) y más de dos semanas con dietas apteicas, dependiendo ello de la edad del animal (2).

Sin embargo es necesario destacar que los datos experimentales disponibles, están referidos casi totalmente a animales jóvenes resultando por lo tanto de interés conocer la respuesta a la deficiencia proteica de los animales adultos.

2 Alteraciones fisiológicas y bioquímicas producidas por la deficiencia proteica en la dieta

2.1 Crecimiento y desarrollo. Peso corporal

La adaptación de animales y seres humanos a la carencia de proteínas en la dieta resulta en alteraciones tales como pérdida de peso corporal, disminución del crecimiento y desarrollo, como así también limitación de distintos parámetros fisiológicos y bioquímicos expresados en terminos de peso tisular (7) (10-11)

2.2 Alteraciones histológicas hepáticas. Síntesis de proteínas hepáticas

Alteraciones histológicas

Los cambios histológicos observados en los órganos de animales alimentados con dietas de bajo contenido proteico, son similares a los hallados en el kwashiorkor, especialmente la infiltración grasa del hígado (12 - 14) que es una característica de la citada patología.

De acuerdo con evidencias experimentales, la severidad de la deficiencia grasa depende de 2 factores:

a) tenor proteico de la dieta

b) tiempo de administración de la dieta deficiente

Campana y col. (15), observaron en ratas adultas alimentadas con una dieta aprroteica durante 28 días, que la mayor parte de los animales desarrollaron infiltración grasa en el hígado de distinta magnitud. Camargo y col. (16), utilizando ratas adultas alimentadas con DA durante períodos de 7 - 28 - 56 y 84 días, observaron que hasta los 7 días de administración de la DA no se producen cambios histológicos. Con el tiempo comienza a aparecer una infiltración grasa difusa de distribución periportal y correlativamente, un aumento del contenido lipídico del hígado, necrosis hepática y distorsión de la arquitectura normal con fibrosis en los períodos finales del experimento.

Hartroft (17) y Madi (18) también observaron necrosis hepática en animales jóvenes alimentados con dietas de bajo tenor proteico durante períodos prolongados. Deo (19), en experimentos realizados con monos Rhesus jóvenes alimentados con dietas hipoproteicas, observó también la aparición de infiltración grasa en las primeras 3 semanas presentando los animales, a las 10 semanas, infiltración grasa difusa y la aparición de vacuolas grasas en el hígado; después de las 15 semanas se produjo fibrosis hepática, infiltración celular y necrosis.

El origen de la infiltración grasa no ha sido aclarado, pudiendo ser debido a una eliminación defectuosa de triglicéridos o a un aumento de la movilización de ácidos grasos libres de los depósitos grasos (16). Ambos factores pueden coexistir y a los cuales puede sumarse un aumento de la velocidad de síntesis hepática de lípidos (20).

Es necesario aclarar que en los experimentos prolongados de pri

vacación proteica, los animales tienden a disminuir el consumo de alimento, probablemente debido a que la deficiencia provoca una disminución del apetito y por ende una deficiencia calórica, de vitaminas y de minerales que complican el cuadro.

Svoboda (21) realizó experimentos en ratas jóvenes, a las que administró en forma crónica una dieta hipoproteica, no observando en ninguno de los órganos estudiados signos de necrosis o de gradación citoplasmática, además en dichos estudios todos los cambios bioquímicos producidos, fueron revertidos por la administración de una dieta normal. Ello sugirió un estado de adaptación celular a la deficiencia, más que una daño irreversible.

Síntesis de proteínas hepáticas

Se ha sugerido (19), que en las primeras etapas de la deficiencia proteica, son afectados selectivamente los órganos que tienen alto recambio proteico, como el hígado y el páncreas y también los órganos con alto recambio celular, como el epitelio intestinal.

Los cambios básicos en los órganos con alto recambio proteico parecen ser una reducción del ARN y de ciertas enzimas (22). En los órganos con alto recambio celular pareciera existir un retardo en la proliferación celular. Algunos autores han demostrado que la administración de una dieta aproteica provoca una disminución del contenido de proteínas totales hepáticas (21) (23) (24); dicha disminución se produce rápidamente en los primeros 5 días de carencia, continuando luego en forma más lenta. Garlick (25) observó que la falta de proteínas en la dieta, provoca un aumento en la velocidad de degradación de las proteínas hepáticas.

Hayase (23) confirmó que el aumento del catabolismo de las proteínas, es uno de los factores que reduce rápidamente el contenido proteico del hígado, cuando se administra en ratas una dieta aprroteica.

Algunos autores (26) (27) determinando la incorporación de aminoácidos marcados "in vivo" e "in vitro", han sugerido que la deficiencia proteica no altera la síntesis hepática de proteínas.

Stenram ha demostrado en ratas alimentadas con DA por medio de estudios ultraestructurales (28) y bioquímicos (24) que no se altera el número de ribosomas libres y polisomas de la célula hepática, cuyas funciones son sintetizar proteínas para uso interno del hepatocito. Además demostró que el hígado de los citados animales mantiene la capacidad de aumentar la cantidad de retículo endoplasmático liso ante un estímulo con DDT (29).

Ha sido establecido que todos los aminoácidos deben estar disponibles en forma simultánea para que las células sean capaces de sintetizar proteínas (26). Cuando algún aminoácido falta en la dieta, es necesario que una fuente endógena lo reemplace para que la síntesis proteica continúe. Sidransky (26) ha sugerido que esa fuente sería probablemente el músculo esquelético, que es un gran reservorio de proteínas y aminoácidos.

Dicho autor observó que en ratas alimentadas con dietas purifi cadas carentes de un aminoácido esencial, rápidamente se altera el metabolismo proteico del músculo esquelético, con un aumento del catabolismo. En consecuencia, los aminoácidos provenientes de la dieta y del catabolismo proteico del músculo esquelético alcanzarían el hígado, donde es probable que puedan jugar un importante papel influenciando la síntesis hepática de

proteínas (26).

2.3 Síntesis de proteínas plasmáticas

Numerosos autores han demostrado que dietas deficientes en proteínas provocan en animales de experimentación una disminución de la concentración de proteínas totales plasmáticas, especialmente de la concentración de albúmina plasmática (AP) (11)

(30) (31). Las causas de dicha alteración son las siguientes:

- disminución de la disponibilidad de aminoácidos para la síntesis proteica, ya que se ha demostrado que la depleción proteica produce una marcada disminución de las concentraciones de leucina y otros aminoácidos en hígado y plasma (32).
- disminución de la velocidad de síntesis de AP, debido a la causa anterior y a una disminución del sistema hepático sintetizador de proteína y ARN.

Morgan y Peters (33) demostraron que la velocidad de síntesis de AP determinada "in vivo" por medio de técnicas isotópicas, decae abruptamente en animales alimentados con DA. La reducción en dicha velocidad fue de un 70 % , confirmando experimentos realizados por Kirsch (11) aplicando otras técnicas.

También demostraron, Morgan y Peters, que restableciendo los niveles de aminoácidos, el mecanismo sintetizador de AP es capaz de responder en períodos de tiempo muy cortos.

Estenram describió en ratas alimentadas con DA, mediante estudios ultraestructurales (28) y bioquímicos (24) una disminución del número de ribosomas unidos a membranas. Es sabido que una de las funciones de dichos ribosomas es sintetizar AP.

Además dicho autor determinó la capacidad funcional del sistema microsomal durante la deprivación proteica, utilizando para ello la actividad de una enzima sintetizada por dicho sistema, la NADPH citocromo C reductasa (34).

Los estudios citados indicaron que el sistema conserva una alta capacidad funcional, confirmando los experimentos de Morgan y Peters ya descriptos (33).

2.4 Enzimas metabolizadoras de drogas

Existe abundante evidencia de que deficiencias tanto en la calidad como en la cantidad de las proteínas de la dieta están asociadas con una disminución de la actividad de varios sistemas enzimáticos hepáticos metabolizadores de drogas (9)

(35 - 36- 37). También son afectadas por la privación proteica, enzimas del retículo endoplasmático intestinal (38) la colinesterasa sérica y hepática (39), etc.

Sin embargo no todos los sistemas metabolizadores de drogas son igualmente afectados (38) y algunos de ellos aún pueden ser activados por inductores (9) (36-37).

Estudios realizados con pesticidas (40) y sustancias hepatotóxicas (41), han demostrado que los compuestos que ejercen sus efectos tóxicos a través de metabolitos originados en hígado son menos tóxicos en animales deficientes en proteínas.

También se ha observado que pesticidas inactivados por metabolización, son más tóxicos en dichos animales (9).

2.5. Farmacocinética de drogas

La deficiencia proteica en la dieta puede alterar la farmacocinética de drogas debido a que puede influenciar la actividad

de enzimas metabolizadoras de drogas, la fijación de éstas a proteínas y a tejidos, la depuración renal, etc.

Existen pocos estudios que hayan analizado el efecto de la carencia proteica en la dieta sobre la farmacocinética de drogas. Por ejemplo, Shastri y col. (42) observaron que la desnutrición proteica-calórica en humanos adultos, produce una disminución de la vida media plasmática y del volumen de distribución de tetraciclinas, asociado con una disminución de la capacidad de absorción del medicamento y un aumento del "clearance" de la droga.

Varma y col. (43) describieron que la ~~deficiencia~~ proteica en la dieta de ratas está asociada con un aumento del "clearance" y una disminución de la vida media plasmática de salicilato.

Las causas productoras de dichas alteraciones fueron:

- a) una disminución de la fijación de salicilato a proteínas plasmáticas.
- b) un aumento en la conversión de ác.salicilico a salicilúrico.

Ambas causas contribuyen a una excreción urinaria aumentada de salicilato, cuyos efectos se reflejan en el análisis farmacocinético.

No es correcto pensar que la deficiencia proteica solo puede afectar la farmacocinética de drogas que se fijan a las proteinas plasmáticas y que son metabolizadas por el hígado. Se debe tener en claro que la deficiencia proteica produce cambios fisiológicos y bioquímicos que solos o en combinación, son capaces de afectar el comportamiento de drogas.

Dichos cambios pueden ser por ejemplo, la alteración de la sensibilidad de células o tejidos a drogas (44) y la disminución

de la respuesta inmune (45) capaz de alterar la acción de agentes inmunosupresores, antimicrobianos, etc.

No existen datos suficientes que permitan establecer generalizaciones acerca de la relación entre estructura química de drogas y los cambios que se producen en la farmacocinética por la deprivación proteica.

3 Fisiología de la Secreción Biliar

3.1 Introducción

La bilis es formada por el hepatocito (bilis hepatocelular o canalicular) y secretada en el canalículo biliar; luego es modificada en su paso por dúctulos y ductos biliares, por reabsorción o secreción de agua y electrolitos.

La secreción biliar es una solución isosmótica con el plasma, compuesta de agua, electrolitos y sustancias orgánicas (AB,CO, FL,PTB, pigmentos biliares, etc.) (46).

La secreción de bilis por el hepatocito es un proceso complejo que incluye 3 etapas conocidas:

- captación o síntesis de diversas sustancias por el hepatocito
- transporte intracelular de dichas sustancias
- excreción de agua y de productos orgánicos e i-norgánicos al canalículo biliar

El estudio de la formación de la bilis canalicular ha sido extremadamente difícil, debido a que no se han desarrollado técnicas de micropunción y el producto primario de la secreción no ha podido ser analizado en forma directa. Por lo tanto la formación de bilis hepática ha sido estimada por métodos indirectos, como el "clearance" de solutos inertes en condiciones de estado estacionario.

3.2 Consideraciones anatómicas

Cada hepatocito funciona como una unidad secretora, con polari

dad definida. Los solutos se transportan desde la sangre al hepatocito a través de la membrana sinusoidal y lateral.

La secreción de bilis se produce a través de la superficie apical que conforma el canalículo biliar. Los canalículos biliares son pequeños canales de 0.1 - 0.5 μm de diámetro, cerrados en un extremo y drenan por el otro en los conductillos o dúctulos biliares que luego confluyen en conductos de mayor calibre o ductos (47).

El canalículo biliar está limitado por dos o más raramente tres hepatocitos vecinos (47), este espacio está delineado por la membrana plasmática de los hepatocitos, denominada membrana canalicular. Dicha membrana tiene una extensa superficie en la que se destacan microvellosidades que se proyectan hacia la luz del canalículo.

Además el canalículo está separado del espacio intercelular por complejos de unión que constituyen una barrera anatómica para la difusión entre la bilis y el espacio extracelular (48).

La membrana plasmática del hepatocito orientada hacia la superficie sinusoidal, se denomina membrana sinusoidal.

La pared sinusoidal posee por su parte grandes fenestraciones que permiten el contacto directo de los componentes del plasma con las membranas sinusoidales y laterales como así también con el espacio intercelular (48).

Las células hepáticas funcionan dentro de la estructura de una unidad microcirculatoria denominada acino hepático (49-50).

Los hepatocitos reciben la sangre desde un eje conformado por la vénula portal terminal (VPT) y la arteriola hepática terminal (AHT). Los sinusoides que se distribuyen radialmente a este eje, reparten la sangre a través de las células del acino

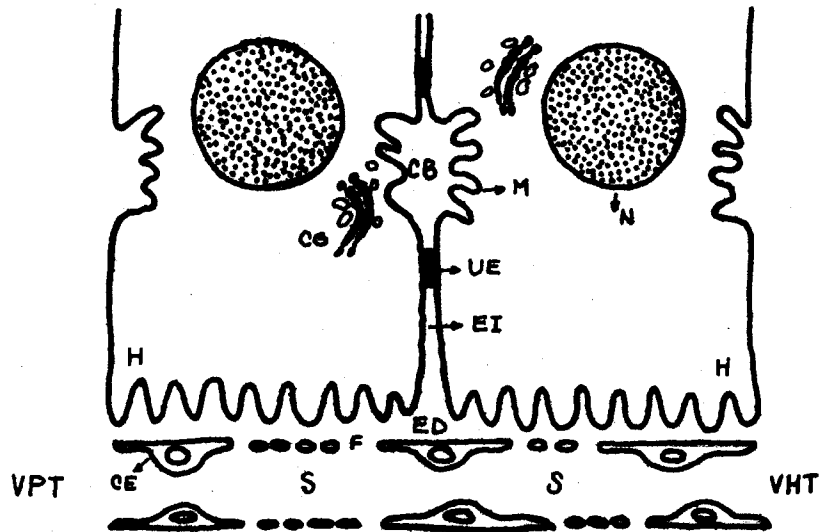


Fig. 1 : Esquema de la célula hepática, el canalículo biliar (CB) está ligado a cada lado por uniones estrechas (UE). El espacio intercelular (EI) comunica con el espacio de Disse (ED). Hepatocito (H), Núcleo (N), Microvellosidades (M), Complejo de Golgi y vesículas pericanaliculares (CG), sinusoides (S) células endoteliales (CE), fenestraciones (F), vena porta terminal (VPT), vena hepática terminal (VHT)

en forma secuencial y unidireccional desde la zona 1 (periportal) a la 3 (centrolobulillar), donde es recogida por una o más vénulas hepáticas terminales (VHT) (Fig. 2).

Esta organización microvascular provee las condiciones necesarias para el desarrollo de microambientes dentro del acino hepático promoviendo así la división arbitraria de esta unidad en tres zonas acinares:

Zona 1 : comprende los hepatocitos alrededor de la VPT

Zona 3 : comprende los hepatocitos alrededor de la VHT

Zona 2 : comprende la zona intermedia entre 1 y 3

Cabe destacar que existe una heterogeneidad funcional entre los hepatocitos del acino, lo cual es debido a las diferentes concentraciones de sustrato (incluyendo O_2) en la sangre sinusoidal que baña los hepatocitos de las distintas zonas habiéndose demostrado diferencias bioquímicas y morfológicas entre los hepatocitos de las mismas (50-52). Con los efectos provocados por drogas, se manifiestan dichas diferencias funcionales, así por ejemplo el acetaminofeno y bromobenceno, dañan células de la zona 3 predominantemente mientras que el alcohol alílico, las de la zona 1.

También la organización funcional del acino es responsable de diferencias en otros procesos como captación, metabolización y excreción biliar de diversos sustratos.

El primer paso involucrado en el transporte de un soluto, es el eventual pasaje a través de las fenestraciones sinusoidales hacia el espacio de Disse para entrar en contacto con la membrana plasmática del hepatocito (Fig. 1).

Existen diferencias de conc. de solutos en la sangre sinusoidal dentro de cada zona del acino y también diferencias zonales en la configuración de los sinusoides, en la distribución de las fenestraciones, en las características del espacio de Disse y en el área de superficie de la membrana plasmática, que pueden influenciar el transporte dentro del acino hepático.

Análisis morfométricos (53) han demostrado que la relación superficie/volumen de los sinusoides es mayor en la zona 1 que en la zona 3, lo cual indica que la probabilidad de interacción de un soluto con la pared sinusoidal es mayor en la entrada del acino. Como el número de fenestraciones de la pared sinusoidal predomina en esta zona, el pasaje de solutos hacia el espacio de

Disse está favorecido, lo cual aumenta la probabilidad de interacción del soluto con la membrana del hepatocito. Además la conc. de metabolitos ingresantes es mayor en los sinusoides en la entrada del acino, mientras que en los segmentos distales, disminuye por el intercambio producido en la zona proximal. Estos hechos indican que los hepatocitos de zona 1 contribuyen predominantemente a la captación de solutos.

Se han propuesto gradientes decrecientes de conc. celular desde la zona 1 a la 3 para sustancias como galactosa, bilirrubina y AB. Solamente se ha obtenido demostración directa para galactosa (54) y para colilglicilhistamina (análogo de AB) (55). Parecería además que este tipo de gradiente existiría para sustancias liposolubles, que son captadas por difusión simple. La contribución del acino hepático al transporte de solutos captados por procesos mediados por transportadores depende de otros factores como la distribución y propiedades cinéticas de los transportadores de las membranas de los hepatocitos de las distintas zonas acinares (56).

3.3 Factores determinantes de la formación de la bilis

La bilis es normalmente secretada a una presión que excede a la presión de la sangre en el polo vascular del hepatocito (57). Como consecuencia, la energía necesaria para la formación de la bilis proviene del trabajo metabólico de las células más que de la presión hidrostática capilar. Por lo tanto la bilis no es formada por un proceso de filtración como en el caso de la orina, sino por mecanismos secretorios que dependen de fuentes celulares de energía.

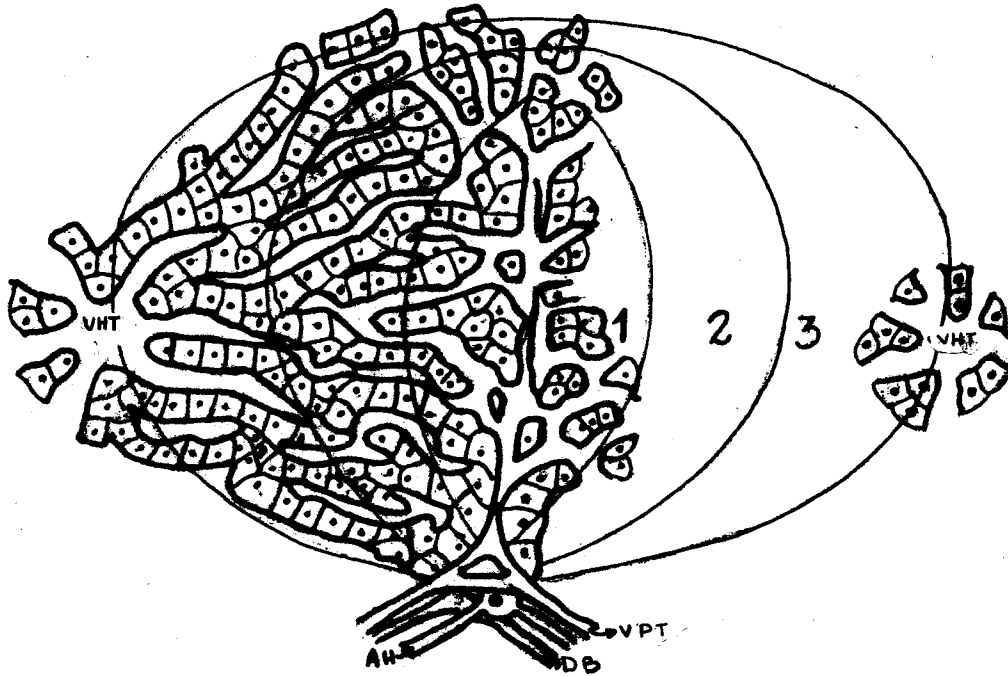


Fig. 2 : Esquema del acino hepático, vénula portal terminal (VPT), vénula hepática terminal (VHT), zonas del acino (1-2-3), d \acute{u} ctulo biliar (DB), arteria hepática (AH)

Varios procesos secretorios tales como transporte activo, exocitosis y el movimiento pasivo de agua en respuesta a gradientes osmóticos, podrían explicar el movimiento neto de agua al canalículo biliar. Como el transporte activo de agua es energéticamente improbable en sistemas biológicos, se puede concluir que el flujo de agua (que constituye el mayor volumen de la secreción), debe ser la consecuencia del transporte activo de solutos.

Las observaciones de Sperber (58 - 59), han sugerido que cualquier compuesto osmóticamente activo secretado a la bilis, arrastraría agua y otros solutos difusibles, hacia la bilis. Dicho autor ha propuesto que el transporte activo de los ác. biliares hacia la luz del canalículo, es capaz de suministrar

la fuerza osmótica que permite el transporte pasivo de agua y electrolitos y en consecuencia producir el FB. Como confirmación de esta hipótesis, se ha observado una relación lineal entre la velocidad de excreción de AB y el FB, en varias especies de vertebrados y en el hombre. Este flujo es convencionalmente denominado Flujo biliar dependiente de ácidos biliares FDAB (61-63). La extrapolación a la ordenada (velocidad de excreción de AB = 0) de la recta de regresión que relaciona estas dos variables, define un componente de la secreción considerado independiente de AB por Erlinger (60 - 63), quien postuló que su formación es debida a la secreción activa de Na^+ . Los mecanismos que involucran esta fracción son discutidos en las secciones siguientes.

3.4 Transporte hepático de AB

Los AB se encuentran entre los solutos que son transportados en mayor cantidad por el hígado (el hígado humano transporta aproximadamente 300 mg de bilirrubina del plasma a la bilis cada día y al mismo tiempo 20 g de AB conjugados).

El transporte de AB del plasma a la bilis comprende al menos 3 etapas que son: captación por el hepatocito, transporte intracelular y secreción canalicular.

La captación de AB por el hígado es un proceso saturable (64 - 65), que ocurre contra un gradiente electroquímico (66). La conc. de AB en la vena porta de la rata está en el rango de 50 - 170 μM (67 - 68), mientras que en la célula hepática ha sido estimada entre 100 y 300 μM (69).

Una de las características de la captación de AB es su depen-

dencia del Na^+ , especialmente para los AB conjugados. Se ha de mostrado en hígado aislado de rata (65 - 70), en hepatocitos aislados (71) y en cultivos de hepatocitos (72 - 73), que cuando se omite el Na^+ en el medio externo se reduce considerablemente la captación de AB.

En experimentos realizados con vesículas formadas por membranas aisladas (método que permite diferenciar fenómenos de membrana de los inherentes a la célula), se ha observado que el gradiente de Na^+ es la mayor fuerza impulsora del transporte de taurocolato (74 - 75). Todas estas evidencias sugieren un proceso de transporte de AB acoplado al Na^+ (76). La energía para este tipo de transporte provendría del gradiente de Na^+ establecido por la ATPasa - Na^+ - K^+ . Existen otras evidencias que confirmarían este postulado. Por ejemplo, la ouabaina inhibe significativamente la captación de AB (77) y la furosemida y bumetanida, que son inhibidores del transporte acoplado de Na^+ en otros tejidos, bloquean la captación de AB en hepatocitos aislados de rata (78).

El mecanismo postulado sería un sistema de cotransporte que incluye el transporte de Na^+ (a favor de un gradiente electroquímico) y de un soluto (AB), con la acumulación del soluto en contra de un gradiente electroquímico. Este tipo de sistema se define como activo (porque se produce movimiento del soluto en contra de un gradiente electroquímico) y secundario (porque no está directamente ligado a la fuente energética (ATP) sino al gradiente de Na^+ (75). Como conclusión podemos decir que la mayor fuente energética para el transporte de AB por el hígado proviene del gradiente de Na^+ y como éste es provisto por la ATPasa - Na^+ - K^+ , es razonable suponer que la ATPasa juega un

importante papel en el transporte de AB.

No se ha caracterizado un transportador de AB, pero se han descrito receptores para los mismos en las membranas del hepatocito (80).

Dentro del hepatocito, los AB son fijados a proteínas citosólicas (81), transferidos a la zona canalicular y secretados a la luz canalicular. Es probable que en este último proceso esté involucrado un transportador que presenta características de saturación y velocidad máxima de excreción (82).

La comparación de las capacidades del hígado para la captación y la excreción de AB, revela que la capacidad máxima de captación (V_{max}) es varias veces superior a la capacidad máxima de excreción biliar (83 - 84). En consecuencia, la captación hepática de AB pareciera no ser un factor limitante para el transporte de los mismos del plasma a la bilis.

3.5 Flujo biliar dependiente de AB

Se ha observado en numerosas especies como el perro (62), la rata (85), el conejo (86) y el hombre (87), que los AB producen una secreción biliar habiéndose demostrado una correlación entre FB y velocidad de excreción biliar de AB, dentro de un amplio rango de velocidades. Esperber (52 - 53) ha sugerido que la coleresis inducida por AB, es consecuencia del gradiente osmótico creado por la excreción de AB al canaliculo y que dicho gradiente provee la fuerza osmótica necesaria para la filtración a través de la membrana canalicular.

El aumento del FB producido por los AB, es de origen canalicular debido a que está asociado con un aumento equivalente de la

depuración biliar de eritritol (85 - 86) (88).

Existen otras observaciones que podrían reforzar la hipótesis de Sperber y se basan en el hecho de que otros aniones orgánicos diferentes a los AB y sustancias no aniónicas que también son transportadas a la bilis, tienen acción colerética.

La relación entre el incremento del FB, y el incremento de la excreción de AB, ha sido considerado como una medida del poder osmótico de los AB excretados pudiendo ser estimado por el cálculo de la pendiente, en la correlación entre FB y velocidad de excreción de AB.

Se ha observado que el volumen de agua excretada por μmol de AB, varía con las distintas especies y con los diferentes AB.

En varias especies estudiadas, se ha demostrado que cuando se utiliza taurocolato, la cantidad de agua excretada por nmol de AB oscila entre 6 y 12 ml (61) (64) (86).

En cuanto a la eficiencia colerética de los AB, se ha demostrado que el ác. cólico es 50 % osmóticamente más activo que su análogo conjugado con taurina que es el taurocolato (89).

Klaassen ha estudiado las propiedades coleréticas de los AB que naturalmente existen en el perro (90), como cólico, quenodesoxicólico y desoxicólico, demostrando que los AB conjugados poseen una potencia colerética menor que sus análogos no conjugados, a excepción del taurodesoxicólico que es tan potente como el desoxicolato. Las razones para estas distintas propiedades no son aún bien conocidas.

Si bien la excreción de AB es el principal determinante de la secreción biliar, no está claro aún si los líquidos y electrolitos que acompañan a los AB, provienen del interior de la célula o llegan a través de los espacios intercelulares. Algunos

autores han sugerido que los AB serían los factores reguladores de la permeabilidad de los complejos de unión intercelulares (vía paracelular) (91) permitiendo así el movimiento de agua y solutos.

3.6 Flujo biliar independiente de AB

Existen evidencias de que la secreción de AB no es el único factor responsable de la producción de bilis, ellas son:

- permanencia del FB en animales depleccionados de AB por canulación prolongada del colédoco, con derivación de la bilis al exterior (92).
- permanencia del FB en hígado aislado y perfundido de rata, en el que no existe circulación enterohepática y la excreción de AB es mínima (60).
- cuando se establece la correlación entre FB y velocidad de excreción de AB, se obtiene generalmente una relación lineal y la extrapolación de la recta de regresión a veloc. de excreción de AB , igual a cero, conduce a un FB positivo.

Erlinger ha denominado a esta fracción del FB, flujo independiente de AB (FIAB) (86) postulando que la misma es debida a la secreción activa de Na^+ .

Esta fracción es aproximadamente en las ratas, 50-70 % del FB (60) (93) y en humanos en ayunas con recolección biliar por medio de un tubo colédociano, aproximadamente el 50 % del FB canalicular (61) (94).

La hipótesis de Erlinger de que la FIAB es debida a la secreción activa de Na^+ , está basada en el hecho de que los inhibido

res de la ATPasa - Na^+ - K^+ disminuyen el valor de la intercepción positiva de la línea de regresión obtenida por la relación entre FB y veloc. de excreción de AB. Es decir dichos inhibidores, disminuirían la FIAB.

Estas observaciones fueron confirmadas en hígado aislado y perfundido de rata, aunque requiriendo muy altas conc. de inhibidores de la ATPasa (60). Paradójicamente, la mayor parte de los inhibidores de la ATPasa utilizados por Erlinger en conejos, son secretados en la bilis por procesos concentrativos, induciendo una coleresis osmótica (95 - 97). Por tales motivos resulta muy dificultoso interpretar los resultados expuestos.

Una aproximación más directa, ha sido la determinación de la actividad ATPasa en membranas plasmáticas de hepatocitos en situaciones experimentales en las que la FIAB es modificada. Así se encontró que utilizando agentes colestásicos (estrógenos o clorpromacina) o coleréticos (fenobarbital y hormona tiroidea), se producen variaciones paralelas de la actividad ATPasa y la FIAB (98-102). Cuando se determinó la ubicación de la enzima, se encontró que la mayor parte de la actividad está relacionada con la membrana sinusoidal y con la intercelular (103 - 104). Dichos estudios fueron confirmados por otras demostraciones bioquímicas de actividad ATPasa en la subfracción lateral de la membrana plasmática (105).

Se han propuesto dos modelos para explicar el modo de acoplamiento entre la actividad enzimática y la secreción de AB :

- el primero de ellos, describe el transporte activo de Na^+ hacia el espacio intercelular, seguido del movimiento pasivo agua y electrolitos a través de los complejos de unión intercelulares. Existen evidencias de que la vía paracelular en

el hígado, presenta permeabilidad para iones y agua. Estudios realizados con moléculas como sucrosa, inulina y polietilenglicol 4000 han revelado que estas sustancias llegan a la bilis a través de la vía paracelular (106-108). Otros estudios con solutos cargados (ferrocianuro y carboxilina), han demostrado permeabilidad selectiva para cargas negativas (106). En el hígado aislado y perfundido de rata, la mayor parte del flujo de Na^+ pareciera provenir de la vía paracelular (109). Si se acepta una permeabilidad de la vía paracelular al Na^+ y la ubicación de la enzima sobre la membrana intercelular, el Na^+ podría ser bombeado a lo largo de los espacios intercelulares y ser capaz de difundir a través de los complejos de unión, arrastrando así agua osmóticamente, a la luz canalicular.

- el segundo modelo propone el transporte de un anión (Cl^- o HCO_3^-) aprovechando el gradiente de Na^+ provocado por la ATPasa. El transporte de Cl^- acoplado al de Na^+ ha sido demostrado en algunos epitelios (110), aunque no existen evidencias concluyentes en epitelios secretores. El transporte de HCO_3^- es otra posibilidad, existiendo evidencias experimentales de un mecanismo transportador de CO_3H^- en la célula hepática (111-113). En algunas especies como el conejo y el cobayo, se ha observado una conc. biliar de HCO_3^- que duplica la del plasma (114).

Podemos concluir que las evidencias obtenidas hasta el presente, no aclaran totalmente el origen de la FIAB, pero hasta que se desarrollen nuevas técnicas que permitan dilucidar el problema, es lícito continuar con la terminología y la metodología actualmente

utilizadas (79).

3.7 Métodos de estudio de la secreción biliar

Los parámetros más importantes que deben ser considerados en el estudio de la secreción biliar son:

- el FB
- la velocidad de excreción biliar de AB
- el FB canalicular

El FB total puede ser determinado directamente en los animales de experimentación, mediante la cateterización del colédoco y la recolección de la bilis.

El conocimiento de la velocidad de excreción biliar de AB es sumamente importante, debido al papel que éstos cumplen en la secreción de la bilis, pudiendo ser calculada a partir de la determinación de la conc. de AB en las muestras obtenidas y la medición del FB. Dicha velocidad de excreción biliar se calcula como el producto del FB x { AB }.

La determinación del FB canalicular es necesaria para distinguir entre la producción de bilis hepatocítica y los movimientos de agua producidos en los ductulos y ductos.

Para estimar el FB canalicular se utiliza la técnica de depuración de solutos inertes como eritritol o manitol (115 - 117).

La técnica se basa en el hecho de que los hepatocitos son permeables a hidratos de carbono inertes. Estos solutos penetran en la bilis a través del canalículo por difusión simple y no son reabsorbidos ni secretados por los ductulos y ductos. Por lo tanto la depuración biliar de estos solutos, refleja los movimientos de agua a través del canalículo. La depuración biliar de estos hidra

tos de carbono es calculada como el producto del FB por la relación de conc. en bilis y plasma de los mismos.

$$\text{Depuración eritritol} = \text{FB} \times \frac{\{\text{erit}\}_{\text{bil}}}{\{\text{erit}\}_{\text{pl}}}$$

4 Fisiología del transporte hepático de aniones orgánicos

4.1 Aniones orgánicos

Brauer (118) observó que ciertas sustancias eran excretadas en bilis en concentraciones mayores que las que tenían en plasma. Evidentemente para que ello ocurriera debería existir un mecanismo de transporte responsable del fenómeno observado.

Brauer también encontró ciertas similitudes entre esas sustancias, como por ejemplo que eran ácidos carboxílicos orgánicos o ácidos sulfónicos de peso molecular mayor de 300, que mostraban tendencia a formar complejos con la AP y la característica común a todos era que se comportaban como aniones al pH del plasma y la bilis (119-120).

Dentro del término aniones orgánicos se engloba a sustancias como los AB, bilirrubina, colorantes como BSF, DBSF, VIC, etc.

En este trabajo se analizan dos aniones orgánicos, la BSF y DBSF. La BSF es el disulfonato sódico de fenoltetrabromoftaleína (PM = 838) y la DBSF es el disulfonato sódico de fenol 3,6 dibromoftaleína (PM = 680). (Fig.3).

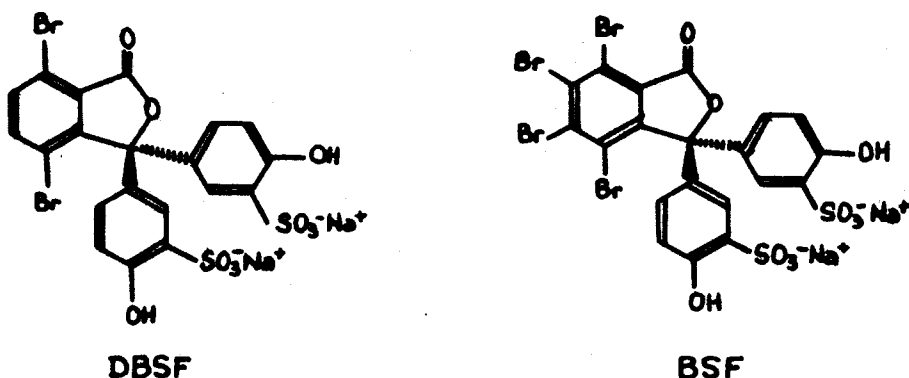


Fig. 3 : Estructuras de la dibromosulfoftaleína (DBSF) y de la Bromosulfoftaleína (BSF)

Rowntree (121) introdujo en 1913 el uso de las ftaleínas halogenadas para evaluar la función hepática. El método consistía en cuantificar la cantidad de fenoltetracloroftaleína excretada en las heces, luego de su administración parenteral.

En 1922 Rosenthal (122) demostró que la BSF era eliminada de la circulación sanguínea casi exclusivamente por el hígado y por lo tanto propuso investigar la función hepática, utilizando la velocidad de desaparición plasmática de este colorante. Desde entonces este colorante ha sido ampliamente utilizado para la exploración de la función hepática y también con fines diagnósticos. Posteriormente otros investigadores (123) demostraron que la BSF es conjugada con GSH, previamente a su excreción biliar. En 1964, Javitt (124) propuso a la DBSF para el estudio de la función hepática, ya que es un compuesto análogo estructuralmente a la BSF, con la única excepción de que no sufre el proceso de conjugación previo a su excreción biliar. Por dicha razón, se sugirió que este colorante podría ser útil para diferenciar factores que afectan la captación y excreción, de aquellos que interfieren con la conjugación.

Estos dos colorantes después de su administración intravenosa se fijan casi totalmente a la AP (125-126) y como además tienen una muy pequeña distribución extrahepática (127), pueden ser considerados como herramientas válidas para el estudio de los procesos de transporte hepático.

En los próximos puntos se describirá de manera general los distintos pasos del transporte hepático de aniones orgánicos, incluyendo captación, fijación a proteínas citosólicas hepáticas, conjugación y excreción biliar.

4.2 Captación hepática

La captación de aniones orgánicos del plasma por la membrana sinusoidal del hepatocito, ha sido estudiada, aplicando la técnica de dilución de indicadores múltiples (128). Esta técnica consiste en el análisis de las curvas de dilución en la sangre venosa hepática, de un soluto inyectado en la vena porta junto con marcadores de referencia, tales como glóbulos rojos marcados con ^{51}Cr y ^{131}I -AP. Luego de un adecuado tratamiento matemático se pueden obtener constantes aparentes para movimientos bidireccionales del soluto estudiado, a través de la membrana sinusoidal de la célula hepática.

Con estos estudios se observó que BSF (129), AB (64) y VIC (130) son captados por el hepatocito por un proceso saturable y que las velocidades máximas de entrada a la célula son sustancialmente mayores que el transporte máximo para la excreción biliar. Además se demostró que la AP marcada inyectada con esos aniones, es totalmente recuperada en el eflujo venoso con un tiempo de tránsito muy corto, lo cual ha permitido sugerir que los aniones entran a la célula, disociados de la proteína a la cual se fijan en el plasma.

Las velocidades de captación pueden ser estimadas en el animal entero analizando las curvas de desaparición plasmática.

Scharschmidt (131) ha demostrado aplicando dicha técnica, que la captación hepática de Bilirrubina, BSF y VIC presenta las siguientes características:

- saturación con el aumento de la dosis
- inhibición competitiva mutua
- contratransporte

Estas características sugieren que el proceso de captación hepática de estos aniones es mediado por un mecanismo de transporte facilitado. La reciente demostración de sitios de fijación saturables en las membranas canalicular y sinusoidal de los hepatocitos (132) y el aislamiento de una proteína fijadora de BSF en la membrana plasmática (133), apoyan dicha hipótesis. Existen datos experimentales recientes que indican que la captación es medida en forma primaria por interacción directa del complejo ligando-AP con la superficie del hepatocito, a diferencia de lo que se ha considerado clásicamente y que es la interacción del ligando libre (134).

El complejo ligando -AP podría interaccionar de manera específica y saturable con un sitio de fijación sobre la superficie de la célula. Esta interacción, favorecería una disociación rápida del ligando de la AP, mediante un cambio conformacional en la molécula de AP, capaz de alterar la asociación entre ambos.

En dicha forma, el ligando libre entraría a la célula para lo cual su mecanismo particular de captación sería determinante de la velocidad con que se realiza el proceso. Por su parte, la molécula de AP, se disociaría del receptor y volvería a la circulación (134).

Se han realizado estudios cinéticos con distintas sustancias como bilirrubina y BSF (135), taurocolato (136) y ácidos grasos de cadena larga (137). Además se ha demostrado que la fijación de ^{125}I -AP a la superficie del hepatocito (138) es saturable y reversible. Los estudios mencionados han permitido reunir considerable evidencia en favor de esta teoría, aunque aún resta confirmar la naturaleza y posible regulación de los sitios de fijación propuestos.

4.3 Fijación a proteínas citosólicas hepáticas

Una vez dentro del hepatocito, algunos aniones orgánicos son fijados a proteínas citosólicas como las denominadas proteína Y y Z (139). La proteína Y (o proteína fijadora de aniones orgánicos) fue aislada por distintos investigadores y recibió diferentes nombres de acuerdo con la función estudiada. Así ha sido denominada Δ^5 -3-cetosteroide isomerasa (140), proteína fijadora de metabolitos de cortisol (141), proteína fijadora de azocarcinógenos I (142), hasta que finalmente se le dió el nombre de Ligandina (141). Se trata de una proteína básica de 46000 D que representa aproximadamente el 5% de las proteínas solubles de hígado humano y de rata y el 2% de las proteínas solubles de riñón y de mucosa intestinal (143). La Ligandina tiene las siguientes propiedades:

- fija en forma no covalente bilirrubina y otros aniones orgánicos, tales como colorantes, drogas y agentes colecistográficos, con constantes de asociación cuyo rango varía de 10^7 M^{-1} (bilirrubina) a 10^4 M^{-1} (penicilina) (144).
- fija en forma covalente varios carcinógenos policíclicos activados "in vivo".
- es la GSH s-transferasa más importante en hígado humano y de rata (145). Cataliza la transferencia de GSH a sustratos electrofílicos para producir conjugados de GSH. Este es el paso inicial en la formación de ác. mercaptúricos, que es la mayor vía de detoxificación no oxidativa. La ligandina es idéntica a la GSH s-transferasa B(146).

Sobre la base de su actividad catalítica, Jakoby estimó que la ligandina representa aproximadamente el 50 % de la actividad GSH s-transferasa. Sobre la base de su inmunoreactividad utilizando IgG antiligandina, se determinó que la GSH s-transferasa B representa aproximadamente el 80 % de todas las GSH s-transferasas de hígado de rata (147).

El papel fisiológico de esta proteína sin embargo aún no está totalmente aclarada. Se ha propuesto que la fijación intracelular podría facilitar el acceso de solutos a enzimas que intervienen en la conjugación o al sistema de transporte canalicular. También podría ejercer un efecto protector para la célula, contra sustancias tóxicas, ya que por medio de la fijación, tóxicos potenciales, podrían ser excluidos de sitios claves para la supervivencia celular. Se ha podido comprobar que la ligandina "in vitro" protege a las mitocondrias del efecto tóxico de la Bilirrubina (148), pudiendo actuar como una albúmina intracelular.

También se ha postulado que la ligandina participaría en la transferencia selectiva de aniones orgánicos del plasma al hígado (135). Dicha postulación se ha basado en evidencias como las siguientes: la inducción de la ligandina por la administración de fenobarbital, aumenta la velocidad de desaparición plasmática de colorantes y también aumenta la cantidad de los mismos fijados a dicha proteína (149).

Además la ligandina está ausente en el hígado de elasmobranquios, que no poseen la capacidad de transferir selectivamente bilirru

bina y otros aniones orgánicos al hígado (150). En anfibios, la metamorfosis es acompañada por la aparición de ligandina y el desarrollo concomitante de los mecanismos de captación hepática (150).

Sin embargo ninguno de los estudios mencionados establece cuantitativamente el papel de la ligandina en la captación hepática. Por otra parte se ha demostrado que ni la fijación, ni la actividad catalítica son esenciales para el transporte de BSF, ya que ciertas especies son capaces de concentrar el colorante en hígado (a una velocidad menor que los mamíferos), a pesar de que no contienen ligandina (151-152). Los homogenados hepáticos de dichas especies tienen también capacidad para fijar el colorante.

Recientes estudios han demostrado que la transferencia de aniones orgánicos del plasma al hígado es un proceso bidireccional (54). Una proporción mayor entra a la célula en cada pasaje circulatorio y una porción menor sale cada vez. Se ha postulado que la ligandina no modifica la velocidad de influjo o entrada a la célula, sino la velocidad de salida o eflujo. Para demostrar esta teoría, se adaptó la técnica de dilución de indicadores múltiples para poder estimar las constantes de influjo y eflujo de bilirrubina y BSF en hígado aislado y perfundido de rata. En dichos experimentos se utilizaron animales controles, pretratados con fenobarbital y/o tiroidectomizados (153). El fundamento para esto último es que el fenobarbital aumenta la conc. hepática de ligandina por inducción y la tiroidectomía lo hace por estabilización de la proteína. Combinando ambos procedimientos se puede aumentar considerablemente la conc. de ligandina que llega a representar un 15 % de las pro-

teínas solubles del citosol hepático.

Se pudo observar que en las ratas tratadas con fenobarbital, el influjo de bilirrubina no sufre modificaciones mientras que el eflujo disminuye.

En ratas tiroidectomizadas se observaron cambios similares pero menos marcados. La mayor disminución del eflujo se presenta en los animales tiroidectomizados después del tratamiento con fenobarbital.

No se observó una correlación entre conc. de ligandina y velocidad de influjo, en cambio se pudo demostrar una excelente corelación negativa entre conc. de ligandina y velocidad de eflujo de bilirrubina.

Los resultados descriptos han permitido sugerir que la ligandina regularía la transferencia de bilirrubina y otros aniones del plasma al hígado, a través de la disminución del eflujo de la célula al plasma, favoreciendo por ello el proceso de captación.

Cabe destacar que algunos autores han sugerido que esta proteína juega un papel más importante en la excreción biliar de aniones como la BSF debido a sus propiedades catalíticas, más que a las de fijación (154 - 155).

4.4 Conjugación y excreción biliar

Muchos aniones orgánicos son conjugados con grupos polares como ác. glucurónico, GSH, sulfato, aminoácidos, como requisito previo a su excreción biliar.

No se sabe si la excreción preferencial de la forma conjugada refleja una mayor afinidad del sistema excretor por la misma. La BSF es conjugada con GSH (123), un tripéptido constituido

por los aminoácidos glutámico, cisteína y glicina. El grupo de enzimas denominado GSH s-transferasas (descrito en C. III= 2.5) cataliza la formación de un enlace tioéter entre la BSF y el -SH de la cisteína. También se ha demostrado la existencia de conjugados de BSF con cisteinilglicina y con cisteína, que serían productos de la degradación metabólica del GSH por acción de las enzimas pertenecientes a la vía de la síntesis de ác. mercaptúricos (156).

Para la bilirrubina se han descrito una variedad de productos de su conjugación con ác. glucurónico, sulfato y azúcares au que con un neto predominio del primero (157-158). El transporte excretor máximo (Tm) para bilirrubina es especie dependiente y varía de 39 µg/min/kg en el hombre (159) a 610 µg/min/kg en ratas (160). Se han presentado evidencias de que las diferencias observadas en el Tm se deben a la capacidad de conjugación (actividad glucuronil transferasa) hepática de las distintas especies consideradas (157). Ello explica que la bilirrubina (a diferencia de BSF) puede ser excretada por vía biliar solo en la forma conjugada.

El VIC a diferencia de bilirrubina y BSF puede ser excretado en la bilis sin conjugación previa. Esta característica es de interés para el estudio de la función hepática excretoria. La DBSF tiene también la característica de ser excretada en bilis de rata sin conjugación (124), aunque en el conejo y el perro, se ha descrito biotransformación de dicho anión (161).

El estudio de la secreción hepática se ha visto dificultado por la inexistencia de técnicas que permitan resolver los siguientes problemas:

- obtener muestras de bilis directamente del canalículo biliar

- medir la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana canalicular
- determinar la actividad química (conc. al estado libre) de aniones orgánicos en la célula hepática o en la bilis canalicular

A partir de observaciones indirectas se ha sugerido que la excreción de aniones orgánicos es un proceso mediado por transportadores. Las evidencias que apoyan esta teoría son las siguientes:

- la excreción de aniones orgánicos es saturable (162 - 163), habiéndose demostrado T_m para BSF, DBSF, VIC y bilirrubina. Además se ha verificado que no hay relación lineal entre la conc. intracelular de BSF y su velocidad de excreción biliar (164).
- diferentes aniones orgánicos compiten para la excreción biliar (162 - 163).

Otra evidencia es que el conjugado de BSF - GSH es excretado con una eficiencia dos veces superior a la del compuesto no conjugado (165). Debido a ello se ha sugerido un mecanismo de transporte mediado, ya que si la excreción se produjera por difusión pasiva se debería esperar que el conjugado más polar e hidrofílico difundiera más lentamente que el compuesto no conjugado, más lipofílico.

Otro problema a definir, es si la excreción de aniones orgánicos es intrínsecamente concentrativa o equilibrativa. Las altas conc. de estas sustancias obtenidas en bilis respecto de las conc. en plasma y las estimadas en hígado, han sido

consideradas una expresión del fenómeno concentrativo. Sin embargo algunos investigadores han demostrado que los aniones orgánicos tienden a autoagregarse y además asociarse con monómeros y micelas de AB, con micelas mixtas y con proteínas biliares (166-167). La resultante sería que la conc. efectiva de dichos aniones en la bilis sería mucho menor que la determinada. Si además existiera una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana canalicular (interior de la célula negativa), se favorecería aún más la excreción, con lo cual el mecanismo sería equilibrativo, más que concentrativo.

Cabe destacar que la asociación de los aniones con monómeros o micelas de AB, y/o con micelas mixtas, también representa una posible explicación para el aumento del T_m de ciertos aniones orgánicos provocado por la infusión de AB (166).

Sin embargo las posibles implicaciones fisiológicas de la formación de agregados por aniones orgánicos y AB permanece aún en el terreno de la especulación, debido a ciertos hechos experimentales que son consistentes con una interacción entre aniones orgánicos y micelas mixtas (119 - 120) (166 = 168).

CAPITULO II

Objetivos y Plan de trabajo

Este trabajo ha tenido como objetivo investigar la influencia de la carencia proteica en la dieta sobre el transporte hepático de aniones orgánicos.

Se eligió como modelo experimental la rata adulta, a la que se administró una dieta carente de proteínas por el término de 7 días (dicho período de tiempo fue seleccionado por no observar se durante el mismo alteraciones histológicas hepáticas).

Para cumplir con el objetivo propuesto se utilizaron dos aniones orgánicos modelos, la bromosulfoftaleína (BSF) y la dibromosulfoftaleína (DBSF). El primero de ellos sufre un proceso de conjugación previamente a su excreción biliar; el segundo no es biotransformado en su paso a través del hígado.

En la primera parte se estudió la influencia de la carencia proteica en la dieta sobre distintos parámetros bioquímicos y fisiológicos, capaces de afectar el transporte hepático de aniones orgánicos, tales como la distribución de agua en el hígado número y tamaño celular, concentración de proteínas hepáticas, actividades enzimáticas y características de la secreción biliar. En la segunda parte se investigó el efecto de la dieta aproteica sobre las cinéticas de desaparición plasmática y de excreción biliar de BSF y DBSF.

CAPITULO III

Material y Métodos

1 Animales de experimentación y preparación de dietas

Animales de experimentación : los experimentos fueron realizados en ratas Wistar machos adultas, cuyo peso osciló entre 270 y 300 g. Estos animales fueron alimentados durante 3 semanas con una dieta sintética normal (DN), después de lo cual recibieron una dieta carente de proteínas (DA) por el término de 7 días . Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimentos y fueron mantenidos en jaulas en grupos de dos en un ambiente de temperatura (24°C) y luz (6 AM a 6 PM) controlados. Con el objeto de minimizar la influencia de variaciones circadianas, todos los experimentos fueron concluidos entre 10 y 11 AM.

Preparación de dietas : las dietas sintéticas fueron preparadas en nuestro laboratorio y la composición de las mismas fue la siguiente:

Dieta Normal (DN)

Caseína ¹	27 %
Almidón de maíz	59 %
Aceite de Maíz	10 %
Sales Minerales	4 %

Dieta Aprroteica (DA)

Celulosa alfa ²	15 %
Almidón de Maíz	70 %
Aceite de Maíz	10 %
Aceite de hígado de bacalao . . .	1 %
Sales Minerales	4 %

²Alphacel ICN Pharmaceuticals Inc. USA

¹ Valor biológico 80 %

La mezcla de sales incorporada fue la de Jones & Foster (169) cuya composición es la siguiente:

NaCl	13.93 %
KH ₂ PO ₄	38.89 %
MgSO ₄	5.73 %
CaCO ₃	38.14 %
FeSO ₄ .7H ₂ O	2.71 %
KI	0.08 %
MnSO ₄ .2H ₂ O	0.44 %
ZnCl ₂	0.03 %
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05 %
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.002 %

Ambas dietas fueron suplementadas con una mezcla de vitaminas en la siguiente proporción:

Cloruro de Colina	1.5 g/kg de dieta
Inositol	1.0 "
Pantotenato de Calcio	20.0 mg/kg de dieta
Clorhidrato de Piridoxina	2.5 "
Clorhidrato de Tiamina	2.0 "
Ac. p-Aminobenzoico	2.0 "
Menadiona	2.0 "
Ac. Fólico	2.0 "
Niacina	15.0 "
Riboflavina	3.0 "
Biotina	0.2 "

Los valores calóricos calculados y corregidos³ para los datos

fueron:

$$DN = 3.92 \text{ Cal/g}$$

$$DA = 3.60 \text{ Cal/g}$$

dicho cálculo permitió establecer que la DA fue ligeramente hipocalórica respecto de la DN.

$$^3 \text{Rendimiento calórico DN (Cal/g)} = (\text{Cal/g} \times 0.95) - (\%N \times 0.075)$$

$$\text{Rendimiento calórico DA (Cal/g)} = \text{Cal/g} \times 0.95$$

2. Desarrollo Experimental

2.1. Análisis del efecto de la dieta aprroteica (DA)

2.1.1. Estudio del consumo de dieta:

Se ha descrito que animales alimentados con una dieta de bajo contenido proteico consumen menos alimento que aquellos que reciben una dieta estandar (2-15). Esto sumaría a la deficiencia proteica provocada, una deficiencia calórica, lo cual complicaría el análisis de los efectos propios de la carencia proteica en la dieta. Algunos investigadores (38), para disminuir este fenómeno han utilizado controles apareados que reciben la misma cantidad de alimento que el consumido por los animales alimentados con dieta deficiente en proteínas (siendo ambas dietas isocalóricas). Por varias razones este método no es el correcto, puesto que supone someter a los controles a un ayuno crónico, ya que éstos reciben menos alimento del que realmente deberían consumir. Como consecuencia, se produce una elevación de los niveles plasmáticos de corticosteroides lo cual puede influenciar la síntesis de AP (171).

Boyd (2) y Campana (15), han sugerido que si bien los animales que reciben dietas deficientes en proteínas consumen menos alimento que los controles, el consumo expresado por unidad de peso corporal se mantiene constante dentro de un amplio rango

de composición proteica de la dieta.

Ndika (172) ha considerado que el método más apropiado para determinar el consumo de alimento en experimentos del tipo men-cionado es relacionarlo con el peso corporal.

Como nuestro interés ha sido considerar solamente los efectos de la carencia proteica, se decidió la realización de experi-mentos para estimar el consumo de alimento y verificar de esta manera si la deficiencia provocada fue solamente proteica.

Para ello se utilizó un grupo de 20 ratas adultas de un peso que osciló entre 250 y 300 g, las que fueron alimentadas durante 3 semanas con DN. Luego se separaron en dos grupos, uno de los cuales continuó siendo alimentado con DN por el término de 7 días y el otro grupo fue alimentado con DA durante el mismo período de tiempo. DN y DA fueron dietas en polvo de caracte-rísticas similares.

Los animales fueron colocados en jaulas individuales y recibieron agua y alimento ad-libitum. Para el suministro de alimento se utilizó un comedero especialmente diseñado (173) para estudiar el consumo de la dieta en polvo e impedir que el animal arroje alimento fuera del mismo. Se determinó diariamente el peso corporal de cada animal y el consumo de alimento en las citadas condiciones.

2.1.2 Efecto de la DA sobre el peso corporal (PC), peso de hí- gado (PH), proteínas totales hepáticas (PTH) y glutatión hepá- tico (GSH).

El PC, la variación del PC durante el período de carencia proteica y el PH fueron los parámetros rutinariamente utilizados para verificar el efecto de la DA. Con el mismo objetivo se de

terminaron las PTH.

En todos los experimentos desarrollados con aniones orgánicos fue determinado el contenido hepático de GSH. Se eligió la estimación de este tripéptido debido a que interviene en la metabolización de BSF y es además un excelente marcador de la privación proteica.

El hígado es el tejido con mayor concentración de GSH (7 mM) (174) el cual tiene un recambio muy rápido ($t_{1/2} = 1.7$ y 28.5 h) (175) y está sometido a variaciones circadianas, obteniéndose los valores más altos a la mañana, disminuyendo a un 75 % en horas de la noche (176). Se ha demostrado que los niveles de GSH hepático disminuyen abruptamente cuando se administra una dieta carente de proteínas pudiendo ser reducidos a un 40 % del nivel original con sólo un día de dieta. Períodos largos de administración de dietas hipoproteicas reducen los niveles a un 20 % pudiendo producirse el desarrollo ulterior de lesiones necróticas (177).

Otros agentes como el "stress" (frío, calor, ruidos) y ciertas drogas como el dietil maleato, acetaminofeno, etc., también producen depleción del GSH hepático.

Son numerosas las funciones que tiene dicho tripéptido (178), como protector de los grupos - SH de enzimas, como sustrato de reacciones enzimáticas, para la detoxificación de xenobióticos, etc. En nuestro caso, fue necesario determinar el efecto de la DA sobre los niveles de GSH hepático, para dilucidar la impor-tancia del proceso de conjugación en el transporte hepático de BSF, en el cual el mismo es utilizado.

2.1.3. Efecto de la DA sobre las concentraciones plasmáticas de

albúmina (AP), proteínas totales (PTP) y sobre el volumen plasmático (VP)

Las concentraciones plasmáticas de AP y PTP fueron determinadas rutinariamente como parámetros para control del efecto de la DA. Además se obtuvieron muestras de plasma de los animales en estudio con el objeto de estimar "in vitro" el efecto de la DA sobre la fijación de BSF y DBSF a las PTP.

El VP fue determinado a fin de aclarar posibles implicancias en el análisis farmacocinético de los aniones utilizados y también para describir en forma más completa el modelo utilizado.

2.1.4 Efecto de la DA sobre la distribución de agua en el hígado

La deficiencia de proteínas en la dieta produce cambios bioquímicos y fisiológicos, entre ellos alteraciones en el balance de líquidos y electrolitos (30) (179) y en los valores de agua corporal habiéndose descrito una moderada retención de agua (180). Dichos cambios tienen la característica de que los animales utilizados para esos experimentos no desarrollan un edema franco como en el síndrome Kwashiorkor en niños (181). También se ha observado que en animales jóvenes en crecimiento alimentados con dietas carentes de proteínas por largos periodos, se produce una marcada retención de agua total, con aumento del agua extracelular (181).

Las diferencias que presenta nuestro trabajo con respecto a las investigaciones descriptas en la literatura son dos:

- 1) se han utilizado animales adultos
- 2) el tiempo de carencia proteica es corto.

Por ello se decidió estudiar el efecto de la DA sobre la distribución de agua en el hígado, órgano sobre el cual se han centralizado las presentes investigaciones. Los experimentos se desarrollaron utilizando el modelo de cortes de hígado o "slices".

2.1.5. Efecto de la DA sobre el número, tamaño y contenido proteico de las células hepáticas

Se ha demostrado que el contenido de ADN del núcleo diploide en interfase es una cantidad constante para todas las células de un animal o especie determinada y varía dentro de límites muy estrechos (182 - 183).

En el hígado la cantidad de ADN es una 30 % mayor que en otros órganos y depende de las proporciones relativas de células diploides, tetra u octa ploides. En el tejido adulto, en el que las mitosis son infrecuentes, el contenido de ADN/núcleo no debe ser afectado por cualquier tratamiento que no conduzca a multiplicación o destrucción de la célula. En la rata adulta el contenido promedio de ADN/núcleo no varía con el sexo, cepa o peso corporal (182).

Existe una controversia con respecto al contenido de ADN de las células hepáticas en condiciones de deficiencia proteica.

Algunos investigadores utilizando técnicas histoquímicas (184) y homogenados hepáticos totales (185), demostraron un ligero aumento de la conc. de ADN en ratas jóvenes alimentadas con DA, mientras que otros autores (182)(186) han descrito que no existe un aumento considerable de ADN en los hepatocitos de los animales alimentados con DA.

Además se ha descrito que la DA no afecta el número de células

del hígado, sino que disminuye la masa promedio de las mismas (182).

Enesco y Leblond (187) basados en la premisa de que el ADN está localizado dentro del núcleo y que es una constante dentro del núcleo diploide, han estimado el número de núcleos usando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ núcleos (x } 10^6) = \frac{\text{ADN total del órgano (mg) x } 10^3}{6.2}$$

donde 6.2 es la cantidad aproximada de ADN en pg (10^{-12} g) por núcleo de célula diploide de rata. Esta fórmula es utilizada para expresar el número de células.

El contenido proteico de la célula es estimado por la siguiente fórmula:

$$\text{proteína/cel. (ng)} = \frac{\text{proteínas totales del órgano (g) x } 10^3}{\text{N}^\circ \text{ células (x } 10^3)}$$

El tamaño celular fue determinado en preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina, para lo cual se utilizó la técnica descrita por Weibel y col. (188).

2.2 Estudio de la secreción biliar

2.1.1. Determinación del FB basal

La bilis fue recolectada en tubos pre-pesados, cada 15 min. durante 45 min. La recolección comenzó después de 15 min. de finalizada la cateterización del colédoco. El FB se determinó por pesada en cada período de 15 min. y se expresó en $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ hígado. Los valores obtenidos en cada animal son los promedios de esas tres determinaciones. No se realizó corrección por gravedad específica. El FB así estimado se denominó FB basal.

Para compensar la pérdida de agua y electrolitos, una infusión continua de NaCl al 0.9 % fue administrada a través de la vena femoral a una velocidad de 0.5 ml/h (Bomba de infusión Unita Braun Melsungen). Inmediatamente después de la recolección, los tubos con bilis fueron pesados y almacenados a -25°C (189) hasta ser utilizados.

2.2.2. Análisis de la composición de la Bilis

En las muestras de bilis recogidas según c.III- 2.2.1., se determinaron las concentraciones de AB, CO, FL y PTB; además se determinó la osmolaridad (Advanced Osmometer, USA). Las conc. se expresaron como el valor promedio de las tres determinaciones obtenidas en el período basal. Las velocidades de excreción biliar de dichos componentes, fueron calculadas como el producto del FB por la conc. de los mismos.

Se calculó también el Índice de Saturación de CO de la bilis, que es la relación entre el porcentaje real de CO en una mues

tra dada de bilis y la solubilidad máxima posible del CO en la misma. Dicho índice fue calculado por el Método de Thomas (190) eligiéndose como límite de solubilidad del CO, el establecido por Holzbach (191). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y = 3.082 - 0.804 X + 117.05 X^2 - 204.94 X^3$$

donde X representa la relación entre la conc. molar de FL y la suma de las conc. molares de FL y AB, $\left(\frac{FL}{FL + AB} \right)$

Y representa el porcentaje de CO a saturación en función de la relación FL/FL + AB.

El Índice de Saturación de CO es igual a la relación entre el porcentaje de CO medido y el porcentaje de saturación de CO calculado (190).

2.2.3 Estudio de la Fracción del FB independiente de Acidos Biliares (FIAB)

El FIAB fue estimado en un grupo de 6 ratas alimentadas con DN y 5 ratas alimentadas con DA; se calculó por extrapolación de la recta de regresión, obtenida luego de correlacionar el FB y la velocidad de excreción biliar de AB, a cero de excreción de AB (192 - 193).

El procedimiento seguido fue el siguiente: en esos animales una vez finalizado el período de FB basal, que correspondió a los primeros 15 min. de recolección de bilis, se administró una solución de taurocolato de Sodio (TNa) disuelta en NaCl al 0.9%. Dicha solución fue infundida por vía intravenosa a una velocidad de 300 nmoles/min/100 g peso en un volumen de 6.25 µl/min durante 90 min. Se recogieron muestras de bilis cada 15 min. y se midió el FB y la conc. de AB en las 3 últimas

muestras donde el FB fue más estable. La velocidad de excreción de AB se expresó en nmoles/min/g/Híg.

2.2.4 Estimación del FB Canalicular

En otro grupo de animales se determinó la depuración biliar de eritritol y la relación de concentraciones del mismo en bilis y plasma con el objeto de estimar el FB canalicular (115)(194) Se administró ^{14}C -eritritol (100 mCi/nmol) (The Radiochemical Centre, Amersham), en una dosis única intravenosa de 2 μCi en un volumen de 0.5 ml de NaCl al 0.9%. Los estudios se efectuaron sin ligar los pedículos renales (195).

Se recogieron muestras de bilis entre 15-45, 45-75 y 75-105 min. después de la inyección de eritritol; se obtuvieron además muestras de sangre (120 μl) de arteria femoral, en el tiempo medio de cada período de recolección biliar.

La depuración de ^{14}C -eritritol fue calculada como el producto del FB por la relación bilis plasma de la actividad de ^{14}C y se expresó como $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ híg.

Para la medición de la conc. de ^{14}C -eritritol, se mezclaron 100 μl de bilis o 50 μl de plasma con sol. 1 N de Hyamina (10 x) en metanol y con 10 ml de líquido de centelleo¹. La radioactividad de ^{14}C fue medida en una espectrómetro de centelleo líquido Packard 2001. Se hizo corrección por "quenching" utilizando ^{14}C -Acido Benzoico como standar interno.

La relación de conc. de eritritol bilis/plasma fue calculada para los tres períodos de recolección y se utilizó la media de esos tres períodos.

¹ 4 g/lit de 2,5-difeniloxazol (POPOP), 100 mg/lit de 1,4-bis {2-(4 metil-5-feniloxazolil)}benceno (PPO) disueltos en 1 lit de benceno.

2.3 Análisis Farmacocinético de Bromosulfoftaleína (BSF) y Dibromosulfoftaleína (DBSF)

2.3.1. Consideraciones teóricas

Se ha demostrado que la captación hepática de aniones orgánicos como BSF o DBSF, puede ser estimada de los datos de desaparición plasmática de dichos colorantes (131).

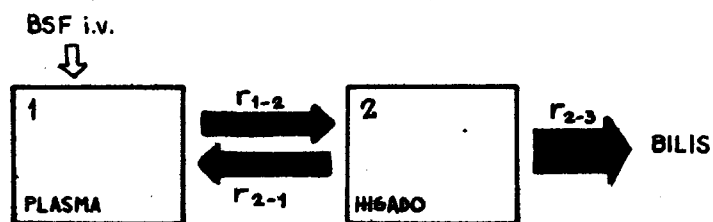
A fin de clarificar el efecto de la DA sobre la captación hepática "in vivo" se aplicó un modelo farmacocinético convencional complementado con un estudio de la cinética de excreción biliar del colorante (estudio que se describe en el punto 2.4).

Se ha descrito que luego de una inyección i.v. de una dosis única de BSF o DBSF en ratas, la cinética de desaparición plasmática es biexponencial (196)(197) y puede ser estudiada aplicando el modelo de análisis compartamental propuesto por Richards (196). Este modelo consiste en dos compartimientos (central y periférico) con eliminación de la droga del compartimiento periférico.

En este modelo el plasma es el compartimiento central y el hígado el periférico (Fig. 4). Esta suposición es razonable debido a que los aniones en estudio tienen las siguientes características:

- a) pequeña distribución extravascular (127)
- b) están fuertemente unidos a proteínas (125)(126) plasmáticas
- c) son casi totalmente eliminados por el hígado (126)(127)

Fig. 4 : modelo de Richards (196)



La utilidad de este modelo es que mediante adecuados cálculos pueden ser estimadas constantes de velocidades de transferencia de aniones entre esos compartimientos, siendo:

r_{12} = constante de velocidad de transferencia de colorante de plasma a hígado.

r_{23} = constante de velocidad de transferencia de colorante de hígado a bilis.

r_{21} = constante de velocidad de transferencia de colorante de hígado a plasma.

Estas constantes junto con datos complementarios sobre la excreción biliar y otros parámetros farmacocinéticos, constituyen un excelente modelo para el estudio "in vivo" de la captación hepática de BSF o DBSF.

Para realizar el análisis compartamental de la desaparición plasmática de los aniones utilizada fue necesario obtener la función bioexponencial teórica de mejor ajuste a los datos experimentales.

La ecuación que describe la desaparición plasmática de los aniones utilizados es la siguiente:

$$C_t = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

siendo

C_t = concentración plasmática del colorante al tiempo t

$A \cdot e^{-\alpha t}$ = fase rápida de la desaparición plasmática, también llamada fase "alfa".

$B \cdot e^{-\beta t}$ = fase lenta de la desapar. plasmática o fase "beta".

A y B = valores de concentración extrapolados a tiempo 0 para las fases rápida y lenta.

α y β = pendientes de las fases rápida y lenta.

En primer lugar se debió estimar el tiempo de duración de cada fase en ambos grupos de animales. Se calculó la curva semilogarítmica promedio para cada grupo experimental y se aplicó un análisis de linealidad con el que se determinó la extensión de cada fase.

Luego se realizó un análisis de la regresión de los datos de conc/tiempo, para lo cual se aplicó un programa para microcomputador TI-59 desarrollado por Kniedsen-Kudsk (198).

Se obtuvo así la función teórica que mejor se ajustó a los datos experimentales, calculándose entonces los parámetros A, B, α y β que fueron utilizados para el análisis posterior.

2.3.2 Parámetros Farmacocinéticos

$$1) \quad r_{12} = \frac{\alpha A + \beta B}{A + B} \quad (\text{min}^{-1})$$

$$2) \quad r_{23} = \frac{\alpha}{r_{12}} \beta \quad (\text{min}^{-1})$$

$$3) \quad r_{21} = \alpha + \beta - (r_{12} + r_{23}) \quad (\text{min}^{-1})$$

4) Vc Volumen de distribución aparente

$$Vc = \frac{\text{DOSIS}}{A + B} \cdot \frac{100}{\text{peso rata}} \quad (\text{ml}/100 \text{ g rata})$$

5) AUC Area bajo la curva

$$AUC = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} \quad (\mu\text{g droga/ml/min})$$

AUC es el área bajo la curva de conc./tiempo estimada de tiempo 0 a tiempo ∞ .

6) Clp "Clearance" plasmático

$$Clp = \frac{\text{DOSIS}}{\text{AUC}} \quad (\text{ml/min})$$

7) t_{1/2} Tiempo de vida media de cada fase

$$t_{1/2} \alpha = \frac{0.693}{\alpha} \quad (\text{min}^{-1})$$

$$t_{1/2} \beta = \frac{0.693}{\beta} \quad (\text{min}^{-1})$$

2.3.3. Técnica Experimental

Se utilizaron animales en las condiciones dietarias ya citadas. Todos los animales fueron anestesiados con Pentobarbital Sódico (50 mg/kg i.p.). Se cateterizó vena y arteria femoral (Catéter PE-50 y PE-10 respectivamente) y el colédoco (Cat. PE-10). En todos los experimentos se mantuvo la temperatura rectal a 38.0 ± 0.5 °C, con una lámpara infrarroja adaptada a un regulador de temperatura con el objeto de prevenir variaciones en el flujo biliar (199).

Antes de comenzar los experimentos se inyectó por vena femoral una dosis de heparina de 50 U/100 g de peso en un volumen de 0.5 ml de sol. fisiológica. Después de 5 min., se inyectó por la misma vía una dosis única de BSF (6 ml/100 g peso en un volumen de aproximadamente 0.5 ml) o de DBSF (4.9 mg/100 g peso en aproximadamente 0.5 ml de volumen). Inmediatamente se tomaron muestras de sangre del catéter de arteria femoral a los tiempos 1,2,3,4,5,6,7,8,10,14,18,22,26,30 y 40 min. después de finalizada la inyección del colorante.

El volumen de cada muestra de sangre no excedió los 40 μ l.

El tiempo requerido para la inyección del colorante osciló entre 6 y 10 segundos. Las concentraciones de los colorantes fueron determinadas de acuerdo con las técnicas descriptas en el punto C III 2.10.7.

2.4 Análisis de la excreción biliar de BSF y DBSF

2.4.1. Velocidad de excreción biliar de BSF y DBSF (VEB)

Los estudios de la VEB de los aniones utilizados fueron realizi

zados en el mismo grupo de animales utilizados para los análisis farmacocinéticos (C III 2.3). En ellos se recogió bilis en frascos pre-pesados en la forma de una muestra basal durante 15 min previos a la inyección del colorante y 4 muestras de 15 min cada una, posteriores a la administración del mismo. Las concentraciones de BSF y DBSF fueron determinadas en bilis de acuerdo con la técnica descrita en (C III 2.10.7). El FB fue determinado por gravimetría. La velocidad de excreción biliar de BSF o DBSF fue calculada como el producto del FB por la conc. biliar del colorante para cada tiempo estudiado. Se calculó también el porcentaje de la dosis excretado al cabo de 60 min.

2.4.2 Análisis de los conjugados de BSF en bilis

Con las muestras de bilis obtenidas, se hizo un "pool" para cada animal estudiado y alícuotas del mismo fueron utilizadas para analizar las proporciones de colorante conjugado en bilis, aplicando para ello la técnica cromatográfica descrita en el punto (C III 2.10.9).

2.5. Actividad Glutation s-transferasa hepática (GST)

2.5.1. Consideraciones generales

Las enzimas denominadas GST (EC - 2.5.1.18) constituyen un grupo de proteínas multifuncionales que juegan un papel fisiológico en la iniciación de la detoxificación de xenobióticos (200).

Estas proteínas catalizan la conjugación entre GSH y un amplio

rango de segundos sustratos tales como agentes alquilantes, compuestos farmacológicamente activos, etc.

La reacción se produce entre el grupo -SH del GSH, que actúa como nucleófilo y reactivos electrofílicos hidrofóbicos, dando productos más solubles en agua, fácilmente excretables y disminuyendo así su reactividad química. Ello implica que cualquier compuesto que posea un átomo suficientemente electrofílico puede ser atacado, habiéndose demostrado reacciones con átomos de C,S,N y O (201).

Los conjugados con GSH son posteriormente metabolizados, produciéndose la separación de los residuos glutamato y glicina, seguida por la acetilación del grupo amino del residuo cisteinil para dar el producto final que es un ácido mercaptúrico (156).

Estas enzimas además de actividad catalítica, tienen una segunda función que es la de fijar no covalentemente una amplia variedad de ligandos (202) que no son sustratos para conjugación, por lo cual también han sido llamados ligandinas. Debido a la elevada concentración en hígado y la alta afinidad para ligandos como ácido litocólico, cortisol, bilirrubina, las GST tienen una importante función en el transporte intracelular (203). Estas enzimas son muy abundantes en hígado de rata donde representan aproximadamente el 5 % de las proteínas totales solubles del citosol; de dicho material se han aislado 6 enzimas, llamadas GST - AA,A,B,C,E y M (201). Con el objeto de estimar las actividades GST individuales en preparaciones crudas de hígado de rata, se han clasificado las actividades enzimáticas sobre la base del esqueleto carbonado de la molécula electrofílica portadora del grupo involucrado en

la reacción (156). Por ello se utilizan los términos aril, alquil, alqueno y epoxidetransferasa.

La BSF es un sustrato conjugado con GSH por las GST, por lo cual ha sido utilizado para estimar actividades glutation-s-ariltransferasa. Cabe destacar que el sustrato clásico utilizado para la actividad antes citada es el 1-Cl-2,4 dinitrobenceno. DBSF es un ligando que es fijado por las GST, pero no conjugado (204).

Para estudiar el efecto de la DA sobre la actividad GST hepática hemos utilizado dos sustratos distintos aplicados en de terminaciones separadas:

Met.1 : sustratos GSH y 1-Cl-2,4 dinitrobenceno de acuerdo a la técnica propuesta por Habig y col.(205).

Met.2 : sustratos GSH y BSF de acuerdo a la técnica descrita por Combes y col. (206).

2.5.2 Técnica experimental

De un grupo de animales tratados en las condiciones dietarias ya descritas, se extrajeron los hígados bajo anestesia, previa perfusión "in situ" de los mismos con sol. fisiológica fría; se prepararon homogenados de la siguiente manera:

Met.1 : se preparó un homogenado al 25 % (p/v) en "buffer" fosfato de potasio 0.01 M, sucrosa 0.25 M, pH 7.4.

Met.2 : se preparó un homogenado al 25 % (p/v) en "buffer" pirofosfato de sodio 0.1 M, pH 8.2 .

Estos homogenados fueron centrifugados a 10000 g durante 30 min. a 0°C; luego de descartar los "pellets", los sobrenadan

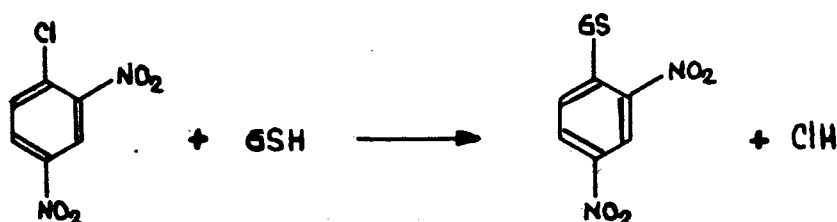
tes fueron centrifugados a 105000 g durante 1 hora a 0°C en una ultracentrífuga Beckman Spinco Mod.L.

Los sobrenadantes preparados por el Met.2 fueron dializados contra "buffer" pirofosfato durante 24 hs, a 4°C, utilizando para ello una membrana Visking 10/32. Las concentraciones de proteínas totales fueron determinadas utilizando el Mét. del biuret-desoxicolato citado en el punto 2.10.1. Todos los sobrenadantes fueron conservados a -20°C hasta ser utilizados.

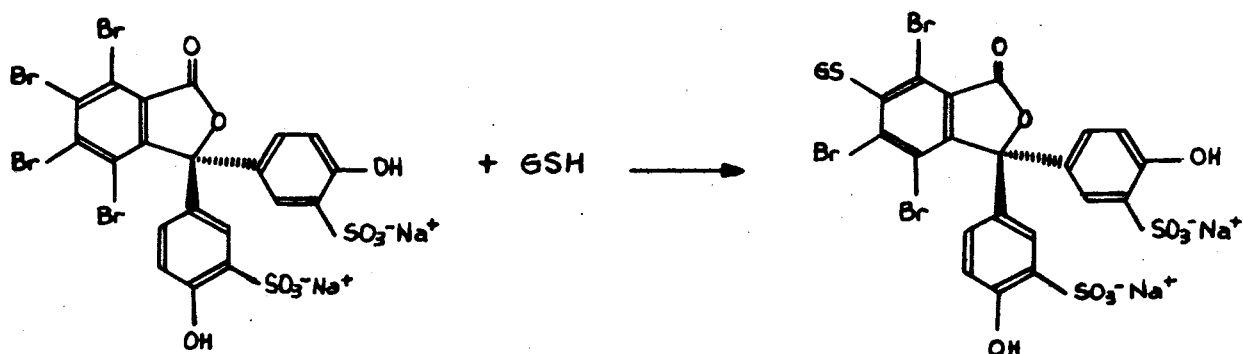
Fundamento de los métodos empleados

Las GST catalizan la reacción del grupo tiol del GSH con una amplia variedad de sustratos, para formar tioéteres.

Para el 1-Cl-2,4 dinitrobeneno (CDNB) :



Para la BSF :



Condiciones para la estimación de la actividad GST utilizando el Mét. 1

La actividad se estimó monitoreando la variación de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Varian 340 S de doble haz. Para cada determinación se preparó simultáneamente un ensayo sin enzima como control de reacción entre sustratos. Todos los ensayos fueron realizados en las siguientes condiciones:

- (a) "Buffer" fosfato de potasio 0.1 M pH 6.5
- (b) GSH 1 mM
- (c) CDNB 1 mM, disuelto en etanol; la conc. de etanol en el ensayo fue menor del 4 % .
- (d) Temperatura 25 °C
- (e) Volumen final 3 ml

Mét. 2

Como en el caso anterior, se midió el cambio de absorbancia en función del tiempo, pero a 330 nm. En todas las determinaciones se prepararon blancos simultáneos. Los ensayos fueron efectuados en las siguientes condiciones:

- (a) "Buffer" pirofosfato de sodio 0.1 M pH 8.2
- (b) GSH 93 mM
- (c) BSF 1 mM
- (d) Temperatura 37 °C
- (e) Volumen final 4.4 ml

Para el cálculo de las actividades en ambos casos se utilizaron los coeficientes de extinción molar citados por los autores de los respectivos métodos.

2.6 Estudio del Transporte Máximo (Tm) y de la Capacidad relativa de Almacenamiento Hepático (S) de BSF y DBSF

2.6.1. Consideraciones teóricas

De acuerdo a Wheeler y col. (207), la velocidad de eliminación hepática de BSF o DBSF en cualquier instante, es igual a la suma de la velocidad de excreción biliar más la velocidad de acumulación (o menos la velocidad de depleción) del colorante en el parénquima hepático.

La velocidad de excreción biliar en condiciones donde el mecanismo de transporte secretor está saturado, es por definición el Tm.

Si definimos como capacidad de almacenamiento relativo (S) a los mg de colorante almacenado por mg de células hepáticas por cada 100 ml de plasma, con una determinada concentración de colorante, entonces la velocidad de acumulación del mismo será igual al producto de S veces la velocidad de cambio de la conc. plasmática del colorante ($\Delta p / \Delta t$).

De esta manera la velocidad de eliminación hepática es una función de los procesos secretorios y de almacenamiento:

$$HR = Tm + S \cdot \frac{\Delta p}{\Delta t} \quad (1)$$

siendo HR = velocidad de remoción hepática (mg/min)

Tm = transporte máximo de secreción (mg/min)

S = capacidad de almacenamiento relativo
(mg/mg hígado/100 ml)

$\frac{\Delta p}{\Delta t}$ = velocidad de cambio de la conc. plasmática
(mg/100 ml/min)

$\frac{\Delta p}{\Delta t}$ puede ser determinado por determinaciones seriadas de la conc. plasmática del colorante.

Como la eliminación extrahepática es pequeña (208), HR puede ser calculado de la siguiente manera:

$$HR = I - PV \cdot \left(\frac{\Delta p}{\Delta t} \right) \quad (2)$$

siendo I = velocidad de infusión del colorante (mg/min)

PV = volumen plasmático (ml)

Como en la ecuación 1 teníamos dos incógnitas T_m y S , entonces sustituyendo los valores obtenidos de HR y $\Delta p / \Delta t$ a diferentes velocidades de infusión de colorante, podríamos obtener la resolución de las mismas. El método propuesto por Wheeler, requiere infundir colorante a 3 velocidades distintas y tomar 4 muestras de sangre por cada período de infusión, utilizadas para determinar $\Delta p / \Delta t$.

Cuando HR es graficado en función de $\Delta p / \Delta t$, el valor de la pendiente es S y el valor de HR cuando $\Delta p / \Delta t$ es cero, es el T_m (Ecuación 1).

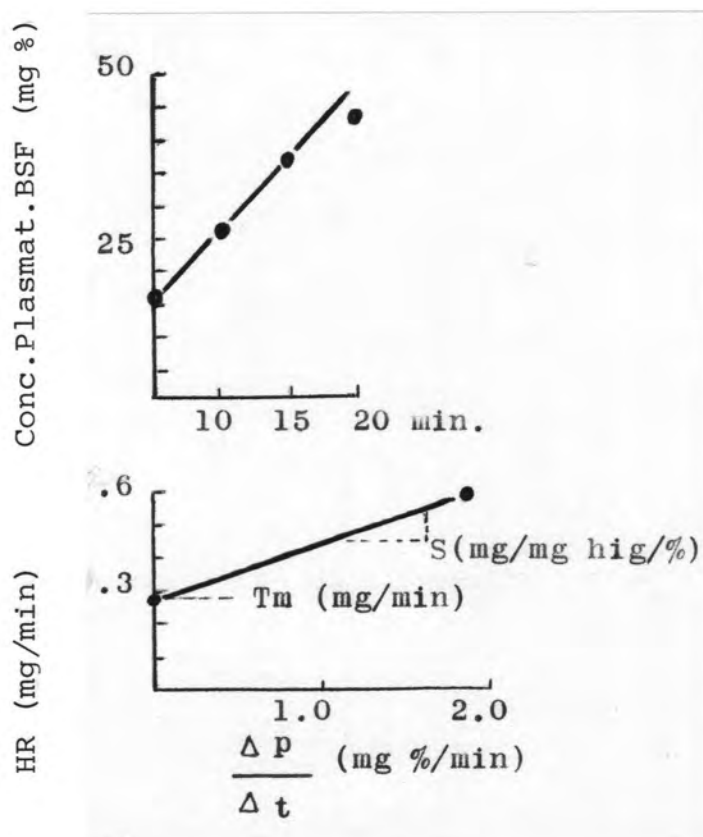
La desventaja de este método, radica en la dificultad para adaptarlo a pequeños animales de laboratorio, en el excesivo número de muestras de sangre y en que el T_m y el S se estiman indirectamente a partir de conc. plasmáticas del colorante.

Para salvar estas dificultades Klaassen (209) propuso que HR en función de $\Delta p / \Delta t$ fuera calculado con solo 2 puntos: uno de ellos es $\Delta p / \Delta t$ obtenido de 4 muestras de plasma durante un único período de infusión del colorante y el segundo es el T_m calculado directamente por análisis del colorante en la bilis (recogida por fístula biliar durante la infusión). Por

lo tanto este método requiere solo 1 período de infusión de colorante de 90 min y 4 muestras de sangre.

El Mét. se ilustra en la fig.5.

Fig. 5 : Estimación del T_m y S en la rata por el método de Klaassen (209).



2.6.2 Técnica experimental

Todos los estudios fueron realizados en grupos de animales alimentados en las condiciones citadas. Los mismos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), manteniéndose la temperatura rectal a 38.0 ± 0.5 °C, a fin de prevenir variaciones en la excreción biliar de los colorantes por hipotermia (199). En todos los animales se cateterizó vena y arte-

ria femoral (Cat. PE-50 y PE-10 respectivamente), a fin de infundir el colorante y obtener muestras de sangre. También se cateterizó el colédoco (Cat. PE-10), para la recolección biliar. Se infundió una solución de colorante en "buffer" fosfato, pH 7.4 (BSF : 250 μ g/min/100 g peso; DBSF : 200 μ g/min/100 g peso), en un volumen adecuado para compensar las pérdidas de líquido por recolección biliar. Para ello se utilizó una bomba de infusión Unita (Braun-Melsungen) manteniéndose la infusión durante 90 min.

Después de comenzada la infusión, se recogieron muestras de bilis cada 15 min y se tomaron muestras de sangre a los 5, 10, 15 y 20 min. El volumen de sangre de cada muestra no excedió 40 μ l. Al final del experimento se interrumpió la infusión y se inyeció por la misma vía 0.2 ml de una solución de Azul de Evans (0.5 g/l). Al cabo de 3 min. se obtuvo sangre por punción cardíaca, la que fue utilizada para determinar el volumen plasmático. Se extrajo el hígado que fue lavado, secado y pesado. Se estimó la conc. de los colorantes en bilis y plasma. Con los datos de conc. del colorante en bilis y con el FB (determinado gravimétricamente) se calculó la velocidad de excreción biliar. Las tres muestras de bilis con mayor conc. de colorante, fueron promediadas y utilizadas para calcular el valor del T_m . Mediante los datos de las conc. de colorante en plasma a los tiempos estudiados se calculó la velocidad de cambio de la conc. plasmática ($\Delta p / \Delta t$).

2.7 Distribución intracelular hepática de BSF y DBSF

2.7.1. Introducción

Se ha descrito que la BSF y otros aniones se fijan a la membrana plasmática del hepatocito (210) y a componentes de membranas de organelas (211-212) y que dicha fijación puede desempeñar un importante papel en la captación hepática del colorante (213).

Ante el fenómeno de alteración de la capacidad excretoria biliar por causa de la DA, fue necesario obtener evidencias de la distribución intrahepática de los colorantes empleados en los estudios anteriores.

Para ello, se planteó el análisis de la distribución de colorantes (luego de una dosis única) en el sobrenadante de 105000 g que es la fracción citosólica en la que se hallan las proteínas fijadoras de aniones orgánicos (PFAO) y el "pellet" donde se encuentran membranas y organelas del hepatocito.

Además en la fracción citosólica, se cuantificó la fijación de los colorantes a la PFAO (punto C.III 2.8)

2.7.2 Técnica experimental

Se utilizaron animales alimentados en las condiciones ya citadas. Los mismos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Se cateterizó vena femoral (Cat. PE-50) y se inyectó 50 U/100 g de peso de heparina a través de dicho catéter. Después de unos minutos, se administró por la misma vía una dosis de BSF (6 mg/100 g peso) o DBSF (4.9 mg/100 g peso) disueltos en buffer fosfato pH 7.4 en un volumen de aproximadamente 0.5 ml. Al cabo de 6 min se perfundió el hígado con sol. fisiológica a través de un catéter colocado en vena porta y a una velocidad de 50 ml/min, durante 5 min, utilizando para

ello una bomba Cole Parmer Masterflex.

Posteriormente se extrajo el hígado, el que fue pesado y secado. Se preparó un homogenado en "buffer" fosfato 0.01 M, 0.25 M sucrosa, pH 7.4, se filtró por gasa y se centrifugó a 105000 g a 0 °C durante 60 min.

Se midieron los volúmenes de homogenado colocados en los tubos de ultracentrífuga y los de los sobrenadantes respectivos de 105000 g. Luego se estimó la conc. de colorante en el sobrenadante y "pellet" de 105000 g. Se calculó el porcentaje de la dosis recuperado por hígado de rata y los porcentajes de distribución del colorante en sobrenadante y "pellet".

2.8 Estudio de la fijación de BSF y DBSF a proteínas citosólicas hepáticas

2.8.1. Consideraciones generales

En alícuotas de sobrenadantes de 105000 g de los animales estudiados en el experimento anterior (punto C III 2.7), se analizó la fijación de BSF y DBSF a las proteínas citosólicas hepáticas (PFAO) utilizando para ello el método descrito por Penefsky (214). Esta es una metodología rápida y sensible para el análisis de la fijación de ligandos a proteínas.

Esta técnica combina la filtración a través de columnas de sephadex con la centrifugación de las mismas, con el objeto de separar el ligando unido a proteínas, del ligando libre.

Para mejorar la recuperación proteica, fue necesario introducir algunas modificaciones a la técnica original. Se utilizaron jeringas plásticas de tuberculina (1 ml) cargadas con

sephadex G-25 fino (previamente hidratado con "buffer" fosfato de sodio 0.05 M NaCl 0.035 M, pH 7.4, hasta una altura de 4 cm.

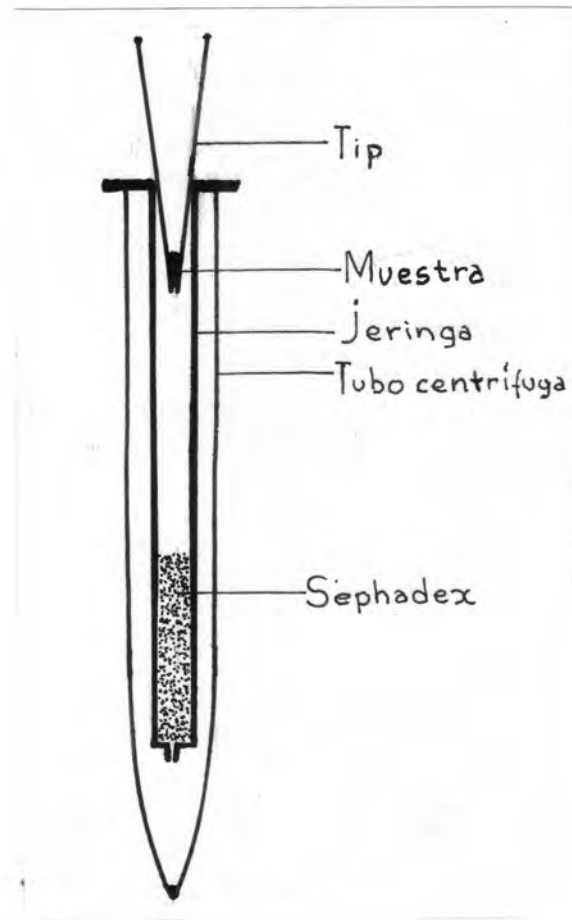
2.8.2 Protocolo experimental

Paso 1 : se colocaron las columnas en tubos de hemólisis para permitir el escurrimiento del "buffer" (2-5 min) y luego se procedió a centrifugar las mismas en un rotor con portatubos oscilantes durante 2.5 min (1500 g en el extremo de la jeringa). Después de este procedimiento, la altura del gel desciende a 3.5 cm.

Paso 2 : se colocaron tubos de extensión (tips descartables de micropipetas) en el tope de las columnas y se transfirieron éstas a tubos de centrífuga (Fig. 6), sembrando en cada tubo de extensión 100 μ l de la mezcla de reacción (sob.105000 g conteniendo el colorante). De esta manera la muestra penetra en la columna en el momento de iniciar la centrifugación. Luego se centrifugó 4 min a 3500 rpm (1300 g). El volumen de eluido obtenido en el fondo del tubo de centrífuga se determinó gravimétricamente, oscilando entre 120-140 μ l. En estas condiciones la recuperación proteica fue del 85 % y no se detectó presencia del ligando libre.

Los datos se expresaron como porcentajes del colorante unido a proteínas citosólicas hepáticas con respecto a la cantidad total de colorante en citosol hepático.

Fig. 6 : columna empleada para los estudios de fijación de colorantes a proteínas citosólicas.



Se estudió además la fijación de BSF y DBSF a sobrenadantes hepáticos de 105000 g. Para ello, en un grupo de animales bajo anestesia, se extrajeron los hígados previa perfusión de los mismos vía vena porta con sol. fisiológica fría. Se prepararon homogenados al 25 % (p/v) en "buffer" fosfato 0.01 M, sucrosa 0.25 M, pH 7.4 . Luego fueron centrifugados a 105000 g durante 60 min a 0 °C y los sobrenadantes así obtenidos, fueron almacenados a -20 °C hasta ser utilizados.

2.9 Análisis de la fijación de BSF y DBSF a proteínas plasmáticas

2.9.1 Introducción

Como ya se ha descrito, los colorantes BSF y DBSF se unen fuertemente a la AP (125-126) y como la carencia proteica en la dieta causa una depresión de la conc. de AP, se decidió realizar los siguientes estudios:

- 1) Estimación "in vitro" de la posible alteración de la fijación de los colorantes utilizados a las proteínas plasmáticas, por causa de la DA.
- 2) Análisis del posible efecto de la heparina (utilizado como anticoagulante en los experimentos "in vivo") sobre la fijación de BSF y DBSF a las proteínas plasmáticas.

2.9.2 Técnicas experimentales

En un grupo de animales alimentados en las condiciones citadas y anestesiado con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso, i.p.), se inyectó a través de la vena femoral una dosis de 50 U/100 g de peso de heparina disuelta en un volumen de 0.5 ml de sol. fisiológica. Al cabo de 5 min, se extrajo sangre por punción cardíaca, la que fue centrifugada inmediatamente. El plasma así obtenido, fue mantenido en frío hasta ser trasladado a una congeladora para ser conservado a -20 °C hasta su utilización. También fueron anestesiados otros animales a los que se les extrajo sangre por punción cardíaca, separando el suero que fue conservado a -20 °C. En todas las muestras se determinaron proteínas totales y albúmina (técnicas descritas en C.III 2.10.1) Para estimar la fijación de BSF y DBSF a las proteínas del plasma "in vitro", se utilizó el método de Penefsky (214), des

cripto en el punto C.III 2.8. Las conc. de BSF y DBSF elegidas fueron las conc. plasmáticas extrapoladas a $t=0$ en los estudios farmacocinéticos. También se utilizaron sueros en las mismas condiciones, pero con y sin el agregado de heparina. Las plasmas y sueros (0.5 ml) fueron incubados con BSF y con DBSF 30 min a temperatura ambiente. Las conc. finales en los ensayos fueron las siguientes:

BSF : DN 806 $\mu\text{g/ml}$	DBSF : DN 556 $\mu\text{g/ml}$
DA 849 $\mu\text{g/ml}$	DA 608 $\mu\text{g/ml}$

Para el ensayo de fijación, se sembró un volumen de 100 μl de la mezcla plasma/colorante. La velocidad de centrifugación empleada fue de 2500 rpm (550 g) y la recuperación proteica fue del 98 % .

2.10 Procedimientos analíticos

2.10.1 Determinación de PTP, AP y PTH

Para determinar la conc. de PTP se utilizó el método de Gornall (215) y para la de AP el método del verde de bromocresol descrito por Rodkey (216). Como testigo se empleó un suero patrón calibrado (Versatol, General Diagnostics).

Para determinar la conc. de PTH se utilizó el mét. del biuret modificado por Suranyi y col. (217). Para ello, se prepararon homogenados hepáticos al 5 % (p/v) en "buffer" fosfato 0.066 M, pH 7.4. Luego, a una alícuota del mismo se le agregaron 4 volúmenes de una sol. de desoxicolato de sodio al 10 % llevando a volumen con sol. fisiológica. Posteriormente fue

agregado el reactivo biuret. Los tubos se incubaron 30 min. a 37 °C y luego se efectuó la lectura espectrofotométrica a 540 nm. Como testigo se utilizó una sol. de albúmina bovina (40 mg/ml).

2.10.2 Determinación del GSH

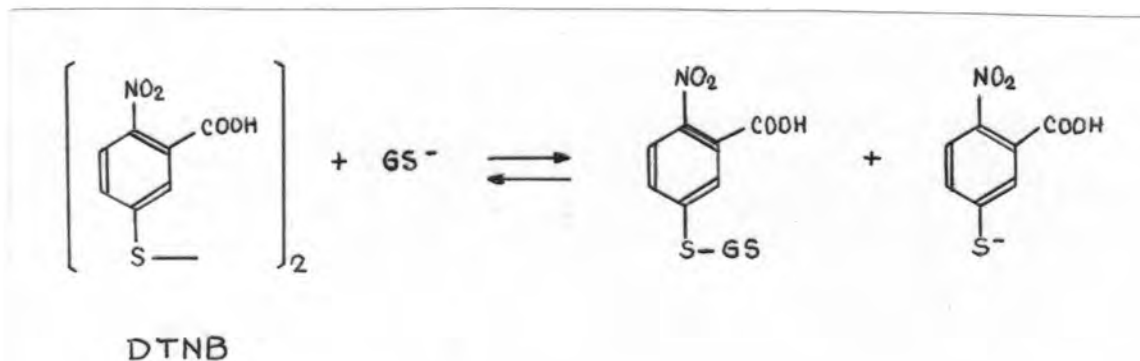
Se utilizó una modificación de la técnica descrita por Ellman (218). Este método consiste en la reacción del ácido 5,5', ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) con tioles alifáticos a pH 8, para producir un mol del anión 5-tio-2 nitrobenzoico por cada mol de tiol reaccionante (Fig. 7).

Dicho anión es un producto intensamente coloreado que posee un pico de absorción a 412 nm. Para efectuar la estimación de GSH fue necesario en primer lugar eliminar los tioles proteicos del medio, para lo cual se precipitaron las proteínas con una sol. de ác. tricloroacético (TCA) al 5 % preparada en HCl 0.01 M, a fin de impedir la oxidación del GSH.

Se prepararon homogenados hepáticos al 15 % (p/v) en TCA al 5 % en HCl 0.01 M, a 0°C, centrifugando luego a 3500 rpm durante 3 min. Los sobrenadantes fueron inmediatamente neutralizados con NaOH 1 M y alícuotas de éstos fueron mezclados con una sol. de DTNB en "buffer" fosfato de sodio 0.1 M, pH 8.

La conc. de DTNB fue 0.1 mM. La lectura de la absorbancia a 412 nm fue efectuada en un espectrofotómetro y la conc. de GSH calculada, utilizando el coeficiente de extinción molar $\Delta \epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (218).

Fig. 7



2.10.3 Determinación del VP

Para estimar el VP se utilizó la técnica del azul de Evans (219). A un grupo de animales anestesiados con pentobarbital sódico se les cateterizó la vena femoral (Cat.PE-50) y se les inyectó por la misma, 0.2 ml de una sol. de azul de Evans (5 g % disuelto en sol. fisiológica. Al cabo de 5 min. se obtuvo sangre por punción cardíaca. La sangre fue centrifugada y se determinó la conc. del colorante en el plasma, mediante la técnica de Tornberg (220). Dicha técnica consiste en liberar el colorante de su unión a las proteínas del plasma por medio de un detergente (Hyamina), precipitando luego las proteínas con acetona y facilitando así la disolución del azul de Evans en dicho solvente. Luego se determina la absorbancia a 620 nm frente a blanco y testigo compuestos por los extractos de un plasma utilizado como control.

2.10.4 Det. del agua total y del espacio de inulina en cortes de hígado

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico, extrayéndose la sangre por punción cardíaca. Luego se extrajo el hígado y del lóbulo mayor se obtuvieron manualmente "cortes" de un espesor aproximado de 0.5 mm, los que fueron colocados en sol. fisiológica fría. Los cortes fueron utilizados para determinar el contenido de agua total y el espacio de inulina, como estimación del espacio extracelular. Todas las incubaciones fueron llevadas a cabo en un agitador metabólico Dubnoff a 38 °C y bajo atmósfera 95 % O₂ / 5 % CO₂.

Los cortes fueron colocados en frascos conteniendo 4 ml de sol. Ringer-Krebs siendo mantenidos durante un período de equilibración de 15 min en el agitador Dubnoff. En cada frasco se colocaron 3 cortes elegidos al azar del frasco de almacenamiento. El medio de incubación consistió en una sol. Ringer-Krebs enriquecida con glucosa (10 mM), ph 7.4. Luego, un grupo de cortes fue incubado, por triplicado, durante 60 min. en un medio conteniendo inulina (4 mg/ml), para estimar el espacio extracelular. Luego de finalizada la incubación se separaron los cortes por filtración y se lavaron con agua destilada. Los cortes utilizados para la det. de agua total (por duplicado) fueron colocados en estufa a 120 °C durante 48 hs. determinando el contenido de agua por diferencia entre peso húmedo y peso seco (221).

Los cortes utilizados para estimar el espacio de inulina fueron homogeneizados en TCA al 10%. Los medios de incubación fueron tratados de igual manera determinando en ellos la conc. de inulina por el mét. de Roe (222). En cada experimento se determinó la osmolaridad del medio de incubación (Osmómetro Wescor Mod. 5100 C) siendo la misma de 283 ± 1 mOsm/kg agua (n=5).

Cálculos

- 1) Contenido de inulina en los cortes

$$\text{Absorbancia} \frac{\text{homogenado} \times \text{factor} \times \text{dil}}{\text{peso del corte}} = \text{mg inulina/g tej.húm.}$$

- 2) Contenido de inulina en el medio de incubación

$$\text{Absorbancia medio} \times \text{factor} \times \text{dil} = \text{mg inulina/ml medio}$$

- 3) Relación tejido/medio (T/M)

$$\frac{\text{Absorbancia homogenado}}{\text{peso corte} \times \text{absorb. medio} \times \text{dil}} = \text{T/M}$$

- 4) Cálculo del Agua total (
- H_2O_t
-) (221)

$$H_2O_t \text{ (kg } H_2O/\text{kg tej.seco)} = \frac{\text{mg tej.húmedo}}{\text{mg tej. seco}} - 1$$

- 5) Cálculo del Agua Extracelular (
- H_2O_E
-) (221)

$$H_2O_E \text{ (kg } H_2O/\text{kg tej.húmedo)} = \text{T/M} \cdot \frac{H_2O_t + 1}{H_2O_t}$$

- 6) Cálculo del Agua Intracelular (
- H_2O_i
-) (221)

$$H_2O_i \text{ (kg } H_2O/\text{kg.tej. húmedo)} = 1 - H_2O_E$$

2.10.5 Determinación de ADN en homogenados hepáticos

- a)
- Extracción del ADN de hígado de ratas:

Se utilizó la técnica de Schneider (223). Se efectuaron homogenizados hepáticos al 20 % en agua destilada, a 4°C. Se separaron los compuestos fosforados solubles en ácido (ATP,ADP, etc.) mediante precipitación con TCA al 10 % ; posteriormente se eliminaron los lípidos mediante extracción con etanol al 95 % y luego se destruyó el ARN, incubando la muestra con KOH 1 M durante 20 hs a 38 °C. El ADN fue separado por precipitación con HCl 6 M y TCA al 5 % . Finalmente el ADN fue extraído mediante calentamiento con TCA al 10 % durante 15 min a 90 °C.

b) El ADN fue estimado espectrofotométricamente en el extracto, utilizando para ello la reacción de Dische (223). Como testigo se utilizó una solución de ADN (Timo de carnero) de 500 µg/ml.

2.10.6 Determ. de las conc. de AB,CO,FL,PTB y de la OSM de la bilis.

Determinación de AB : la conc. de AB en bilis fue determinada por un mét. enzimático, que utiliza la 3 α hidroxisteroide dehidrogenasa, según la técnica descrita por Talalay (224) modificada por Berthelot (225). Dicho método se fundamenta en la oxidación del hidroxilo en posición 3 α del núcleo de los AB en presencia de la enzima, y la transferencia del hidrógeno liberado al NAD, que es transformado en NADH. Por cada mol de AB oxidado se forma un mol de NADH. La det. de NADH permite entonces determinar la conc. de AB hidroxilados en posición 3 α . Conviene destacar que los principales AB fisiológicos, tienen la citada configuración.

Para la determinación, 1-2 μ l de bilis fueron agregados a una mezcla conteniendo 100 μ l de preparación enzimática (0.25 U de enzima por cada ml de sol. Tris-HCl 0.03 M, pH 7.2). Los otros reactivos fueron 100 μ l de hidrato de hidracina 0.1 M; 50 μ l de NAD 4.54 mM y 650 μ l de pirofosfato de sodio 0.1 M, pH 10.8. Todas las muestras se incubaron 30 min. a temperatura ambiente determinándose luego la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Varian 340 S.

Determinación de CO : la conc. de CO en bilis se determinó por medio del método enzimático que utiliza colesterolesterasa, colesteroles oxidasa y peroxidasa (226) (Monotest Cholesterol, Boehringer Mannheim, West Germany).

Determinación de FL : la conc. de FL en bilis se estimó por medio del método de Bartlett (227). De acuerdo con este procedimiento, se realizó en primer lugar la mineralización de los fosfolípidos de la bilis por acción del ác. perclórico y posteriormente la combinación del fósforo inorgánico obtenido, con molibdato de amonio. En la reacción, forma un mol de fósforo por cada mol de fosfolípido mineralizado.

Determinación de PTB : para determinar la conc. de PTB se utilizó el método de Lowry (228), utilizando una sol. de albúmina bovina como testigo. Se aplicó además la técnica de estándar interno descrita por Godfrey (229), para eliminar posibles interferencias.

Determinación de OSM : la OSM de la bilis fue medida utilizando

do el método de la depresión del punto de congelación (Advanced Instruments, USA).

2.10.7 Det. de las concentraciones de BSF y DBSF en plasma y bilis

Las conc. de BSF y DBSF fueron determinadas espectrofotométricamente a 580 nm y 575 nm respectivamente, después de una dilución apropiada de las muestras con una solución 0.1 M de NaOH.

2.10.8 Determinación de las conc. de BSF y DBSF en sobrenadantes hepáticos y "pellet" de 105000 g

Se utilizó una modificación de la técnica de Whelan y col. (230) que consiste en la extracción del colorante primero con acetona y luego en una segunda etapa, con acetona al 40 % que extrae el colorante conjugado. Posteriormente se efectúa la determinación espectrofotométrica en los extractos.

Sobrenadante y "pellet" obtenidos por centrifugación a 105000 g de alícuotas de 12 ml de homogenado hepático al 10 % en "buffer" fosfato 0.01 M, sucrosa 0.25 M, pH 7.4, fueron analizados de la siguiente manera:

- Se colocaron 2 ml del sobrenadante en tubos de extracción y se agregaron 4 ml de acetona, agitando vigorosamente durante 2 min. Luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante así obtenido y se mantuvo en una probeta graduada con tapa. El "pellet" fue tratado con 1 ml de acetona al 40 % , agitando durante 3 min. en un agitador vibratorio y centrifugando luego a 3500 rpm durante 10 min. Luego el sobrena-

dante fue mezclado con el anterior y se midió el volumen total. El sobrenadante total fue centrifugado 15 min. a 3500 rpm en tubos tapados. Se tomaron alícuotas de 1 ml (por triplicado) que fueron mezclados con 2 ml de sol. de NaOH 0.1 M, para la det. espectrofotométrica de BSF o DBSF.

- El "pellet" fue lavado con 1 ml de "buffer" frío, centrifugando luego a 3500 rpm durante 10 min. y descartado el líquido de lavado. Luego se agregó 1 ml de agua y se removió el "pellet" del tubo de centrifugación, siendo luego enjuagado dos veces con 3 ml de acetona, la que fue mezclada con el "pellet" en un tubo de extracción, agitando cada vez enérgicamente durante 2 min y centrifugando a 3500 rpm durante 10 min. Luego se procedió como en el análisis del sobrenadante de 105000 g.

BSF y DBSF fueron cuantificados en los extractos de "pellet" y sobrenadante de 105000 g, utilizando el mét. de testigo compensado descrito por Harris (231), diseñado para eliminar los efectos de la turbidez cuando esta no es un factor constante en todas las muestras analizadas.

El procedimiento fue el siguiente:

Se efectuó una determinación directa de la muestra. En alícuotas de la misma se prepararon uno o más testigos agregando cantidades conocidas de la sustancia a determinar y además un blanco de reactivos. Se obtuvieron así las siguientes lecturas de absorbancia:

$$Ab_x = \text{abs. de la muestra desconocida}$$

$$Ab_a = \text{abs. de la muestra desconocida} + \text{testigo de conc. conocida (a)}$$

$$Ab_b = \text{Abs. de la muestra desconocida} + \text{testigo de conc. conocida (b)}$$

$$\text{Conc.}_x = \frac{Ab_x}{(\text{Abs}_b - \text{Abs}_a)(b-a)}$$

Las conc. de colorante así calculadas fueron referidas luego a los volúmenes de extractos obtenidos y luego a las cantidades de sobrenadante o "pellet" de 105000 g obtenidas para cada homogenado centrifugado. En dicha forma, pudieron efectuarse las estimaciones por peso de hígado.

En experimentos de recuperación en los que se agregó BSF o DBSF a la fracción citosólica o al "pellet", luego de la extracción en las condiciones citadas, se obtuvieron recuperaciones del orden de 97 - 102 % .

2.10.9 Separación cromatográfica de conjugados de BSF en bilis

Alícuotas de bilis (5 - 10 μ l) fueron sembradas en tiras de papel Whatman 3 MM (42 x 2.5 cm) y sometidas a separación cromatográfica ascendente durante 19 hs, usando como solvente la mezcla butanol: ác. acético: agua (40:10:20). Luego las tiras fueron secadas bajo corriente de aire caliente y las manchas visualizadas por exposición a vapores de amoníaco, fueron cortadas y eluidas con una sol. 0.1 M de NaOH. La conc. de BSF fue estimada espectrofotométricamente a 580 nm. Se prepararon también testigos de BSF - GSH de acuerdo con el método de Whelan (230) y de BSF - cisteína utilizando la técnica de Grodsky (232), a fin de identificar las manchas correspondientes al colorante libre y sus conjugados.

Muestras de bilis conteniendo DBSF, fueron sometidas a la misma separación a fin de corroborar que dicho colorante no es conjugado en su paso por el hígado.

2.11 Análisis Estadísticos

La linealidad de las fases de la curva biexponencial fue estudiada empleando el test de Bartlett. Los coeficientes de regresión (α y β) de ambas fases se compararon de acuerdo a Hald (233), considerando la primera fase (para ambos grupos de animales y para los dos aniones estudiados) hasta los 4 min. Todos los otros datos fueron comparados utilizando el test-t de Student. Los valores se expresaron como la media \pm error estándar.

2.12 Drogas y productos químicos utilizados

DBSF fue provista por SERB (Paris - Francia), Azul de Evans por Fluka (Suiza), Heparina por Roche (Argentina) y BSF, Albúmina Bovina, Taurocolato de sodio, ADN, Inulina, GSH, 1-Cl,2,4 dinitrobenzeno, ac. 5,5' ditiobis nitrobenzoico y Hyamina, por Sigma Chem. Co (E.E.U.U.). Todos los otros reactivos utilizados fueron de calidad pro-análisis.

CAPITULO IV

Resultados

1 Efectos generales de la DA

1.1 Estudio del consumo de dieta

Algunos autores han sugerido (15) (170) que si bien los animales alimentados con dietas deficientes en proteínas consumen menos alimento que los controles, el consumo de dieta expresado por unidad de peso corporal se mantiene constante dentro de un amplio rango de composición proteica de la dieta. En nuestros experimentos hemos observado que la administración de la DA en ratas Wistar adultas causó una disminución continua del peso corporal dentro del período de tiempo estudiado (fig.8). Dicha variación promedio fue : DA = -2,54 g/día/rata (n = 10) y DN = + 2.98 g/día/rata (n = 10).

Cuando se calculó el consumo de dieta por día y por animal se pudo comprobar una tendencia a la disminución del mismo en el grupo DA (Fig. 9). El consumo promedio fue menor en el citado grupo: DN = 14.70 \pm 0.30 g dieta/día/rata, (n = 10) y DA = 12.90 \pm 0.40 g dieta/día/rata (n = 10) (p < 0.05).

Cuando el consumo de alimento se expresó por 100 g de peso corporal no se observaron diferencias entre ambos grupos de animales (Fig. 10). El consumo promedio expresado en dicha forma fue DN = 4.46 \pm 0.10 g dieta/día/100 g (n = 10) y DA = 4.06 \pm 0.13 g dieta/día/100 g (n = 10).

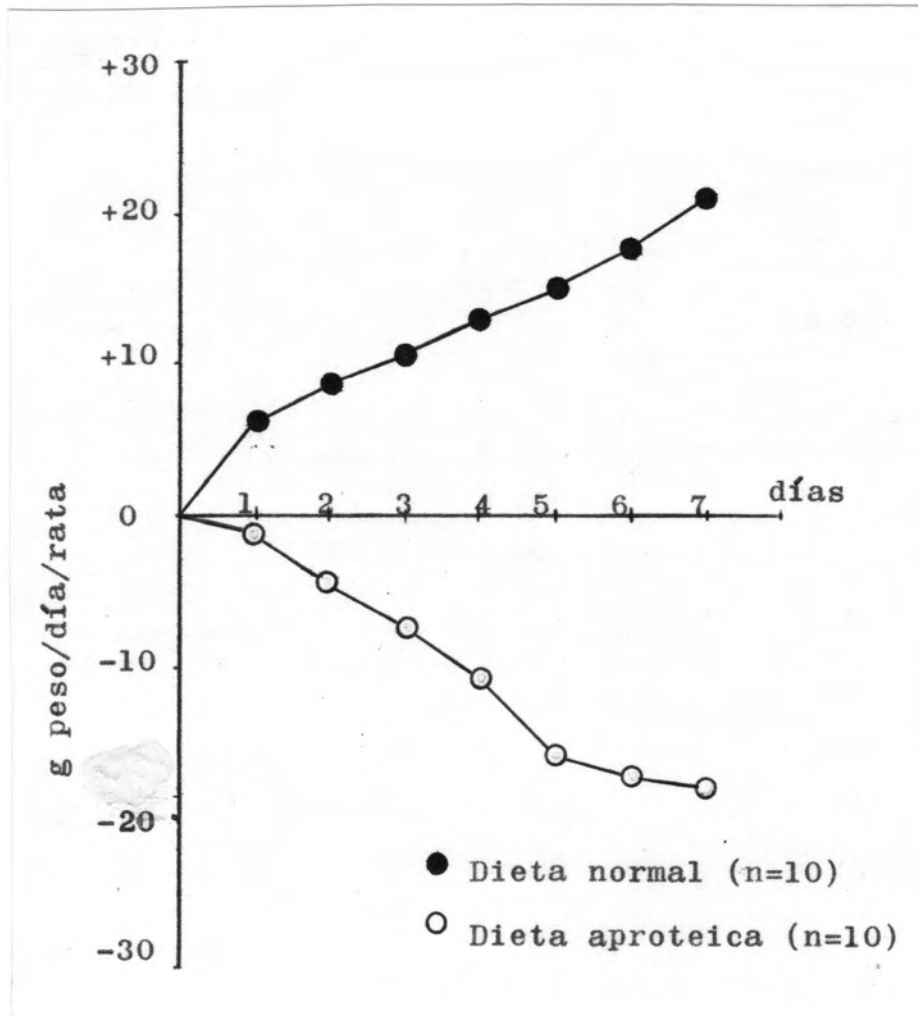


Fig. 8 : Variación diaria de peso corporal

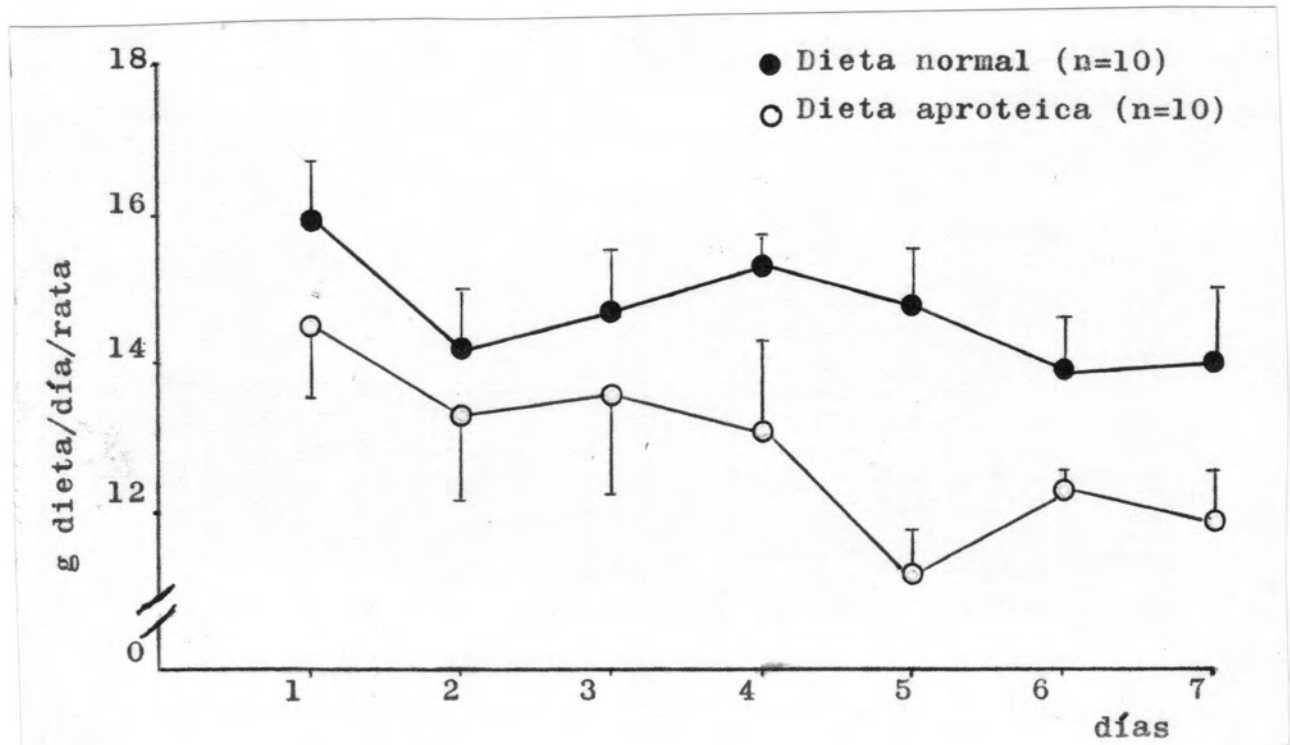


Fig. 9 : Consumo diario de alimento expresado en g dieta/día/rata

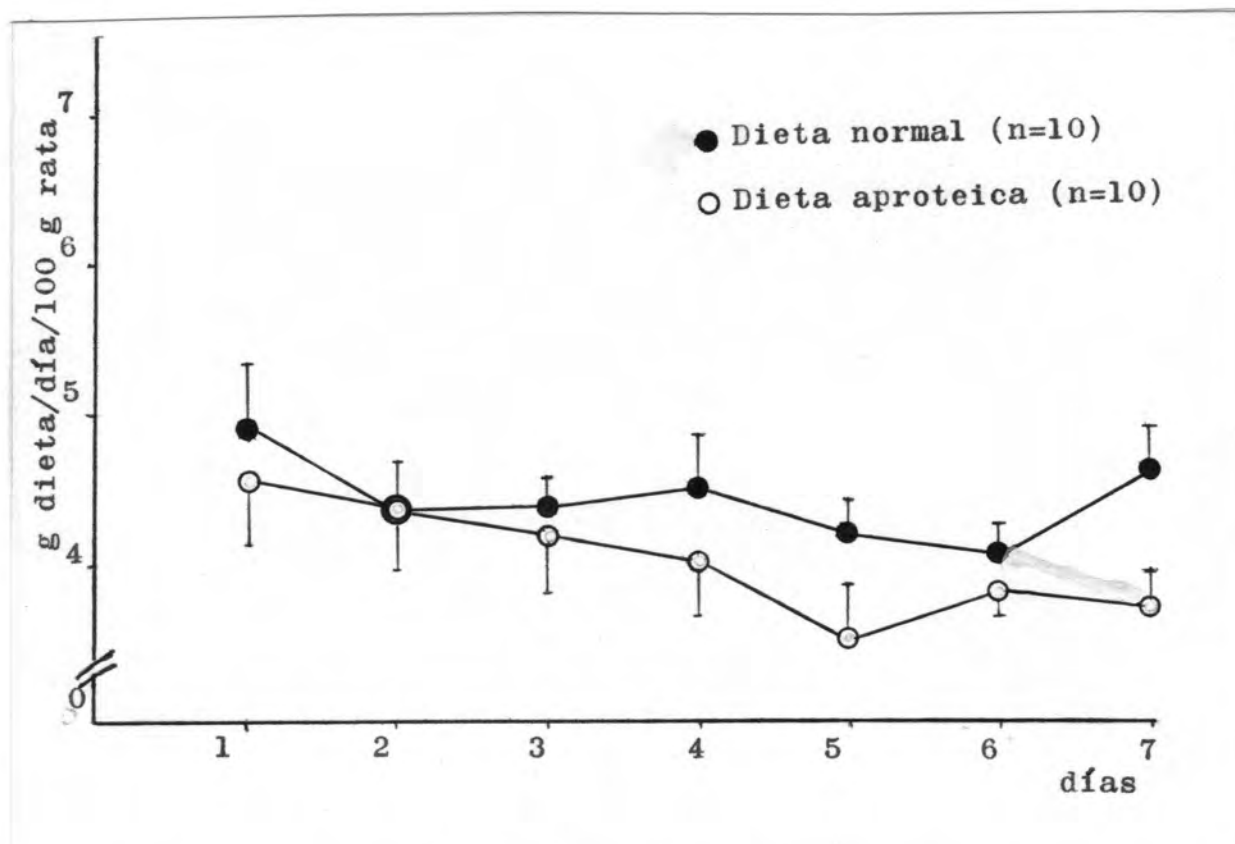


Fig. 10 : Consumo de dieta expresado en base a 100 g de peso corporal.

Es interesante la observación de que los animales que recibieron DA tuvieron tendencia a revolver el alimento en el comedero. Sin embargo, el consumo calórico promedio expresado por 100 g de rata/día fue menor en el grupo DA; $DN = 17.51 \pm 0.51$ cal/100 g/día ($n = 7$); $DA = 14.32 \pm 0.71$ cal/100 g/día ($n = 7$) ($P < 0.05$).

Con estas evidencias podemos decir que dentro del período de tiempo estudiado, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en el consumo de dieta expresado por unidad de peso corporal, lo cual confirma los resultados de Camargo (16) Campana (15) y Horn (170). Podríamos concluir entonces que en nuestros animales no existiría una deficiencia calórica de considerable magnitud sumada a la deficiencia proteica.

1.2 Efecto de la DA sobre el PC, PH, PTH y GSH hepático

En el grupo de animales estudiados, la ingesta de DA provocó una disminución del PC final en el período de tiempo estudiado (DN : + 4.6 % y DA : -7.4 %), una disminución del PH (20 %) y de la relación (PH/PC).100 (14 %) , como se ha descrito en la literatura (15)(16)(23). El contenido proteico del hígado también disminuyó en el grupo DA (17 %), de acuerdo a lo esperado (24) y el GSH hepático cayó abruptamente en dichos animales (72 %).

Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1 : Efecto de la DA sobre el PC,PH, la relación PC/PH, las PTH y el GSH hepático.

	<u>Dieta Normal</u>	<u>Dieta Aprroteica</u>
PC final	295 ± 5	274 ± 4 *
(g)	(n = 63)	(n = 82)
Cambio PC	+ 13 ± 1	- 22 ± 1
(g)	(n = 62)	(n = 82)
PH	9.81 ± 0.19	7.88 ± 0.16 *
(g)	(n = 63)	(n = 82)
(PH/PC) 100	3.33 ± 0.05	2.88 ± 0.04 *
	(n = 63)	(n = 82)
PTH	195 ± 6	162 ± 5 *
(mg/g hígado)	(n = 18)	(n = 21)
GSH hepático	5.91 ± 0.18	1.64 ± 0.08 *
(μmol/g hígado)	(n = 20)	(n = 21)

n : número de animales, * diferente del control (p < 0.05)

1.3 Efecto de la DA sobre la AP, PTP y el VP

Los animales que recibieron DA mostraron una disminución de AP (17 %) y PTP (13 %), lo cual confirma resultados obtenidos por otros autores (11) (33). También se encontró una disminución significativa del VP (14 %), lo cual es de interés para el análisis farmacocinético de BSF y DBSF. Los resultados se presentan en Tabla 2.

Tabla 2 : Efecto de la DA sobre las concentraciones plasmáticas de AP, PTP y sobre el VP.

	AP (g/dl)	PTP (g/dl)	VP (ml/100 g PC)
DN	3.6 ± 0.1 (n = 31)	5.7 ± 0.1 (n = 31)	3.48 ± 0.14 (n = 13)
DA	3.0 ± 0.1 * (n = 25)	5.0 ± 0.1 * (n = 25)	3.01 ± 0.20 * (n = 10)

DN: dieta normal, DA: dieta aprroteica, n: número de animales
* diferente del control (p < 0.05)

1.4 Efecto de la DA sobre la distribución de agua en hígado

Los cortes de hígado de los animales alimentados con DA mostraron un aumento del agua total (28 %). Ello implica retención de agua, fenómeno descrito en la literatura (181), aunque en condiciones de más drástica privación. También existió una tendencia al aumento del volumen extracelular, y en este caso el fenómeno fue estadísticamente significativo, observán

dose un aumento del 24 % en el grupo DA . Estas evidencias coinciden con las disminuciones de VP, PTP, AP y PTH, lo cual explicaría el fenómeno observado. Los datos se presentan en Tabla 3.

Tabla 3 : Distribución de agua en cortes de hígado

		H_2O_{total} kg H_2O /kg tej.seco	$H_2O_{extracelular}$ kg H_2O /kg tej.húmedo
DN	8	3.330 ± 0.200	0.422 ± 0.017
DA	8	4.250 ± 0.140 *	0.523 ± 0.013 *

DN: dieta normal, DA: dieta aprroteica, n: número de animales,
* diferente del control (p < 0.05)

1.5 Efecto de la DA sobre el número de células hepáticas, contenido proteico y tamaño celular

En el grupo de animales que recibieron DA, se observó una disminución del PH. El contenido de ADN expresado por gramo de hígado tuvo tendencia a aumentar en este grupo de animales aunque la diferencia no fue significativa, lo cual puede ser explicado por la disminución del tamaño celular.

No existieron diferencias en el contenido de ADN por hígado entero. No se observaron variaciones en el número de células hepáticas, comprobándose una disminución del contenido proteico por célula. Los resultados se presentan en Tabla 4.

Cuando se estimó el tamaño celular utilizando técnicas morfomé

tricas (188), se determinó que la DA causa una disminución del mismo (27%). Se estimó también el número de células binucleadas en ambos grupos, el que no superó el 5%. Los resultados se presentan en Tabla 5.

Tabla 4 : Efecto de la DA sobre el PH, ADN, PTH, número y contenido proteico de las células hepáticas.

	DN (n = 7)	DA (n = 7)	
PH (g)	9.48 ± 0.42	7.57 ± 0.34	*
mg ADN/g híg.	2.27 ± 0.15	2.50 ± 0.17	N.S.
mg ADN/hígado	21.48 ± 1.64	18.96 ± 1.55	N.S.
<u>mg prot.totales</u> g. hígado	257 ± 9	201 ± 11	*
N° células(x10 ⁶)	3464 ± 265	3059 ± 250	N.S.
proteína/célula (ng)	0.71 ± 0.04	0.50 ± 0.03	*

DN: dieta normal, DA: dieta apteica, n: número de animales

* diferente del control (p < 0.05), N.S.:no significativo.

La estimación del número de células hepáticas a través de la determinación de ADN, es válida en animales adultos en los que las mitosis son infrecuentes (en nuestro caso el porcentaje de células binucleadas no superó el 5%). Por lo tanto pode-

mos concluir que la DA no afecta el número de células, pero produce una célula hipotrófica y con una disminución del contenido proteico.

Nuestros datos confirman las observaciones de Thompson(182), quien sugirió que no existe un aumento considerable de ADN en los núcleos de hepatocitos de animales alimentados con DA.

Tabla 5 : Efecto de la DA sobre el tamaño celular

	n	superficie celular ¹ (μ^2)
DN	3	463 \pm 15
DA	3	338 \pm 10 *

DN: dieta normal, DA: dieta aprroteica, n: número de animales

* diferente del control (p < 0.05)

¹para medir la superficie celular se contaron los núcleos en 20 campos/corte hígado y 4 cortes/rata. Luego se refirió el n° de núcleos/campo a la superficie calibrada del campo empleado

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{área cél.} = \frac{\text{área campo}}{\text{n° núcleos}} \end{array} \right\}$$

1.6 Efecto de la DA sobre la actividad GST hepática

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la DA sobre la actividad GST hepática. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

La actividad GST (expresada por g de hígado para ambos sustra-

tos, CDNB y BSF) se encontró disminuída en los animales que recibieron DA. Por lo contrario cuando se calcularon las actividades por mg de proteína citosólica, no se observaron diferencias.

Tabla 6 : Influencia de la DA sobre la actividad GST hepática

	DN (n = 4)	DA (n = 4)	
CDNB $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g híg.}$	59.2 \pm 2.5	44.2 \pm 3.3	*
BSF $\text{mg}/5 \text{ min}/\text{g híg.}$	11.8 \pm 0.7	7.1 \pm 0.8	*
CDNB $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot.}$	1228 \pm 29	1225 \pm 61	N.S.
BSF $\text{mg}/5 \text{ min}/\text{mg prot.}$	196 \pm 19	188 \pm 29	N.S.

n: número de animales, DN: dieta normal, DA: dieta aprroteica.

* diferente del control ($p < 0.05$), N.S.: no significativo.

2 Efecto de la DA sobre la secreción biliar

2.1 Influencia de la DA sobre el FB basal y la velocidad de excreción biliar de AB

En el grupo de animales alimentados con DA se observó una disminución significativa del FB (25 %) y de la excreción de AB (26 %). Los datos se presentan en Tabla 7.

Tabla 7 : Influencia de la DA sobre el FB, la velocidad de AB y el FIAB.

	DN	DA
Flujo Biliar ^a (μ l/min/g hígado)	1.36 \pm 0.06 (n = 11)	1.02 \pm 0.06 * (n = 15)
veloc.excreción AB ^b (nmoles/min/g hígado)	31 \pm 2	23 \pm 3 *
FIAB ^c (μ l/min/g hígado)	0.90 \pm 0.13 - - - - (n = 6)	0.57 \pm 0.12 * - - - - (n = 5)
Pendiente ^d	0.0126 \pm 0.0019	0.0128 \pm 0.0016 N.S.

a,b : determinaciones realizadas en 3 períodos de recolección de bilis de 15 min. cada uno y promediadas para cada rata.

^cFlujo Biliar Independiente de Acidos Biliares (FIAB) (μ l/min/g. hígado) estimado por la extrapolación a cero de la recta de regresión entre FB y velocidad de excreción de AB.

^dpendiente de la recta de regresión entre FB y velocidad de excreción de AB (μl por nmoles/de AB).

N.S. no significativo, DN: dieta normal, DA: dieta aprroteica.

* diferente del control ($p < 0.05$).

n: número de animales.

2.2 Influencia de la DA sobre el FIAB

El FIAB estimado por la extrapolación convencional (193) fue significativamente menor en las ratas que recibieron DA (37 %) (Tabla 7). La pendiente de la recta de regresión entre FB y la velocidad de excreción biliar de AB no mostró diferencias entre ambos grupos de animales.

2.3 Efecto de la DA sobre el FB canalicular

La relación de concentraciones de ^{14}C -eritritol en bilis y plasma no fue significativamente diferente en los animales que recibieron DN y DA (Tabla 8). En consecuencia, la depuración biliar de ^{14}C -eritritol disminuyó en forma paralela al FB en los animales que recibieron DA.

2.4 Efecto de la DA sobre la composición de la bilis

En el grupo de animales estudiados se observó la ya descrita disminución del FB. Sin embargo las concentraciones biliares de AB, CO, FL y PTB no fueron modificadas por la DA. Por lo contrario las velocidades de excreción biliar de AB, CO, FL y PTB estuvieron significativamente disminuídas debido a la disminu-

ción del FB provocada por la DA. Los porcentajes molares de AB, FL y CO (presentado el dato únicamente para CO) y el índice de saturación de CO de la bilis, no fueron modificados por la DA.

No se observaron diferencias entre ambos grupos cuando se analizó la osmolaridad de la bilis.

Los datos se presentan en Tabla 9.

Tabla 8 : Efecto de la DA sobre la relación de concentraciones de eritritol en bilis y plasma y sobre la depuración biliar del mismo.

	{B} ^a / {P} ^b	Depuración μl/min/g hígado
DN (n = 6)	1.09 ± 0.03	1.46 ± 0.17
----- N.S. -----		p < 0.05 -----
DA (n = 5)	1.14 ± 0.06	1.09 ± 0.05

^aconcentración de eritritol en bilis, ^bconcentración de eritritol en plasma.

N.S. no significativo, DN: dieta normal, DA: dieta aprroteica.
n: número de animales.

Tabla 9 : Efecto de la DA sobre el FB, la excreción de lípidos biliares y la secreción de proteínas.

	DN (n = 6)	DA (n = 7)	
Flujo Biliar (μ l/min/g.hígado)	1.32 \pm 0.09	0.99 \pm 0.10	*
Conc.Ac.Biliares (μ mol/ml)	27.83 \pm 2.70	24.15 \pm 2.97	N.S.
Excreción AB (nmoles/min/g hígado)	35.56 \pm 1.19	23.44 \pm 3.04	*
Conc.FL (μ mol P/ml)	7.71 \pm 0.32	7.40 \pm 0.55	N.S.
Excreción FL (nmoles P/min/g híg.)	10.12 \pm 0.71	7.28 \pm 0.89	*
Conc. CO (μ mol/ml)	0.64 \pm 0.04	0.62 \pm 0.04	N.S.
Excreción CO (nmol/min/g hígado)	0.84 \pm 0.08	0.61 \pm 0.06	*
Porcentaje Molar CO	1.97 \pm 0.17	2.01 \pm 0.17	N.S.
Indice de Saturación CO	0.28 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	N.S.
Conc. PTB (mg/ml)	3.9 \pm 0.1	3.7 \pm 0.3	N.S.
Excreción PTB (μ g/min/g hígado)	4.76 \pm 0.26	3.72 \pm 0.46	*
Osmolaridad (mOsm/kg H ₂ O)	275 \pm 11	257 \pm 13	N.S.

n: número de animales, DN: dieta normal, DA: dieta aproteica.

* diferente del control (p < 0.05), N.S. no significativa.

2,5 Conclusiones

Los mecanismos involucrados en la producción de bilis y la interferencia con el FB provocada por muchos agentes hepatotóxicos han sido intensivamente estudiados. La excreción de sustancias endógenas y xenobióticas por el hígado comprende distintas etapas, entre las cuales la excreción biliar merece una especial atención. La influencia de una dieta carente de proteínas sobre la formación de la bilis y la secreción de lípidos y proteínas biliares no ha sido totalmente dilucidada. Se ha descrito que en ratas adultas alimentadas por el término de 2 días con DA, se produce una disminución de la secreción biliar (16) sin embargo datos provenientes de otros autores son contradictorios (234).

Los objetivos de esta investigación fueron:

- 1.- Determinar si una dieta carente de proteínas administrada a ratas produce una alteración de la secreción biliar.
- 2.- Dilucidar cuál fracción de la bilis, si la hay, resulta afectada por la deprivación proteica.
- 3.- Estudiar la influencia de la DA sobre la excreción de componentes biliares.

Durante el desarrollo de nuestros experimentos hemos observado que en las ratas alimentadas con DA se produce una disminución del FB. Dicha disminución fue considerada como de origen canalicular más que derivada de la secreción de fluido (o inhibición de la reabsorción del fluido) por los ductos y ductulos bilia-

res. Dicha conclusión deriva de que la depuración biliar de eritritol disminuye en paralelo con el FB (25%) sin producirse modificaciones en la relación de concentraciones bilis/plasma (Tabla 7 y 8) (193). La disminución del FB podría ser debido a:

- 1.- Disminución de la cantidad de agua excretada por μmol de AB.
- 2.- Disminución del FIAB.

Cuando se graficó el FB en función de la velocidad de excreción de AB, la pendiente de la línea de regresión entre ambos parámetros (estimación indirecta del poder osmótico de los AB) fue similar entre ambos grupos, sugiriendo que no existe modificación del efecto osmótico de los AB excretados.

Como la disminución del FB fue acompañada por una moderada disminución de la excreción de AB, no puede sin embargo descartarse una alteración del FB dependiente de AB (59). Además se debe tener en cuenta que la disminución del FB estuvo asociada con una significativa alteración del FIAB estimada por la extrapolación convencional a cero de excreción biliar de AB, de la recta de regresión entre FB y velocidad de excreción de AB (193).

Aunque faltan evidencias concluyentes, muchos estudios sugieren que la FIAB está asociada con la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependiente. En este estudio no hemos medido la actividad ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en la membrana plasmática del hepatocito y un efecto de la DA sobre ella no puede descartarse. Se puede concluir entonces con las evidencias obtenidas que la DA provoca una disminución del FB de origen canalicular, mayormente atribuible a una in-

hibición de los mecanismos involucrados en la producción del FIAB.

En cuanto a la composición de la bilis, la DA no modificó la conc. de AB, aunque la velocidad de excreción biliar de los mismos, estuvo significativamente disminuída, sugiriendo una alteración de la secreción de AB. Asociada a este hecho, la disminución observada de CO y FL podría ser una consecuencia de la alteración de la secreción de AB ya que éstos son requeridos para la formación de micelas mixtas con CO y FL (235). Se ha descrito que algunas modificaciones en la dieta de animales puede alterar la relación AB/CO (236). Ello no fue observado en este estudio, donde el porcentaje molar de lípidos biliares no sufrió alteraciones, dando por resultado un índice de saturación de CO no modificado por la DA.

La disminución de la excreción biliar de PTB podría ser consecuencia de la caída de los niveles plasmáticos de proteínas totales y albúmina, ya que la mayor parte de las proteínas biliares de la rata son proteínas séricas (237). Se ha descrito que la deprivación proteica en ratas produce una disminución de los ribosomas unidos a membranas (24) siendo una de las mayores funciones de éstos sintetizar albúmina (238). Recientemente se ha demostrado que los AB pueden influenciar la secreción de proteínas en bilis a través de un aumento de la formación de vesículas endocíticas en la superficie celular (239). También se ha observado que la secreción de PTB no es afectada por variaciones del FB (229)(240).

Por lo tanto podemos concluir que la alteración de la excreción de PTB observada en las ratas alimentadas con DA, podría ser una consecuencia de una menor disposición de proteínas para

transporte, aunque la influencia de la disminución de la secreción de AB no puede ser descartada.

CAPITULO V

Influencia de la DA sobre el transporte hepático de BSF

1. Análisis Farmacocinético

1.1 Resultados

En la figura 11 se presenta un gráfico semilogarítmico de la desaparición plasmática de BSF, en el cual pueden observarse las fases rápida y lenta obtenidas para ambos grupos de animales. En DN la fase rápida fue lineal hasta los 6 min. y en DA hasta los 5 min. La fase lenta fue lineal desde los 14 min. hasta los 40 min. en ambos grupos.

Con este análisis se calculan los parámetros de la función biexponencial que describe todo el proceso de transferencia del colorante del plasma en bilis:

$$C_t = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

En la figura 12 se presenta el ajuste de la función biexponencial (calculada con los citados parámetros), a los resultados experimentales.

El análisis de la desaparición plasmática de BSF en los animales que recibieron DA mostró diferencias significativas en las pendientes α y β de las fases rápida y lenta (Tabla 10) con respecto a los controles. Además se observó una ligera disminución del V_c , probablemente relacionado con la alteración del V_p ya descripta. También se comprobó un considerable aumento de AUC y del $t_{1/2}$ de ambas fases. El Cl_p disminuyó 56 %.

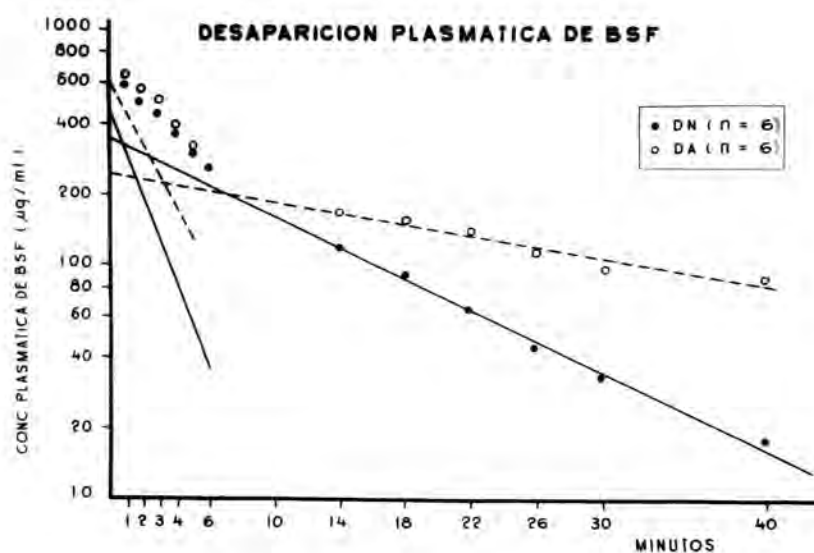


Fig. 11 : Fases rápida y lenta de la desaparición plasmática de BSF.

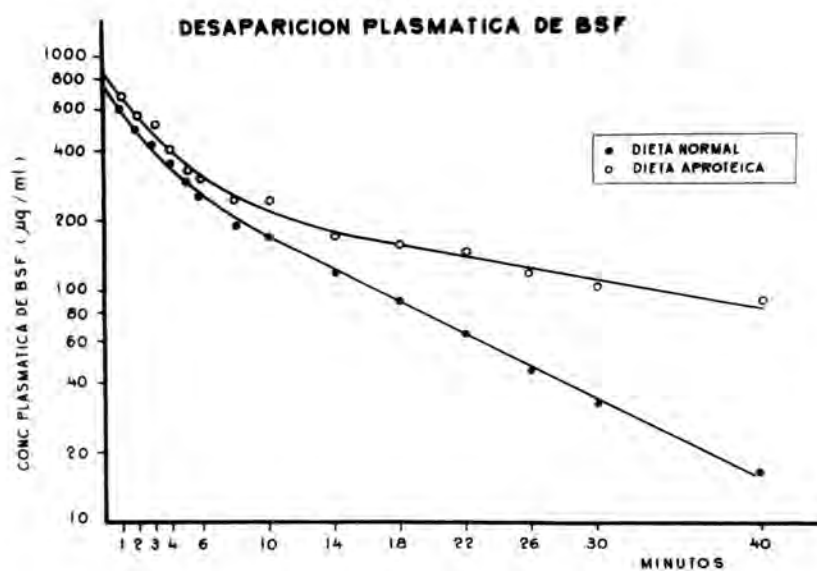


Fig. 12 : Ajuste de la función biexponencial a los resultados experimentales.

Cuando se analizaron las velocidades de transferencia de acuerdo con el modelo de Richards (196), se observó una disminución de la transferencia de BSF de plasma a hígado, del reflujo de hígado a plasma y de hígado a bilis, siendo esta última la que sufrió mayor alteración (-66 %).

Los datos se presentan en la Tabla 10

1.2 Discusión

El análisis de los parámetros farmacocinéticos en los animales que recibieron DA, sugieren una alteración general del proceso de transferencia del colorante del plasma a la bilis, lo cual es indicado por la disminución del Clp y por los aumentos observados en los $t_{1/2}$ de cada fase.

La considerable disminución de r_{23} , indicaría que la mayor alteración estaría a nivel de la excreción biliar del colorante, lo cual podría causar un aumento de la acumulación hepática de BSF. La disminución del eflujo a plasma podría estar asociada a un incremento de la fijación del colorante a componentes de membranas y/o a las proteínas citosólicas hepáticas. La alteración de r_{12} podría indicar una captación hepática ligeramente disminuida, aunque en este aspecto no podemos aventurar ninguna hipótesis debido a que en dicho proceso podrían estar involucrados transportadores de membrana.

Tabla 10 : Parámetros farmacocinéticos de BSF

	DN + BSF (n = 6)	DA + BSF (n = 6)	% de cambio
A ($\mu\text{g BSF/ml}$)	450	598	---
B ($\mu\text{g BSF/ml}$)	356	251	---
α (min^{-1})	0.390	0.310	(+)
β (min^{-1})	0.077	0.037	(+)
r_{12} (min^{-1})	0.251	0.227	- 10%
r_{23} (min^{-1})	0.119	0.040	- 66%
r_{21} (min^{-1})	0.095	0.073	- 23%
Vc (ml/100 g)	7.45	7.07	- 5 %
AUC ($\mu\text{g BSF/ml/min}$)	5779	11303	+ 95%
$t_{1/2}^{\alpha}$ (min)	1.78	2.24	+ 26%
$t_{1/2}^{\beta}$ (min)	9.00	26.00	+ 189%
Clp (ml/min)	2.92	1.30	- 56%

(+) diferente del control ($p < 0.05$)

2 Efecto de la DA sobre la excreción biliar de BSF

2.1 Resultados

Los animales alimentados con DA mostraron una considerable disminución de la velocidad de excreción biliar y de la concentración biliar del colorante a los 15, 30 y 45 min. de la inyección de BSF. Los resultados se presentan en la figura 13.

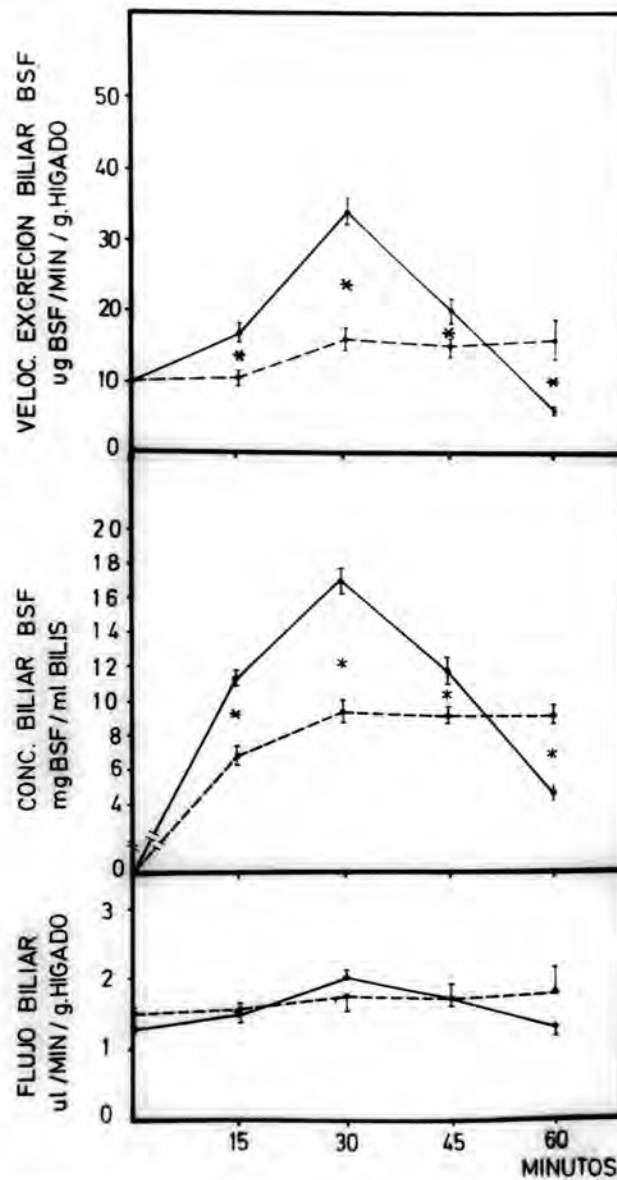


Fig. 13 : Efecto de la DA sobre la veloc.de excreción biliar de BSF, la conc.biliar y el flujo biliar.
Dieta normal (n=6), Dieta aprroteica (n=6), * diferente del control ($p < 0.05$), n: número de animales.

La excreción biliar acumulativa (expresada como % de dosis) fue menor en el grupo DA en todos los tiempos analizados. (Fig. 14). Al cabo de 60 min, el % de dosis excretado por el grupo DA fue 42 % menor que en los controles. No se observaron diferencias significativas en las proporciones de BSF libre y conjugada en bilis. Tampoco se encontraron diferencias en el flujo biliar promedio. Los datos se presentan en Tabla 11.

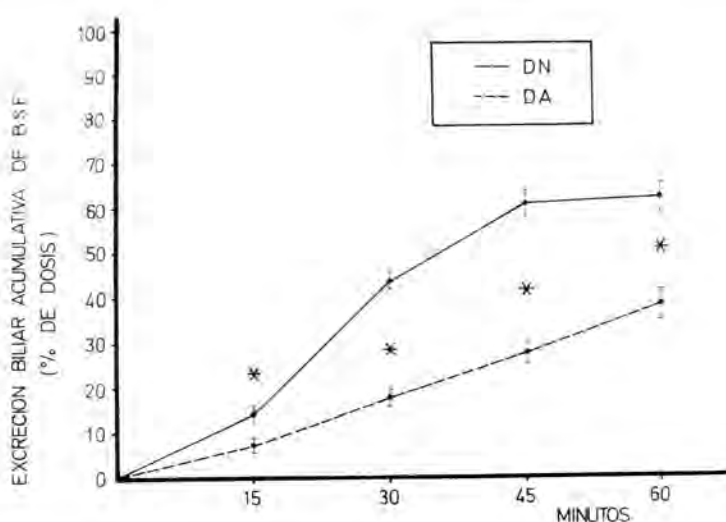


Fig. 14 : Efecto de la DA sobre la excreción biliar acumulativa de BSF. * diferente del control ($p < 0.05$).

2.2 Discusión

Los resultados presentados sobre la excreción biliar de BSF, confirman la presunción surgida del análisis farmacocinético, sobre una alteración de la transferencia del colorante de hígado a bilis en los animales que recibieron DA.

Las causas que pueden provocar la citada alteración son:

- a) disminución de la capacidad excretoria biliar (C.IV-2)

- b) disminución de la actividad GST hepática (C.IV-1.6) y de la conc. hepática de GSH (C.IV-1.2), lo cual proporcióna menor cantidad de colorante conjugado. Se ha descrito que el conjugado BSF-GSH es más fácilmente excretable por bilis (241) y que el aumento de BSF libre inhibe por su parte la excreción biliar del conjugado (242).
- c) si bien los porcentajes de colorante conjugado presente en bilis fueron similares, las cantidades totales de BSF excretadas al cabo de 60 min fueron sustancialmente menores en el grupo DA, lo cual indica una menor excreción total de colorante conjugado en bilis.

Tabla 11 : Efecto de la DA sobre la excreción biliar de BSF

	DN + BSF (n = 6)	DA + BSF (n = 6)	
% dosis excretada en 60 min.	66.3 ± 2.8	38.6 ± 3.2	*
Flujo biliar (µl/min/g híg.)	1.65 ± 0.08	1.72 ± 0.19	N.S.
% BSF conjugada en bilis	86.4 ± 2.9	77.3 ± 4.5	N.S.

n: número de animales, N.S.: no significativo.

* diferente del control (p < 0.05)

Los resultados descriptos hasta ese momento sugirieron una disminución de la capacidad de transporte hepático del colorante principalmente debida a la alteración de los mecanismos invo-

lucrados en la excreción biliar. La consecuencia de dicha alteración se supuso podría ser un aumento del almacenamiento hepático del colorante en los animales alimentados con DA.

3 Efecto de la DA sobre el Tm y el S de BSF

3.1 Resultados

Cuando se analizó el Tm, los animales alimentados con DA mostraron una disminución del 50 % del mismo respecto de los controles. Por lo contrario el S estuvo significativamente aumentado en estos animales (60 %). Los resultados se presentan en Tabla 12.

Tabla 12 : Efecto de la DA sobre el Tm y S de BSF

		Tm	S
	n	µg BSF/min/g.híg.	µg BSF/µg/ml/g.híg.
DN	5	43.00 ± 5.00	4.72 ± 0.85
DA	5	22.00 ± 4.00 *	7.56 ± 0.76 *

n: número de animales, * diferente del control (p < 0.05).

3 Discusión

Los resultados sugieren que la DA causa una disminución del Tm de BSF atribuible a una disminución de la capacidad excretoria biliar que a su vez ocasiona un aumento del almacenamiento hepático del colorante. Se ha descrito que la BSF se fija

a membranas (210) y que un aumento de su conc. intracelular puede alterar la actividad mitocondrial (211) (243). Además en el citosol hepático existen las proteínas fijadoras de aniones orgánicos (C.I-4.3).

Corresponde entonces analizar la participación de cada una de las posibilidades que hemos sugerido, como explicación del aumento de la acumulación hepática de BSF.

4 Influencia de la DA sobre la distribución intracelular hepática y la fijación de BSF a proteínas citosólicas hepáticas

4.1 Resultados

El porcentaje de la dosis inyectada captada por el hígado de las ratas alimentadas con DA fue 15 % menor que el recuperado en los animales que recibieron DN, lo cual concuerda con el análisis farmacocinético. Los datos se presentan en tabla 13. Cuando se analizó la distribución de BSF en "pellet" y sobrenadante de 105000 g se encontró en el grupo DA un aumento significativo de BSF en "pellet" y una disminucion en el sobrenadante.

No se observaron diferencias entre ambos grupos, cuando se analizó el porcentaje de colorante fijado a proteínas citosólicas hepáticas (tabla 13).

En la figura 15 se presenta la comparación de la distribución del colorante en "pellet" y sobrenadante de 105000 g y la fijación a proteínas citosólicas hepáticas.

Tabla 13 : Efecto de la DA sobre la distribución intracelular hepática de BSF.

	n	DN	DA	
% de dosis captada	5	22.7 ± 0.7	19.1 ± 1.7	*
% BSF en sobrenadante	5	69.6 ± 1.5	57.4 ± 1.7	*
% BSF en "pellet"	5	30.4 ± 1.5	42.6 ± 1.7	*
% BSF fijada a prot. citosólicas	5	62.9 ± 1.8	67.0 ± 1.7	N.S.

n: número de animales, * diferente del control (p < 0.05).

N.S.: no significativo.

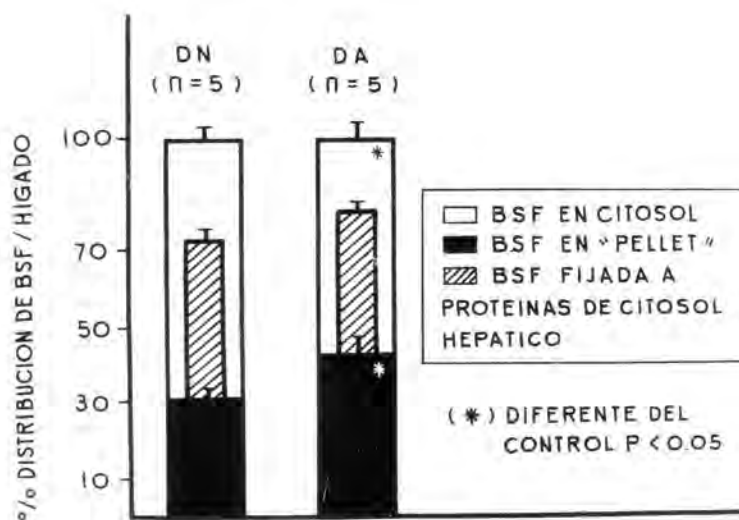


Fig. 15 : Efecto de la DA sobre la distribución intracelular hepática de BSF.

4.2 Discusión

Los resultados sugirieron, que como consecuencia de la acumulación hepática de BSF en los animales que recibieron DA, se produciría una saturación de la capacidad de fijación de las proteínas citosólicas hepáticas (cuya conc. estuvo también disminuída por la DA) y el colorante interactuaría con componentes de membranas. Leyhausen y Muller (213) han sugerido que existiría una fijación saturable a proteínas de citosol, que tendría alta afinidad pero baja capacidad; cuando este componente del citosol es saturado, el colorante quedaría disponible para fijarse a membranas. Ello explicaría la disminución del reflujo de hígado a plasma (r_{21}) observada en el grupo DA en los estudios farmacocinéticos.

CAPITULO VI

1 Análisis farmacocinético de DBSF

1.1 Resultados

En la figura 16 se presenta un gráfico semilogarítmico de la desaparición plasmática de DBSF en el que se pueden observar las fases rápida y lenta para cada grupo experimental.

La fase rápida fue lineal hasta los 6 min. en el grupo DN y hasta los 4 min. en el grupo DA. La fase lenta fue lineal para ambos grupos de animales desde los 14 a los 40 min.

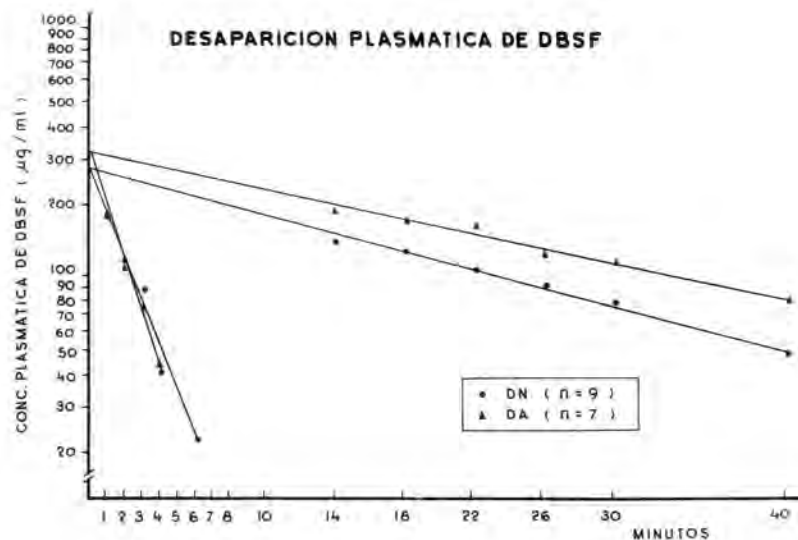


Fig. 16 : Efecto de la DA sobre las fases rápida y lenta de la desaparición plasmática de DBSF.

En la figura 17 se presenta el ajuste de la función biexponencial a los resultados experimentales. Los parámetros farmacocin

néticos se presentan en la tabla 14.

No se observaron diferencias significativas entre las pendientes α y β de las fases respectivas para los dos grupos de animales estudiados.

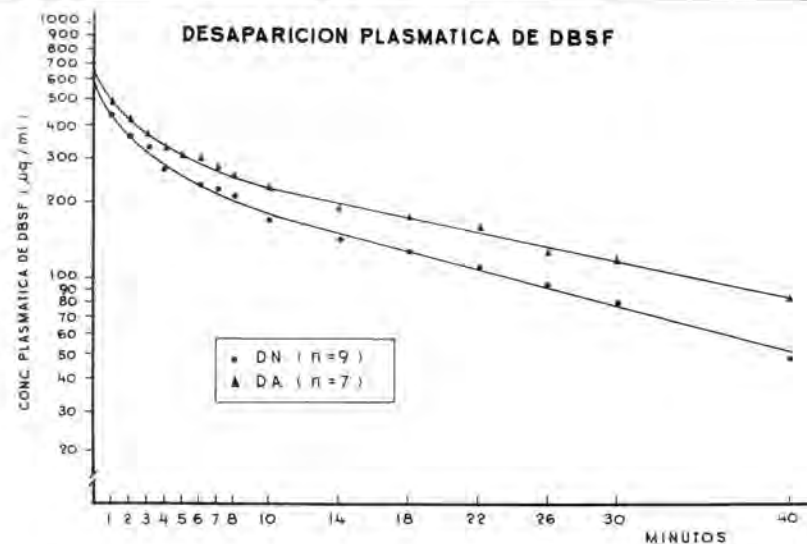


Fig. 17 : Ajuste de la función biexponencial a los resultados experimentales.

El V_c estuvo ligeramente disminuído en las ratas que recibieron DA. Se comprobó un aumento de AUC aunque no fue de la magnitud observada para la BSF.

No se observaron diferencias en el $t_{1/2}^{\alpha}$, aunque el $t_{1/2}^{\beta}$ estuvo aumentado en el grupo DA (21%). El Cl_p estuvo considerablemente disminuído (38%) en las ratas deficientes en proteínas. Cuando se calcularon las velocidades de transferencia para el modelo bicompartamental no se encontraron variaciones en la transferencia de plasma a hígado, observándose disminución de la transferencia de hígado a bilis y aumento del retorno a plasma (Tabla 14).

Tabla 14 : Parámetros Farmacocinéticos de DBSF

	DN + DBSF (n = 9)	DA + DBSF (n = 7)	% cambio
A ($\mu\text{g DBSF/ml}$)	286	287	---
B ($\mu\text{g DESF/ml}$)	270	321	---
α (min^{-1})	0.420	0.445	---
β (min^{-1})	0.040	0.033	---
r_{12} (min^{-1})	0.235	0.227	- 3 %
r_{23} (min^{-1})	0.071	0.064	- 10 %
r_{21} (min^{-1})	0.154	0.187	+ 21 %
V_c ($\text{ml}/100 \text{ g}$)	8.81	8.07	- 8 %
AUC ($\mu\text{g DBSF/ml/min}$)	7436	10362	+ 39 %
$t_{1/2}^{\alpha}$ (min)	1.65	1.56	- 6 %
$t_{1/2}^{\beta}$ (min)	17.33	21.00	+ 21 %
Cl_p (ml/min)	1.99	1.23	- 38 %

DN: dieta normal, DA: dieta apteica, n: número de animales.

1.1 Discusión

El análisis de los parámetros farmacocinéticos en los animales que recibieron DA mostró una alteración de la transferencia del colorante del plasma a la bilis, indicado por la disminución del Clp. El análisis del $t_{1/2}^{\alpha}$ de la fase rápida indica que el fenómeno global de la captación no habría sido alterado por la DA.

El aumento del $t_{1/2}^{\beta}$ sugiere daño a nivel de la etapa de secreción biliar.

El análisis de las constantes de las velocidades de transferencia indican alteración de la excreción biliar de DBSF. El aumento del retorno de hígado a plasma podría estar asociado a una saturación de la fijación del colorante a proteínas citosólicas hepáticas.

Además cabe considerar que al no existir un paso de biotransformación intermedio como requisito previo para la máxima velocidad de excreción biliar no se produciría acumulación hepática del colorante.

No existe sin embargo información en la bibliografía que describa la magnitud y características de la interacción de la DBSF con membranas del hepatocito.

2 Efecto de la DA sobre la excreción biliar de DBSF

2.1 Resultados

Los animales que recibieron DA mostraron una disminución de la velocidad de excreción biliar del colorante a los 45 y 60 min.

Como no se observaron diferencias en la conc. biliar, el responsable es el FB que estuvo significativamente disminuido a los 45 y 60 min. de la inyección de DBSF. Los datos se presentan en la figura 18.

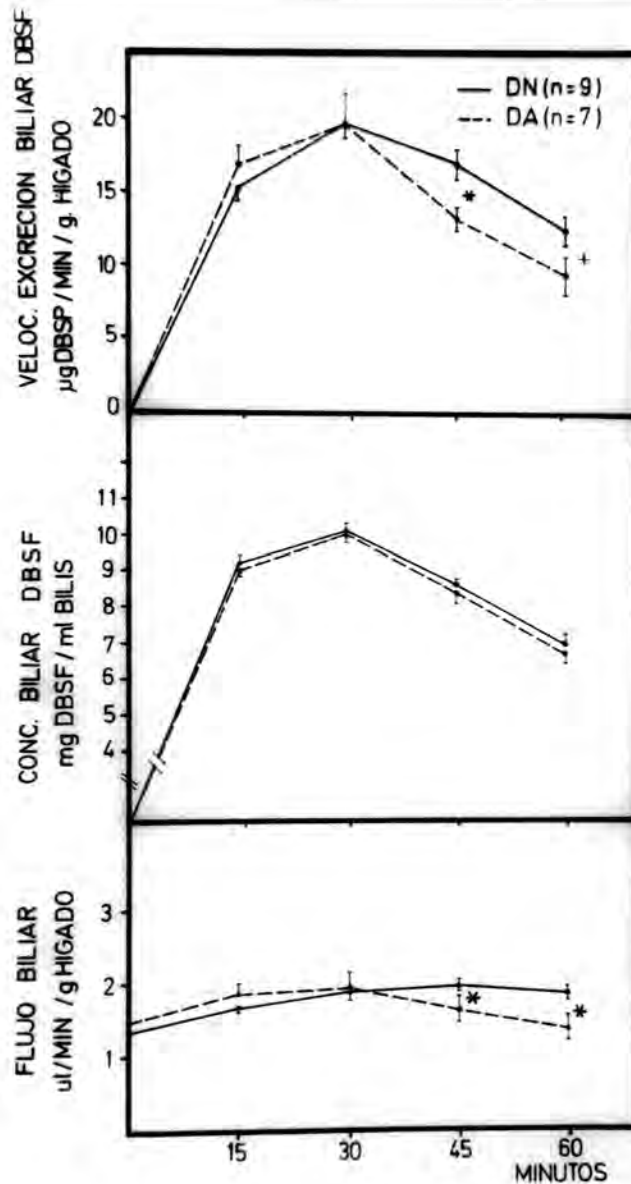


Fig. 18 : Efecto de la DA sobre la excreción biliar, conc. biliar y FB. * diferente del control ($p < 0.05$) + ($p < 0.1$)

El porcentaje de la dosis excretado en 60 min fue menor en el grupo DA (23 %) : $DN = 61.6 \pm 1.8$ (n = 9) y $DA = 47.7 \pm 3.2$ (n = 7) ($p < 0.05$). La excreción biliar acumulativa fue menor en DA a los 45 y 60 min. (Fig. 19). No se encontraron evidencias de conjugados de DBSF en bilis cuando se realizó el análisis cromatográfico de las citadas muestras.

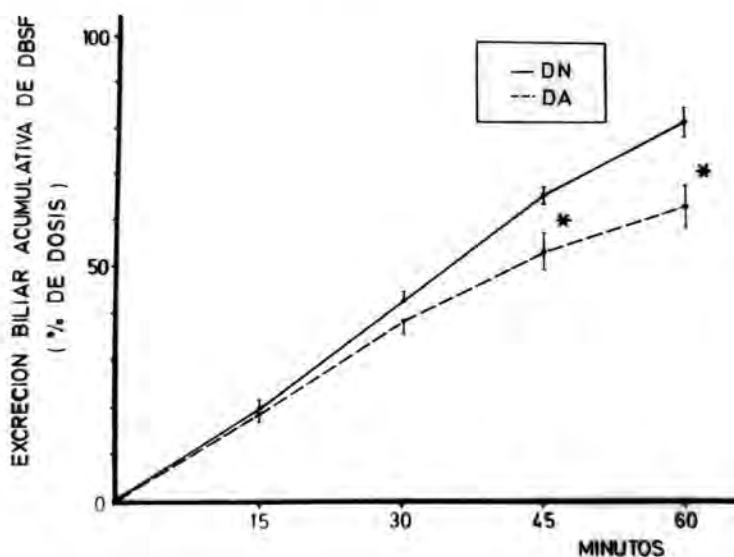


Fig. 19 : Efecto de la DA sobre la excreción biliar acumulativa de DBSF. * diferente del control ($p < 0.05$).

2.2 Discusión

Las evidencias hasta ahora presentadas indican que la DA altera la excreción biliar del colorante. La ausencia de metabolización hepática refuerza la hipótesis de que la citada alteración sería debido a una disminución de la capacidad excretoria biliar causada por la DA (C.IV-2). No se encontraron evidencias de acumulación hepática del colorante.

3 Efecto de la DA sobre el Tm y S de DBSF

3.1 Resultados

Cuando se analizó el Tm y el S de DBSF no se encontraron diferencias entre ambos grupos de animales. Los datos se presentan en Tabla 15.

Tabla 15 : Efecto de la DA sobre el Tm y S de DBSF

	n	Tm µg DBSF/min/g híg.	S µg DBSF/µg/ml/g híg.
DN	5	28.02 ± 1.50	3.60 ± 0.55
DA	5	33.72 ± 1.85	2.81 ± 0.28

3.2 Discusión

Como se había sugerido que el mecanismo secretor podía ser dañado por la DA, se pensó que esto debería ser reflejado en los estudios de Tm. Sin embargo no se observaron diferencias entre ambos grupos, lo cual indicaría que el fenómeno no podría ser visualizado cuando la carga del colorante excede la máxima velocidad de excreción. Klaassen y col. (244) han sugerido que en situaciones en la que la excreción biliar es la determinante mayor del transporte hepático del colorante, la citada excreción debería estar afectada por dosis que no exceden la máxima capacidad excretoria.

Carrillo y col. (245) han demostrado en ratas intoxicadas con

Aflatoxina B₁ (infundiendo BSF a distintas velocidades aunque siempre por debajo de la máxima capacidad excretoria biliar), que dichos animales alcanzan el mismo T_m que los testigos. Sin embargo se observó que la diferencia existía en la forma de alcanzar el T_m ya que la velocidad de excreción biliar estuvo desplazada en el tiempo respecto de los controles. Los citados autores sugirieron que la causa de dicho fenómeno sería un efecto de la droga sobre la afinidad de los transportadores involucrados en la captación y/o excreción biliar del colorante.

4 Efecto de la DA sobre la distribución intracelular hepática y la fijación de DBSF a proteínas citosólicas hepáticas

4.1 Resultados

El porcentaje de la dosis inyectada captada por el hígado de las ratas que recibieron DA fue menor (34 %) que el de los controles.

Los datos se presentan en Tabla 16.

No se observaron diferencias en los porcentajes de DBSF en "pellet" y sobrenadante de 105000 g, como tampoco en el porcentaje de colorante fijado a proteínas citosólicas hepáticas.

Los resultados se presentan en la figura 20.

Tabla 16 : Efecto de la DA sobre la distribución intracelular hepática de DBSF y la fijación a proteínas citosólicas hepáticas.

	n	DN	DA	
% de dosis captada	4	26.3 ± 0.7	17.3 ± 0.9	*
% DBSF en sobrenadante	4	60.5 ± 1.6	57.3 ± 1.1	N.S.
% DBSF en "pellet"	4	39.5 ± 1.6	42.7 ± 1.1	N.S.
% DBSF fijada a prot.citosólicas	4	53.0 ± 1.1	50.4 ± 3.1	N.S.

n: número de animales, * diferente del control ($p < 0.05$).

N.S.: no significativo.

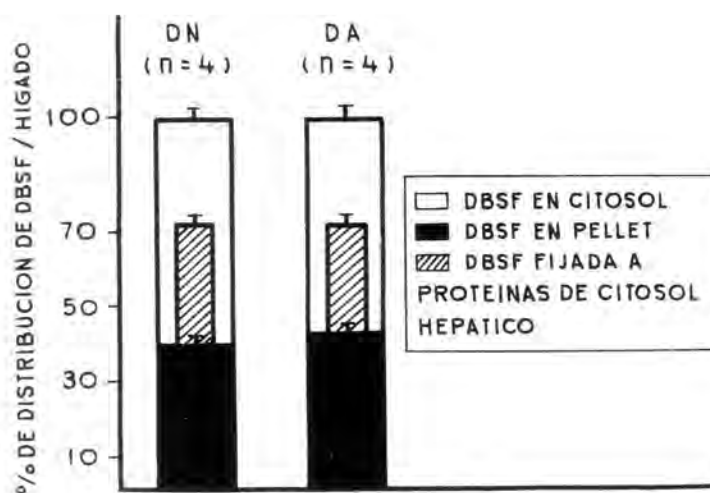


Fig. 20 : Efecto de la DA sobre la distribución intracelular hepática y la fijación de DBSF a proteínas citosólicas hepáticas.

4.2 Discusión

La menor recuperación hepática de colorante en el grupo DA con firma la presunción del análisis farmacocinético, de un incremento del retorno a plasma (r_{21}).

La observación de que no existe diferencia en el porcentaje de colorante fijado a proteínas citosólicas hepáticas podría sugerir saturación de la capacidad de fijación de las mismas.

Los porcentajes fijados (menores que para BSF) confirmarían algunas observaciones hechas por otros autores (204) que indican una menor constante de asociación de DBSF a las citadas pro teínas.

El hecho de que los porcentajes de colorante fijado a "pellet" y sobrenadante no fueran diferentes entre ambos grupos, indica ría que no se produce acumulación hepática de DBSF, lo cual con firma la determinación experimental del S.

Las evidencias presentadas sugieren que por causa de la DA exis te una célula hepática de menor tamaño con una capacidad de transporte de colorante disminuída que requiere menos cantidad del mismo para equilibrarse con el medio. Ello implicaría una saturación más rápida, lo que originaría un reflujo a plasma aumentado y en consecuencia una mayor presencia del colorante en la circulación.

La alteración producida en el mecanismo de excreción biliar, sería la causa responsable de la transferencia alterada del co lorante desde el plasma a la bilis.

5 Influencia de la DA sobre la fijación de BSF y DBSF a proteínas plasmáticas

5.1 Resultados y discusión

Para estimar la fijación de colorante a las proteínas plasmáticas se calculó la fracción unida a dichas proteínas (Fu).

$$Fu = \frac{\text{concentración de colorante unido a prot. plasmáticas}}{\text{concentración total de colorante en plasma}}$$

En la tabla 17 se presentan los resultados obtenidos para suero y plasma y para BSF y DBSF en animales alimentados con DN y DA. Generalmente se acepta que la fijación de drogas u otras sustancias por el plasma o por el suero son equivalentes, existiendo pocos estudios que comparan la interacción en ambos fluidos (246)(247). En nuestro caso se comparó la fijación de la BSF a suero obtenido de ratas alimentadas con DN y con DA (tabla 17), mostrando los resultados una Fu comparable a la descrita en la literatura. Por lo contrario cuando se comparó la Fu en plasma de animales heparinizados "in vivo" (en condiciones idénticas a las de los ensayos farmacocinéticos) y cuyas muestras de plasma habían permanecido a temperatura ambiente luego de la extracción, se encontró una considerable disminución de la Fu (19%).

Se pensó entonces en una interferencia de la heparina, tal como ocurre para otras sustancias como bilirrubina, etc. Se realizaron una serie de experimentos en los que se estimó la Fu en suero en presencia de heparina en conc. similares a las agregadas "in vivo". Los resultados no mostraron diferencias con las Fu

obtenidas con suero, descartándose por ello la interferencia directa del anticoagulante en el proceso de fijación.

Se ha descrito que la heparina provoca en humanos y en animales, una liberación de lipasa hepática y de lipasa lipoproteica del endotelio capilar lo cual conduce a un aumento de la conc. plasmática de ácidos grasos no esterificados provocado por la hidrólisis de los triglicéridos.

Algunos autores han demostrado que 100 U de heparina i.v. pueden duplicar el nivel de ác. grasos en plasma dentro de un período de 5 - 10 min posteriores a la inyección (248).

También se ha descrito (249) que las perturbaciones de la fijación son artefactos debidos a la formación continua "in vitro" de ác. grasos libres, por las lipasas liberadas "in vivo" y que continúan su actividad cuando la muestra de sangre es mantenida a temperatura ambiente. Por ello se ha sugerido incubar rápidamente a 0°C el plasma heparinizado "in vivo" ya que de esa manera el aumento de la conc. de ác. grasos es mínimo (250).

Pensando como posibilidad que los ác. grasos inhiban competitivamente la fijación de los aniones orgánicos utilizados, se realizaron experimentos manteniendo en frío la sangre después de la extracción y separando el plasma en las mismas condiciones. Los resultados mostraron F_u inferiores a las obtenidas con suero (lo cual indica una probable interferencia de los ác. grasos liberados durante el período de 5 min en el que actúa la heparina). Sin embargo los valores de dichas F_u fueron superiores a los obtenidos con el plasma mantenido a temperatura ambiente. La mayor diferencia se encontró en los animales alimentados con DA, ya que por causa de la dieta estos tienen mayores niveles de lípidos circulantes. Aparentemente el efecto de la actividad

Tabla 17 : Efecto de la DA sobre la fijación de BSF y DBSF a las proteínas del plasma.

	n	Fu		
		BSF + DN	BSF + DA	
Plasma heparinizado "in vivo" (mantenido a 0°C)	4	0.81 ± 0.02	0.79 ± 0.02	N.S.
Suero	4	0.95 ± 0.01	0.96 ± 0.02	N.S.
Suero + heparina	4	0.92 ± 0.02	-----	
Plasma hepariniz. "in vivo" (mantenido a temp.ambiente)	6	0.77 ± 0.02	0.65 ± 0.04	*
		DBSF + DN	DBSF + DA	
Plasma hepariniz. "In vivo" (mantenido a 0 °C)	4	0.73 ± 0.01	0.75 ± 0.03	N.S.
Plasma hepariniz. "in vivo" (mantenido a temp.ambiente)	6	0.58 ± 0.02	0.50 ± 0.04	*

Fu : fracción unida a proteínas del plasma, n: número de animales, * diferente del control (p < 0.05), N.S.:no significativo.

lipolítica fue mayor en el plasma de estos animales cuando no se mantenían las condiciones de temperatura, disminuyendo por consiguiente la F_u significativamente.

Cabe destacar que en los experimentos realizados con plasma de animales heparinizados "in vivo" y mantenido a 0°C no se observaron diferencias entre los valores de F_u de ambos grupos experimentales, como tampoco cuando se compararon los de F_u en suero. Ello indicaría que a pesar de las disminuciones de las concentraciones de PTP y AP observadas por causa de la DA, para las conc. utilizadas de colorantes se mantuvo la capacidad de fijación.

Los resultados hallados con DBSF mostraron una F_u menor que las de BSF, probablemente debido a la diferencia de la constante de asociación a la AP (BSF tiene una K_a del orden de 10^6 y DBSF de 10^5) (126) (251), lo que haría la fijación probablemente más fácilmente desplazable por los ác. grasos. Tampoco existieron diferencias entre los valores de F_u de los grupos DA y DN. Podemos concluir entonces que la DA no altera la fijación de los colorantes por las proteínas del plasma, habiéndose encontrado una inhibición de la fijación probablemente debida a la competencia de los ác. grasos libres por los sitios de fijación en las citadas proteínas.

Si bien es difícil discernir si el desplazamiento de la fijación causado por el uso del anticoagulante puede alterar la farmacocinética de los aniones utilizados, se debería haber hallado por ejemplo un aumento del V_d debido a la mayor interacción de la fracción libre del colorante con distintos tejidos extrahepáticos. Ello no fue observado debido probablemente a la rapidez con que el hígado extrae los colorantes de la circulación.

CAPITULO VII

1 Conclusiones

En numerosos trabajos se han analizado intensamente los mecanismos de producción de bilis, y del transporte de aniones orgánicos, como así también la influencia de distintas drogas y agentes químicos sobre los citados mecanismos.

Sin embargo el efecto de la carencia de proteínas en la dieta sobre la secreción biliar y sobre el transporte hepático de dichos componentes no han sido descriptos.

El propósito de este estudio fue determinar en una primera etapa el efecto de la DA sobre distintos parámetros bioquímicos y fisiológicos involucrados en el transporte hepático de aniones orgánicos.

Para ello se realizaron los siguientes estudios:

- i - análisis de los efectos generales de la DA
- ii - análisis de los efectos de la DA sobre el hígado
- iii - estudio de la posible alteración de la secreción biliar causada por la DA

Las respuestas a los interrogantes planteados fueron:

- i - La DA provoca una disminución del PC, del PH (de mayor magnitud) y de la relación PH/PC. Además disminuyeron las PTP, la AP y el VP.
- ii - Se comprobó que la DA no afecta el número de células

hepáticas, pero disminuye su tamaño y contenido proteico. Se encontró también que se produce retención de agua, probablemente a expensas del líquido extracelular. También disminuyeron las PTH, el GSH y la actividad GST.

- iii - Se pudo establecer que la DA produce una disminución del FB canalicular el cual puede ser atribuido, sobre todo a una alteración de la fracción independiente de AB, aunque no podría descartarse que la fracción dependiente de AB podía estar también afectada. El mecanismo responsable podría estar relacionado con una disminución de la actividad ATPasa - $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependiente y/o con una disminución de la síntesis de AB.

La DA ocasionó una alteración de la excreción de los componentes biliares. Se observó una disminución de la velocidad de excreción de AB (aunque la conc. alcanzada en bilis fue mayor que la conc. micelar crítica). También se observaron disminuciones de las velocidades de excreción biliar de CO y FL, pero ello podría estar asociado con la disminución de la excreción de AB. La conc. de los componentes biliares no estuvo alterada y el índice de saturación de CO no se vió afectado. También la DA provocó una disminución de la velocidad de excreción de PTB, probablemente debido a una menor disposición de proteínas para el transporte hepático y excreción biliar.

En una segunda etapa se investigaron los efectos de la DA sobre

el transporte hepático de BSF (anión conjugado previamente a su excreción) y DBSF (que no sufre biotransformación), considerados modelos para el estudio del citado transporte. Se realizaron las siguientes investigaciones:

- 1 - análisis farmacocinético de la desaparición plasmática de BSF y DBSF
- 2 - análisis de la conjugación de BSF y de la velocidad de excreción biliar de BSF y DBSF
- 3 - estudio del transporte hepático máximo y de la capacidad relativa de almacenamiento de BSF y DBSF
- 4 - análisis de la distribución intracelular hepática y de la fijación de BSF y DBSF a proteínas citosólicas hepáticas
- 5 - análisis de la fijación de BSF y DBSF a proteínas plasmáticas

Se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- i - La DA afecta el transporte hepático de BSF debido a las alteraciones producidas en los mecanismos de conjugación y excreción biliar. Afecta también el transporte máximo disminuyéndolo y aumentando el almacenamiento hepático relativo del colorante. Los defectos observados en la conjugación y excreción son causa de la acumulación hepática del colorante el cual interactuaría con componentes de membrana fi-

jándose a las mismas.

ii - La DA altera el transporte hepático de DBSF probablemente a través del mecanismo involucrado en la excreción biliar del colorante. No afecta el transporte máximo del mismo como tampoco el almacenamiento hepático relativo ni la distribución intracelular hepática.

iii - La DA no altera la capacidad de fijación de BSF y DBSF a las proteínas plasmáticas.

2 Resumen

El objetivo de las presentes investigaciones fue analizar los mecanismos por los cuales la carencia de proteínas en la dieta de ratas adultas altera el transporte hepático de aniones orgánicos.

Se eligió como modelo experimental la rata entera. El período de administración de la dieta aprotéica (DA) fue de 7 días, debido a que durante ese lapso no se producen alteraciones histológicas hepáticas.

Los aniones orgánicos utilizados fueron la Bromosulfoftaleína (BSF) y la Dibromosulfoftaleína (DBSF) considerados modelos representativos para el estudio de la función hepática.

Ambos aniones comparten prácticamente los mismos pasos en el transporte hepático, a excepción de la conjugación ya que la BSF es conjugada con glutatión como paso previo a su excreción biliar mientras que la DBSF no es metabolizada.

En una primera etapa se planteó analizar los posibles efectos de la DA sobre distintos parámetros bioquímicos y fisiológicos que pudieran estar involucrados en el transporte hepático de los citados aniones.

Para descartar la posibilidad de que otras deficiencias, además de la proteica, pudieran complicar esta investigación, se estmó el consumo de alimento, no encontrándose diferencias entre ambos grupos cuando dicho parámetro fue expresado por unidad de peso corporal.

La administración de la DA causó una disminución del peso corporal en todos los animales, como así también del peso del hígado, aunque este fue de mayor magnitud.

El hígado sufrió modificaciones severas por la administración de la DA, encontrándose alteraciones en la distribución del agua (retención de agua, probablemente a expensas del volumen extracelular), en el tamaño celular (hipotrofia) y en el contenido proteico de las células.

Las proteínas totales hepáticas, el glutathion hepático y la actividadadadaglutations-transferasa disminuyeron considerablemente por DA, indicando una alteración del sistema de conjugación y probablemente de la capacidad de fijación de las proteínas citosólicas hepáticas (estimada indirectamente por medio de la actividad glutathion s-transferasa),

Las concentraciones plasmáticas de proteínas totales y albúmina se encontraron disminuídas, lo cual sugirió probables alteraciones de la fijación de los citados aniones a las mismas. Debido a la importancia que tiene la secreción biliar en la eliminacion de sustancias endógenas y exógenas por el hígado, se analizó el probable efecto de la DA sobre los mecanismos de pro

ducción de bilis y sobre la composición de la misma.

Se encontró una disminución de la secreción biliar de origen canalicular (descartándose reabsorción o secreción de fluidos) atribuible mayormente a los mecanismos productores de la fracción del flujo independiente de ácidos biliares. Sin embargo no pudo descartarse una participación de la fracción dependiente de ác. biliares, ya que la velocidad de excreción biliar de los mismos estuvo disminuída.

En cuanto a la composición de la bilis, no se encontraron diferencias en las concentraciones biliares de ác. biliares, colesterol, fosfolípidos y proteínas totales biliares, aunque sí en las velocidades de excreción biliar de los mismos, las cuales estuvieron significativamente disminuídos por la DA.

Se sugirió que la causa probable de las excreciones disminuídas de colesterol y fosfolípidos fuera debida a la alteración de la excreción de los ác. biliares y la de las proteínas totales biliares a una menor disposición de proteínas para el transporte biliar, ya que la mayor parte de las citadas proteínas son de origen plasmático.

Todas estas alteraciones indicaron que la eliminación biliar de sustancias transportadas por el hígado es interferida en forma manifiesta por la DA.

En una segunda parte de las investigaciones se analizó el efecto de la DA sobre el transporte hepático de la BSF y DBSF.

El análisis farmacocinético mostró un aumento de los tiempos de vida media de las fases rápida y lenta de la desaparición plasmática sugiriendo una alteración general del proceso de transferencia del colorante del plasma a la bilis. La disminución del "clearance" plasmático hizo suponer además una menor

capacidad de depuración de BSF. El análisis bicompartamental indicó la existencia de alteraciones a nivel de la transferencia desde plasma a hígado, del retorno de hígado a plasma y de la transferencia de hígado a bilis, siendo este parámetro el más afectado por la privación proteica.

Cuando se analizó la velocidad de excreción biliar de BSF y el porcentaje de dosis excretado en 60 min se confirmaron las presunciones surgidas del análisis farmacocinético al observarse una considerable disminución de la velocidad y cantidad de colorante conjugado excretado en bilis. Ello pudo ser atribuido a dos causas probables:

- la disminución de glutatión y de la actividad glutatión-s-transferasa provoca una menor velocidad de conjugación de BSF y por ende una menor disposición del conjugado glutatión-BSF para su excreción, contribuyendo el exceso de BSF libre en el hígado a la inhibición de la excreción del conjugado.

- la disminución de la capacidad secretora biliar.

Los estudios del transporte hepático máximo y de la capacidad relativa de almacenamiento hepático, mostraron una disminución del primero y un aumento de la segunda, confirmando los resultados obtenidos por el análisis farmacocinético.

A fin de establecer la distribución del colorante almacenado, se analizó el mismo en el "pellet" y sobrenadante de 105000 g. Los resultados mostraron un aumento del colorante fijado al "pellet" del grupo DA, aunque la proporción de colorante fijado a las proteínas citosólicas no sufrió variaciones por causa de

capacidad de depuración de BSF. El análisis bicompartamental indicó la existencia de alteraciones a nivel de la transferencia desde plasma a hígado, del retorno de hígado a plasma y de la transferencia de hígado a bilis, siendo este parámetro el más afectado por la privación proteica.

Cuando se analizó la velocidad de excreción biliar de BSF y el porcentaje de dosis excretado en 60 min se confirmaron las presunciones surgidas del análisis farmacocinético al observarse una considerable disminución de la velocidad y cantidad de colorante conjugado excretado en bilis. Ello pudo ser atribuido a dos causas probables:

- la disminución de glutatión y de la actividad glutatión-s-transferasa provoca una menor velocidad de conjugación de BSF y por ende una menor disposición del conjugado glutatión-BSF para su excreción, contribuyendo el exceso de BSF libre en el hígado a la inhibición de la excreción del conjugado.

- la disminución de la capacidad secretora biliar.

Los estudios del transporte hepático máximo y de la capacidad relativa de almacenamiento hepático, mostraron una disminución del primero y un aumento de la segunda, confirmando los resultados obtenidos por el análisis farmacocinético.

A fin de establecer la distribución del colorante almacenado, se analizó el mismo en el "pellet" y sobrenadante de 105000 g. Los resultados mostraron un aumento del colorante fijado al "pellet" del grupo DA, aunque la proporción de colorante fijado a las proteínas citosólicas no sufrió variaciones por causa de

ción previa a la excreción biliar, probablemente limitante de la misma, la transferencia de DBSF del plasma a la bilis puede ser alterada por el defecto de la excreción biliar, cargándose la célula más rápidamente por su menor tamaño, saturándose las proteínas citosólicas hepáticas y aumentando el retorno a plasma, probablemente por las características de una menor reactividad de DBSF con membranas.

El análisis del efecto de la dieta sobre la fijación de los dos colorantes a las proteínas del plasma, mostró que a pesar de la disminución de éstas se mantuvo la capacidad de fijación para las concentraciones utilizadas.

Se describió finalmente que el uso de un anticoagulante como la heparina puede provocar distorsiones en el análisis de la fijación "in vitro", debido a que provocaría una liberación de ácidos grasos a partir de triglicéridos (a través de la liberación de lipasa hepática y lipasa lipoproteica) los cuales a su vez podrían inhibir competitivamente la fijación de los colorantes a las proteínas plasmáticas.

3 Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Emilio A. Rodriguez Garay por haberme brindado la posibilidad de trabajar en su Instituto y por la permanente dedicación con que dirigió este trabajo de tesis.

Deseo agradecer también a:

el Dr. Meny Bergel por haberme iniciado en la investigación.

el Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas por las Becas concedidas que permitieron la realización de este trabajo.

la Bioq. María C. Carrillo por haberme brindado su colaboración y constante apoyo en la realización de todos los trabajos que componen esta tesis.

a la Dra. María M. Elías por sus valiosas críticas.

a los Bioq. J.M.Pellegrino, Susana A. Galeazzi, Edgardo Guibert y Juan A. Monti por su colaboración en parte de los estudios.

al Prof. Dr. Horacio Hernandez por su colaboración en los estudios histológicos.

4 BIBLIOGRAFIA

- 1 - Barnes, R.H., Reid, I.M., Pond, W.G. and Moore, A.U.(1967) The - use of experimental animals in studying behavioural abnormalities following recovery from early malnutrition. In "Calorie deficiencies and protein deficiencies." (R.A.McCance and E.M. Widdowson - Ed.) J&A Churchill Ltd.London pp.277-286.
- 2 - Boyd, E.M.(1972) "Protein deficiency and pesticide toxicity" Charles C.Thomas Publishers, Springfield Illinois.
- 3 - Miller, L.L.and Whipple, G.H. (1940) Chloroform liver injury increases as protein stores decrease. Am.J.Med.Sci.199:204-216.
- 4 - Wallace , L.R.(1948) Growth of lambs before and after birth in relation to the level of nutrition. J.Agr.Sci.38:93-101.
- 5 - Benton, A.W., Morse, R.A.and Gunnison, A.F.(1964) Bee venom tolerance in White mice in relation to the diet.Science 145:1448-1449.
- 6 - Field, H.B.and Dam.H.(1946) Influence of diet on plasma fibrinogen in the chick.J.Nutr.31:509-523.
- 7 - Deo, M.G.(1978) Cell Biology of protein-calorie malnutrition. World Rev.Nutr.Diet.32:49-95.
- 8 - Taylor, D.J.and Greenberg, J.(1955) Hyperactivity of metachloridine against plasmodium gallinaceum in chicks maintained on a purified diet. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.90:551-554.
- 9 - Miranda, C.L.and Webb, R.E.(1973) Effects of dietary protein quality on drug metabolism in the rat.J.Nutr.103:1425-1430.
- 10 - Ross, M.H.(1961) Length of life and nutrition in the rat.J.Nutr. 75:197:210.
- 11 - Kirsch, R., Firth, L., Black, E. and Hoffenberg, R.(1968) Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. Nature 217: 578-579.

- 12 - McCance, R.A. and Widdowson, E.M.(1966) Protein deficiencies and calorie deficiencies. *Lancet* 2:158-159.
- 13 - Sidransky, H. and Farber, E.(1958) Chemical pathology of acute amino acid deficiencies. *Arch.Pathol.*66:119-134.
- 14 - Mendez, J.and Tejada, C.(1962) Liver composition in Kwashiorkor - and marasmus.**Exp.Molec.Pathol.**1:344-352.
- 15 - Campana, A.O., Burini, R.C., Outa, A.Y. and De Camargo, J.L.V. (1975) Experimental protein deficiency in adult rats.*Rev. Bras. de Pesquisas Med.Biol.*8:221-226.
- 16 - De Camargo. J.LV.,Angeleli, A.Y.O., Burini, R.C. and Campana, A. O.(1978) Hepatic lesions in protein-deficient adult rats.*Br.J. Exp.Pathol.*59:158-166.
- 17 - Porta, E.A. and Hartroft, W.S.(1970) Protein deficiency and Li - ver injury. *Am. J.Clin.Nutr.*23:447-453.
- 18 - Madı, K.,Jervis, H.R.Anderson, P.R. and Zimmerman, M.R.(1970) A protein deficient diet:effect on the liver, pancreas, stomach - and small intestine of the rat.*Arch.Pathol.*89:38-52.
- 19 - Deo, M.G., Sood, S.K. and Ramalingaswami, V. (1965) Experimental protein deficiency. *Arch.Pathol.*80:14-23.
- 20 - Hoyumpa, A.M., Greene, H.L., Dunn, G.D.and Schenker, S.(1975) - Fatty liver: biochemical and clinical considerations. *Dig.Dis.* 20:1142-1150.
- 21 - Svoboda, D., Grady, H. and Higginson, J.(1966) The effects of - chronic protein deficiency in rats.II - Biochemical and ultra - structural changes. *Lab.Invest.*15:731-749.
- 22 - Campbell, R.M. and Kosterlitz, H.W. (1948) Effect of dietary pro - tein on turnover of phospholipids, ribonucleic acid and desoxy - ribonucleic acid in liver. *J.Biol.Chem.*175:989-997.

- 23 - Hayase, K. and Yoshida, A. (1980) Effect of dietary level of protein on turnover of liver protein in rats. *Nutr.Rep.Inter.* 22: 69-77.
- 24 - Christensson, P.I. and Stenram, U. (1980) Free and membrane bound ribosomes and NADPH-Cytochrome C.Reductase activity in the liver cells of protein-fed and protein-deprived rats. *Upsala J.Med.Sci.* 85:19-27.
- 25 - Garlick, P.J., Millward, D.J., James, W.P.T. and Waterlow, J.C. (1975) The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochem. Biophys.Acta* 414:71-79.
- 26 - Sidransky, H. (1976) Nutritional disturbances of protein metabolism in the liver. *Am.J.Pathol.* 84:649-662.
- 27 - Waterlow, J.C. and Stephen, J.M.L. (1968) The effect of low protein diets on the turnover rates of serum, liver and muscle proteins in the rat, measured by continuous infusion of $\Delta [^{14}\text{C}]$ - Lysine. *Cin.Sci.* 35:287-306.
- 28 - Stenram, U. and Nordgren, H. (1970) Ultrastructural organization - and RNA turnover of hepatic ribosomes in protein-fed and protein-deprived rats. *Cytobios* 2:265-275.
- 29 - Stenram, U., Nordgren, H. and Willen, R. (1969) Effects of DDT on ultrastructure and RNA and protein labelling in the liver of protein-fed and protein-deprived rats. *Cytobios* 1:51-63.
- 30 - Brock, J.F. (1966) Dietary protein deficiency: its influence on body structure and function. *Ann.Intern.Med.* 65:877-899.
- 31 - Kelman, L., Saunders, S.J., Firth, L., Wight, S. and Corrigan A. (1972) Effects of dietary protein restriction on albumin synthesis, albumin catabolism and the plasma aminogram. *Am.J.Clin.Nutr.* 25:1174-1178.
- 32 - Kirsch, R.E., Saunders, S.J. and Brock, J.F. (1968) Animals models

- and protein-calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 21:1225-1228.
- 33 - Morgan, E.H. and Peters T.J. (1971) The biosynthesis of rat serum albumin. v.-Effect of protein depletion and refeeding on albumin and transferrin synthesis. *J. Biol. Chem.* 246:3500-3507.
- 34 - Harano, T. and Omura, T. (1977) Biogenesis of endoplasmic membrane in rat liver cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 82:1541-1549.
- 35 - Campbell, T.C. (1977) Nutrition and drug metabolizing enzymes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 22:699-706.
- 36 - Campbell, T.C. and Hayes, J.R. (1974) Role of nutrition in the drug-metabolizing enzyme system. *Pharmacol. Rev.* 26:171-197.
- 37 - Hospador, M.A. and Manthei, R.W. (1969) Influence of age and diet on the induction of hexobarbital-metabolizing enzymes in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128:130-132.
- 38 - Varma, D.R. (1981) Protein deficiency and drug interactions. A Review. *Drug. Develop. Res.* 1:183-198.
- 39 - Gasterline, J.L. and Williams, C.H. (1969) Effect of pesticide administration upon esterase activities in serum and tissues of rats fed variable casein diets, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 14:266-275.
- 40 - Kato, R., Oshima, T. and Tomizawa, S. (1968) Toxicity and metabolism of drugs relation to dietary protein. *Jnp. J. Pharmacol.* 18:356-366.
- 41 - Mc Lean, A.E.M. and McLean, E.K. (1969) Diet and Toxicity. *Br. Med. Bull.* 25:278-281.
- 42 - Shastri, R.A. and Krishnaswamy, K. (1976) Undernutrition and tetracycline half-life. *Clin. Chim. Acta* 66:157-164.
- 43 - Yue, T.D. and Varma, D.R. (1981) Pharmacokinetics, metabolims and disposition of salicylate in protein-deficient rats. *Drug Met. - Disp.* 10:147-152.

- 44 - Friedman, L. (1966) Nutritional status and biological response. Fed.Proc.25:137-144.
- 45 - Chandra, R.K.(1977) Immunoglobuling and antibody response in protein-calorie malnutrition. A review in "Malnutrition and the immune response" (R.M.Suskind Ed.)Raven Press.New York pp.155-190.
- 46 - Wheeler, H.O.(1968) Water and electrolites in bile. In "Hand - book of Physiology" Sect.6 Alimentary canal. Sect.6 Alimentary canal.American Physiological Soc., Washington, D.C. vol.5 pp.2409-2431.
- 47 - Steiner, J.W., Carruthers, J.S.(1961) Studies on the fine tree. I-The morphology of normal bile canaliculi, bile preductules - (ducts of Hering)and bile ductules. Am.J.Pathol.38:639-661.
- 48 - Novikoff,A.B.and Essner, E.(1960) The liver cell. Some new approaches to its study.Am.J.Med.29:102-131.
- 49 - Rappaport, A.M.(1980) Hepatic blood flow.In "Liver and biliary tract Physiology 1".(N.B.Javitt Ed.) University Park Press,Baltimore. vol.21 pp.1-63.
- 50 - Rappaport, A.M., Borowy, Z.L.,-Lougheed, W.M.and Lotto, w.N. - (1965) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit.Role in hepatic physiology and pathology. Anat.Rec.119:11-27.
- 51 - Gumucio, J.J. and Miller, D.L.(1981) Functional implications of liver cell heterogeneity. Gastroenterology 80:393-403.
- 52 - Jungermann, K. and Katz, N. (1982) Functional hepatocellular heterogeneity. Hepatology 2:385-395.
- 53 - Miller, D.L., Zanolli, C.S. and Gumucio, J.J.(1979) Quantitative Morphology of the sinusoids of the hepatic acinus. Quantimet analysis of the rat liver. Gastroenterology 76:965-969.

- 54 - Goresky, C.A., Bach, G.G. and Nadeau, B.F. (1973) On the uptake of the materials by the intact liver. The transport and net removal of galactose. *J.Clin.Invest.*59:991-1009.
- 55 - Jones, A.L., Hradek, H., Renston, R.R., Wong, K.Y., Karlaganis, G., and Paumgartner, G. (1980) Autoradiographic evidence for hepatic lobular concentration gradient of bile acid derivative. *Am.J.Physiol.*238:G.233-G.237.
- 56 - Gumucio, J.J. (1983) Functional and anatomic heterogeneity in the liver acinus: impact on transport. *Am.J.Physiol.*244:G.578-G.582.
- 57 - Brauer, R.W., Leong, G.F., McElroy, R.F. and Holloway, R.J. (1954) Mechanics of bile secretion. Effect of perfusion pressure and temperature on bile flow and secretion pressure. *Am.J.Physiol.* 177: 103-112.
- 58 - Sperber, I. (1963) Biliary secretion and choleresis. In "Proc. 1st.Int.Pharmacol.Meeting." Pergamon, Oxford, vol.4 pp.137-143.
- 59 - Sperber, I. (1965) Biliary secretion of organic anions and its influence on bile flow. In "The biliary system", (W.Taylor Ed.) Blackwell, Oxford, pp.457-467.
- 60 - Boyer, J.L. and Klatskin, G. (1970) Canalicular bile flow and bile secretory pressure: evidence for a non bile salt dependent fraction in the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 59:853 - 859.
- 61 - Boyer, J.L. and Bloomer, J.R. (1974) Canalicular bile secretion in man: studies utilizing the biliary clearance of [¹⁴C]-mannitol. *J.Clin.Invest.*54:773-781.
- 62 - Preisig, R., Cooper, H.L., and Wheeler, H.O. (1962) The relationship between taurocholate secretion rate and bile production in the unanesthetized dog during cholinergic blockade and during secretin administration. *J.Clin.Invest.*41: 1152-1162.

- 63 - Wheeler, H.O. (1972) Secretion of bile acids by the liver and their role in the formation of hepatic bile. Arch.Intern.Med. 130:533-541.
- 64 - Glasinovic, J.C., Dumont, M. and Erlinger, S.(1975) Hepatocellular uptake of taurocholate in the dog.J.Clin.Invest. 55: 419-426.
- 65 - Reichen, J.and Faumgartner, G.(1975) Kinetics of taurocholate uptake by the perfused rat liver. Gastroenterology 68:132-136.
- 66 - Claret, M. (1978) Transport of ions in liver cells.In"Membrane transport in biology" (G.Giebisch, O.C. Tosteson and H.H.Ussing Ed.) Springer Verlag, Heildelberg, W.Germany. pp.899-920.
- 67 - Barnes, S., Billing, B. and Morris, J.S.(1976) Effect of fasting and ileal resection on the concentration of deoxycholic acid in rat portal blood. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.152:2292-2297.
- 68 - Cronholm., T.and Sjovall, J.(1967) Bile acids in portal blood of rats different diets and cholestyramine. Eur.J.Biochem.2:3/5:583.
- 69 - Ukishio, T.and Nair, P.P.(1966)Studies on bile acids. Some observations on the intracellular localization of major bile acids in rat liver. Biochemistry 5: 3662-3668.
- 70 - Dietmaier, A., Gasser, T. and Peterlik, M.(1976) Investigations on the sodium-dependence of bile acids fluxes in the isolated perfused rat liver. Biochem.Biophys.Acta 443:81-91.
- 71 - Anwer, M.S. and Hegner, O.(1978) Effect of Na⁺ on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes.Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 359:181-182.
- 72 - Scharschmidt, B.F.and Stephens, J.E.(1981) Transport of sodium, chloride and taurocholate by cultured rat hepatocytes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.78:986-990.

- 73 - Schwartz, L.R. and Barth, C.A.(1979) Taurocholate uptake by adult rat hepatocytes in primary culture. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 360:1117-1120.
- 74 - Duffy, M.C., Blitzer, B.L. and Boyer, J.L.(1981) Direct determination of the driving forces for taurocholate (TC) uptake in to liver plasma membrane (LPM) vesicles.(Abstract) *Hepatology* 1:507.
- 75 - Inoue, M., Tran, J., Kiune, R. and Arias, I.M.(1981) Preparation of vesicles from rat liver sinusoidal and canalicular plasma membranes:mechanism of taurocholate uptake by sinusoidal membrane vesicles (Abstract)*Hepatology* 1: 519.
- 76 - Crane, R.K. (1977) The gradient hypothesis and other models of carrier-mediated active transport.*Rev.Physiol, Biochem.Pharmacol.*78:99-159.
- 77 - Schwartz, L., Burr, R. and Schenk, M.(1975) Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells. *Eur.J.Biochem.*55:617-623.
- 78 - Blitzer, B.L., Ratoosh, S.L. and Boyer, J.L. (1980) Inhibitors of Na⁺-coupled ion transport block taurocholate uptake by isolated rat hepatocytes. *Clin.Res.*28:273A.
- 79 - Erlinger, S.(1983) Does Na⁺ -K⁺ - ATPase have any role in bile secretion?. *Am.J.Physiol.* 243:G.243-G.247.
- 80 - Accatino, L.and Simon, F.R.(1977) Identification and characterization of a bile acid receptor in isolated liver surface membranes. *J.Clin.Invest.*57:496-508.
- 81 - Strange, R.C.(1981) Hepatic bile salt transport.A review of sub-cellular binding sites. *Biochem.Soc.Trans.*9:170-174.
- 82 - Hardison, W.G.M., Hatoff, D.E., Miyai, K.and Weiner, R.G.(1981) Nature of the bile acid maximum secretory rate in the rat.*Am.J. Physiol.* 241:G.337-G.343.

- 83 - Poupon, R., Dumont, M. and Erlinger, S. (1976) Hepatic storage and biliary transport maximum of sodium taurocholate in the dog. *Eur.J.Clin.Invest.* 6:431-437.
- 84 - Reichen, J. and Paumgartner, G. (1976) Uptake of bile acids by perfused rat liver. *Am.J.Physiol.* 231:734-742.
- 85 - Boyer, J.L. (1971) Canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. *Am.J.Physiol.* 221:1156-1163.
- 86 - Erlinger, S., Dhumeaux, D., Berthelot, P. and Dumont, M. (1970) - Effects of inhibitors of sodium transport on bile formation in the rabbit. *Am.J.Physiol.* 219:416-422.
- 87 - Schersten, T., Nilsson, S., Cahlin, E., Filipson, M. and Brodina-Persson, G. (1971) Relationship between the biliary excretion of bile acids and the excretion of water lecithin and cholesterol in man. *Eur.J.Clin.Invest.* 1:242-247
- 88 - Wheeler, H.O., Ross, E.D. and Bradley, S.E. (1968) Canalicular bile production in dogs. *Am.J.Physiol.* 214:866-874.
- 89 - O'Maille, E.R.L. and Richards, T.G. (1972) Possible explanations for the differences in secretory characteristics between conjugated and free bile acids. *J.Physiol (London)* 265:855-866.
- 90 - Klaassen, C.D. (1973) Comparison of the choleric properties of bile acids. *Eur.J.Pharmacol.* 23:270-275.
- 91 - Layden, T.J., Elias, E. and Boyer, J.L. (1978) Bile formation in the rat. The role of the paracellular shunt pathway. *J.Clin.Invest.* 62:1375-1385.
- 92 - Light, H.G., Witmer, C. and Vars, H.M. (1959) Interruption of the enterohepatic circulation and its effects on rat liver. *Am.J.Physiol.* 197:1330-1332.

- 93 - Gumucio, J.J. and Valdivieso, V.D. (1971) Studies on the mechanism of ethinylestradiol impairment of bile flow and bile salt excretion in the rat. *Gastroenterology* 61:339-344.
- 94 - Lindblad, I. and Schersten, T. (1976) Influence of cholic and chenodeoxycholic acid on canalicular bile flow on man. *Gastroenterology* 70:1121-1124.
- 95 - Chenderovitch, J., Raizman, A. and Infante, R. (1975) Mechanism of ethacrynic acid-induced choleresis in the rat. *Am. J. Physiol.* 229:1180-1187.
- 96 - Graf, J. and Peterlik, M. (1976) Ouabain-mediated sodium uptake and bile formation by the isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 230:876-885.
- 97 - Shaw, H.M., Caple, I. and Heat, T. (1972) Effect of ethacrynic acid on bile formation in sheep, dogs, rats, guinea pigs and rabbits. *J. Pharm. Exp. Ther.* 182:27-33.
- 98 - Davis, R.A., Kern, F. Jr., Showalter, R., Sutherland, E., Sinensky, M. and Simon, F.R. (1978) Alterations of hepatic Na^+ , K^+ -ATPase and bile flow by strogens: effects on liver surface membranes lipid structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4130-4134.
- 99 - Layden, T.J. and Boyer, J.L. (1976) The effect of thyroid hormone on bile salt-independent bile flow and Na^+ , K^+ -ATPase activity in liver plasma membrane enriched in bile canaliculi. *J. Clin. Invest.* 57:1009-1018.
- 100 - Samuels, A.M. and Carey, M.C. (1978) Effects of chlorpromazine hydrochloride and its metabolites on Mg^{2+} and Na^+ , K^+ -ATPase activities of canalicular-enriched liver plasma membranes. *Gastroenterology* 74:1183-1190.
- 101 - Simon, F.R., Sutherland, E. and Accatino, L. (1977) Stimulation of hepatic sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase activity by phenobarbital. Its possible role in regulation bile flow. *J. Clin. Invest.* 59:849-861.

- 102 - Stirling, C.E. (1976) High-resolution autoradiography of [^3H]-ouabain binding in salt transporting epithelia. *J.Microsc.* Oxford 106:145-157.
- 103 - Evans, W.H.(1970) Fractionation of liver plasma membranes prepared by zonal centrifugation. *Biochem.J.*116:833-842.
- 104 - Herz, R., Cueni, B., Bircher, J.and Paumgartner, G (1973) The excretory capacity of the isolated perfused rat liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 277:297-304.
- 105 - Poupon, R.E. and Evans, W.H.(1979) Biochemical evidence that Na^+ , K^+ -ATPase is located at the lateral region of the hepatocyte - surface membrane. *Febs.Lett.*108:374-378.
- 106 - Bradley, S.E.and Herz, R.(1978) Permsselectivity of biliary canalicular membrane in rats:clearance probe analysis. *Am.J.Physiol.*235:E.570-E-576.
- 107 - Forker, E.L.(1970)Hepatocellular uptake of inulin, sucrose and mannitol in rats. *Am. J.Physiol.*219:1568-1573.
- 108 - Javitt, N.B., Dillon, D., KOK, E., and Watchel, N. (1978) Mechanism of bile formation. Transcellular and paracellular pathways. In "The liver quantitative aspects of structure and function." (R.Presig and J.Bircher Ed.)Cantor, Aulendorf, W.Germany. pp.197-202.
- 109 - Graf, J.and Peterlik, M.(1976) Mechanism of transport of inorganic ions into bile.In "The hepatobiliary system" (W.Taylor Ed.) Plenum, New York.pp.43-58.
- 110 - Frizell, R.A., Field, M.and Schultz, S.G.(1979) Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues. *Am.J.Physiol.*236:F.1-F.8.
- 111 - Barnhart, J.L.and Combes, B.(1978) Characterization of SC-2644 induced choleresis in the dog for canalicular bicarbonate secretion. *J.Pharm.Ep.Ther.*206:190-197.

- 112 - Dumont, M., Uchman, S. and Erlinger, S.(1980) Hypercholeresis induced by ursodeoxycholic acid and 7 - ketolithocholic acid in the rat. Possible role of bicarbonate transpor. Gastroenterology 79: 82-89.
- 113 - Hardison, W.G.M.and Wood, C.A.(1978) Importance of bicarbonate in bile salt-independent fraction of bile flow. Am.J.Physiol. 235: E.158-E.164.
- 114 - Erlinger, S. (1982) Secretion of bile. In "Diseases of the liver" (L.Schiff and E.Schiff Ed.)Lippincott, Philadelphia, p.a. pp.93-118.
- 115 - Forker, E.L.(1967) Two sites of bile formation as determined by mannitol and erythritol clearance in the guinea pig. J.Clin. Invest.46:1189-1195.
- 116 - Forker, E.L.(1968) Bile formation in guinea pigs.:analysis with inert solutes of graded molecular radius. Am.J.Physiol. 215: 56-62.
- 117 - Schanker, L.S. and Hogben, C.A.M.(1961) Biliary excretion of - Inulin, sucrose and mannitol:analysis of bile formation. Am.J.Physiol.200:1087-1090.
- 118 - Brauer, R.W. (1959) Mechanisms of bile secretion. J.Am.Med.Ass. 169:1462-1466.
- 119 - Hart, L.G. and Schanker, L.S. (1966) Active Transport of chlorothiazide into bile. Am.J.Physiol. 211:643-646.
- 120 - Klassen, C.D. (1975) Biliary excretion of xenobiotics. CRC.Crit.Rev.Toxicol. 4:1-30.
- 121 - Rowntree, L.G., Hurwitz, S.H. and Bloomfield, A. (1913) An experimental and clinical study of the value of phenoltetrachlorph - talein as a test for hepatic function. Johnas Hopkins Hosp.Bull. 24:327-342.

- 122 - Rosenthal, S.M. and White, E.C.(1924) Studies in hepatic function. VI A. The pharmacological behaviour of certain phthalein dyes. B. The value of selected phthaleins compounds in the estimation of hepatic function. *J.Pharmacol. Exp.Ther.*24:265-288.
- 123 - Javitt, N.B., Wheeler, H.O., Ramos, O.L., Baker, K.J. and Bradley, S.E. (1960) The intrahepatic conjugation of sulphobromophthalein and glutathione in the dog.*J.Clin.Invest.* 39:1570-1577.
- 124 - Javitt, N.B.(1967) Phenol 3-6, Dibromophthalein disulfonate a new compound for the study of liver disease. *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.*177:254-257.
- 125 - Baker, K.J., and Bradley, S.E.(1966) Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium by plasma albumin: its role in hepatic - BSP extraction. *J.Clin.Invest.*45:281;287.
- 126 - Meijer, D.K.F., Vonk, R.J., Keulemans, K. and Weitering, J.G. (1977) Hepatic uptake and biliary excretion of dibromosulphalein. Albumin dependence, influence of phenobarbital and nafenopin pretreatment and the role of Y and Z protein. *J.Pharm. Exp.Ther.*202:8-21.
- 127 - Klassen, C.D. (1975) Extranehepatic distribution of sulfobromophthalein. *Can. J.Physiol. Pharmacol.* 53:120-123.
- 128 - Goresky, C.A.(1975) The hepatic uptake process: its implications for bilirubin transport. In "Jaundice. Proc. 2nd.Intern.Symposium Can.Hepatic. Foundation." (C.A.Goresky and M.M.Fischer Ed.) Plenum Press, New York, pp.159-174.
- 129 - Goresky, C.A. (1964) Initial distribution and rate of uptake of sulfobromophthalein in the liver.*Am.J.Physiol.* 207:13-26.
- 130 - Paumgartner, G. and Reichen, J.(1975) Different pathways for hepatic uptake of taurocholate and indocyanine green.*Experientia* 31: 306-307.
- 131 - Scharschmidt, B.F., Waggoner, J.G. and Berk, P.D.(1975) Hepatic organion anion uptake in the rat. *J.Clin.Invest.*

//56:1280-1292.

- 132 - Reichen, J. and Berk, P.D. (1980) The role of liver plasma membrane protein in the transport of organic anionic dyes in communications of liver cells. (H. Ppfer Ed.) MTP. Press Ltd.
- 133 - Tiribelli, C., Lunazzi, G., Luciani, M., Panfili, E., Gazzin, B., Liut, G., Sandri, G. and Sottocasa, G. (1978) Isolation of a sulfobromophthalein-binding protein from hepatocyte plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 532: 105-112.
- 134 - Ockner, R.K., Weisiger, R.A. and Gollan, J.L. (1983) Hepatic uptake of albumin-bound substances: albumin receptor concept. *Am. J. Physiol.* 245:G.13-G.18.
- 135 - Weisiger, R., Gollan, J. and Ockner, R. (1980) An albumin receptor on the liver cell may mediate hepatic uptake of sulfobromophthalein and bilirubin: bound ligand, not free is the major uptake determinant. (Abstract.) *Gastroenterology* 79:1065.
- 136 - Forker, E.L. and Luxon, B.A. (1981) Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver. *J. Clin. Invest.* 67:1517-1522.
- 137 - Weisiger, R., Gollan, J., and Ockner, R. (1981) Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids, and other albumin-bound substances. *Science* 211:1048-1051.
- 138 - Ockner, R., Weisiger, R., and Lysenko, N. (1980) Specific and saturable binding of ^{125}I -albumin to rat hepatocytes: Further evidence for a surface membrane albumin receptor. (Abstract.) *Gastroenterology*. 79:1041.
- 139 - Levi, A.J., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. (1969) The role of two hepatic cytoplasmic proteins (Y and Z) in the transfer of sulphobromophthalein (BSP) and bilirubin from plasma into liver. *J. Clin. Invest.* 48:2156-2167.
- 140 - Benson, A.M., Talalay, P., Keen, J.H. and Jakoby, W.B. (1977) Rela

//tionship between the soluble glutathione-dependent Δ^5 -3-cetosteroid isomerase and the glutathione s-transferase of the liver. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.74:158-162.

- 141 - Litwack, G., Ketterer, B. and Arias, I.M. (1971) Ligandin: an abundant liver protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous anions. Nature 234:466-467.
- 142 - Ketterer, B., Ross-Mansell, P. and Whitehead, J.K. (1967) The isolation of carcinogen binding protein from rats given 4 - dimethylaminoazobenzene. Biochem, J. 103:316-324.
- 143 - Fleischner, G., Robbins, J., Arias, I.M. (1972) Immunological studies of Y protein: a mayor citoplasmic organic anion binding protein in rat liver. J. Clin.Invest.51:677-684.
- 144 - Kamisaka, K., Listowsky, I., Fleischner, G., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. (1976) Studies of the binding of bilirubin and other organic anions to serumalbumin and ligandin (Y protein). Birth defects: original article series, Vol.12, pp.642-660.
- 145 - Arias, I.M., Fleischner, G., Kirsch, R., Mishkin, S., Gatmaitan, Z. (1976) On the structure, regulation and function of ligandin In "Glutathione metabolism and function" (I.M.Arias and W.B. Jakoby Ed.) Raven Press, New York, pp.175-188.
- 146 - Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M. and Jakoby, W.B. (1974) The identity of Glutathione s-transferase B With Ligandin. A mayor binding protein of liver. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71: 3879-3882.
- 147 - Arias, I.M. (1979) Ligandin: review and update of a multifunctional protein. Med.Biol.57: 328-334.
- 148 - Kamisaka, K., Gatmaitan, Z., Moore, C.L. and Arias, I.M. (1975) Ligandin reverses bilirubin inhibition of liver mitochondrial respiration in vitro. Pediatr.Res.9:903-905.

- 149 - Reyes, H., Levi, A.J., and Arias, I.M. (1971) Studies of Y and Z two hepatic cytoplasmic organic anion-binding proteins: effects of drugs, chemicals, hormones and cholestasis. *J.Clin. Invest.* 50: 2242-2252.
- 150 - Levine, R.J., Reyes, H., Levi, A.J., Gatmaitan, Z., and Arias, I.M. (1971) Phylogenetic study of hepatic anion uptake mechanisms *Nature* 231:277-279.
- 151 - Boyer, J.L., Schwartz, J., Smith, N. (1976) Biliary secretion - in elasmobranch. I-bile collection and composition. *Am.J. Physiol* 230: 970-973.
- 152 - Boyer, J.L., Schwartz, J., Smith, N. (1976) Biliary secretion in elasmobranch. II-hepatic uptake and biliary excretion of organic anions. *Am.J. Physiol.* 230: 974-981.
- 153 - Wolkoff, A.W., Sellin, J., Gatmaitan, Z., Goresky, C.A. and Arias, I.M. (1979) Role of Ligandin in the transfer of bilirubin from plasma into the liver. *Am.J. Physiol.* 236:E.638-E.648.
- 154 - Klaassen, C.D. (1975) Biliary excretion of drugs: role of Ligandin in newborn immaturity and in the action of microsomal enzyme inducers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195: 311-319.
- 155 - Gregus, Z., and Klaassen, C.D. (1982) Role of Ligandin as a binding protein and as an enzyme in the biliary excretion of sulfobromophthalein. *J. Pharm., acol. Exp. Ther.* 221: 242-246.
- 156 - Boyland, E. and Chasseaud, L.F. (1969) The role of glutathione and glutathione s-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.* 32: 172-219.
- 157 - Fevery, J., Van de Vijver, M., Michiels, R. and Heirwegh, K.P.M. (1977) Comparison in different species of bilirubin IX - α - conjugates with the activity of hepatic and renal bilirubin - IX - α - uridine diphosphate glycoside transferase. *Biochem J.* 164: 737 - 746.

- 158 - Kuenzle, C.C. (1975) Bilirubin conjugates in bile. In "The hepatobiliary system" (W.Taylor Ed.) Plenum. New York pp.309-335.
- 159 - Upson, D.W., Gronwall, R.R. and Cornelius, C.E. (1970) Maximal hepatic excretion of bilirubin in sheep. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 134: 9-12.
- 160 - Weinbren, K. and Billing, B.H.(1956) Hepatic clearance of bilirubin as an index of cellular function in the regenerating rat liver. Br.J.Exp.Path.37: 199-204.
- 161 - Klaassen, C.D. and Plaa, G.L.(1968) Hepatic disposition of Phenoldibromophthalein disulfonate and sulfobromophthalein. Am.J.Physiol. 215: 971-976.
- 162 - Mahu, J.L., Duvaldestin, P., Dhumeaux, D. and Berthelot, P. (1977) Biliary transport of cholephilic dyes: evidence for the two different pathways. Am.J.Physiol.232: E.445-450.
- 163 - Whelan, G.and Combes, B. (1971) Competition of unconjugated and conjugated sulfobromophthalein sodium (BSP) for a single excretory system. J.Lab.Clin.Med.78: 230-244.
- 164 - Forker, E.L.(1977) Canalicular anion transport.In "Chemistry and physiology of bile pigments" DHEW publication N°77-1100 (NIH) (P.D.Berk and N.I.Berlin Ed.)Washington D.C.pp.383-389.
- 165 - Whelan, G. and Combes, B.(1975) Phenobarbital enhanced biliary excretion of administered unconjugated and conjugated sulfobromophthalein in the rat. Biochem. Pharmacol. 24: 1283-1286.
- 166 - Scharschmidt, B.F. and Schmidt, R. (1978) The micellar sink: a quantitative assessment of the association of organic anions with mixed micelles and other macromolecular aggregates in rat bile. Clin.Invest.62: 1122-1131.
- 167 - Vonk, R.J., Jekel, P. and Meijer, D.K.F.(1975)Choleresis and hepatic transport mechanisms. II-influence of bile salt cholere -

- //..sis and biliarymicelle binding on biliary excretion of various organic anions. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 290:375-387.
- 168 - Binet, S., Delange, Y. and Erlinger, S.(1979) Influence of taurocholate taurochenodeoxycholate and taurodehydrocholate on - sulfobromophthaleintransport into bile. Am.J.Physiol.236: - E.10-E.14.
- 169 - Jones, J.H.and Foster, C.A.(1945) A salt Mixture for use with - basal diets either low or high in phosphorus. J.Nutr.24:245-250.
- 170 - Horn, R.S. and Manthei, R.W. (1965) Ethanol metabolism in chronic protein deficiency. J.Pharmacol. Exp.Ther.147: 385-390.
- 171 - Coward, W.A., Whitehead, R.G. and Lunn, P.G.(1977) Reasons why hypoalbuminemia may or not may appear in protein-energy malnutrition. Br.J.Nutr.38:115-126.
- 172 - Ndika, L.I.L.(1972) Protein malnutrition and gastrointestinal histamine in the rat.Br.J.Nutr.28:153-165.
- 173 - Leshem, M.(1981) A convenient Feeder for measurement of consumption of powdered food by rats. Physiol.Behav.27:391-392.
- 174 - Wahllander, A., Soboll, S. and Sies, H.,(1979)Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of glutathione s-transferases.Febs.Letters 97: 138-140.
- 175 - Tateishi, N., Higashi, T. (1978) Turnover of glutathione in rat liver. In "Functions of glutathione in liver and kidney" (H.Sies, A., Wendel, Ed.) Springer verlag, Berlin, pp.3-7.
- 176 - Jocelyn, P.C.(1972) Biochemistry of the SH group. Academic Press London, pp.261-263.
- 177 - Leaf, G.and Neuberger, A.(1947) The effect of diet on the glutathione content of the liver. Biochem.J. 41: 280-282.

- 178 - Meister, A. (1981) Metabolism and functions of glutathione. TIBS. 6:231-234.
- 179 - Mann, M.D., Bowie, M.D. and Hansen, J.D.L. (1975) Total body potassium and serum electrolyte concentrations in protein - energy malnutrition. S.Afr.Med.J.49: 76-78.
- 180 - Platt, B.S.(1967) Experimental protein-calorie deficiency. In "Calorie deficiencies and protein deficiencies" (McCance - R.A.and Widdowson E.M.Ed.) J & A Churchill LTD.London. p.p.237-248.
- 181 - Edozien, J.C.(1968) Experimental kwashiorkor and marasmus Nature 220: 917-919.
- 182 - Thompson, R.Y., Heagy, F.C., Hutchinson, W.C. and Davidson, J. N. (1953) The deoxyribonucleic acid content of the rat cell - nucleus and its use in expressing the results of tissue analysis with particular reference to composition of liver tissue. Biochem., J. 52: 460-473.
- 183 - Ely, J.O. and Ross, M.H.(1951) Desoxyribonucleic acid content - of rat liver nuclei influenced by diet. Science 114: 70-71.
- 184 - Mirsky, A.E. and Ris, H.(1949) variable and constants components of chromosomes. Nature 163: 666-667.
- 185 - Cooper, J.A.D. (1953) Effect of low protein diet and fasting on nuclei acid metabolism in the rat.J.Bio.Chem.200:155-162.
- 186 - Campbell, R.M. and Kosterlitz, H.W.(1952) The absence of dietary effects on the DNA contentof liver nuclei of the adult rat. Science 115:84-86.
- 187 - Enesco, M. and Leblond, C.P.(1962) Increase in cell number as a factor in the growth of the organs of the young male rat.J.Embryol. Exptl.Morphol.10:530-562.
- 188 - Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R. and Hess, F.A.(1969) Co-

- //related morphometric and biochemical studies on the liver-cell. I-morphometric model, stereologic methods and normal - morphometric data for rat liver. J.Cell.Biol. 42:68-91.
- 189 - Freeman, J.B., Meyer, P.D. and Denbesten, L.(1974) Effects of freezing and incubation on biliary lipids analysis. Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 147:31-35.
- 190 - Thomas, P.J. and Hoffman, A.F.(1973) A simple calculation of the lithogenic index of bile: expressing biliary lipid composition on rectangular coordinates. 65: 698-699.
- 191 - Holzbach, R.T., Marsh, M., Olzewski, M. and Holan, K. (1973) Cholesterol solubility in bile: evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. J.Clin.Invest.52: 1467-1452.
- 192 - Dubin, M., Maurice, M., Feldman, G. and Erlinger, S.(1978) Phalloidin induced cholestasis in the rat: relation to changes in microfilaments. Gastroenterology 75: 450-459.
- 193 - Erlinger, S., Dhumeaux, D., Benhamou, J.P. and Fauvert, R.(1969) La secretion biliaire du lapin: preuves en faveur d'une importante fraction indépendante de sels biliaires. Rev.Fr.Etud.Clin.Biol.14: 144-153.
- 194 - Forker, E.L., Hicklin, T. and Sorenson, H.(1967) The clearance of mannitol and erythritol in rat bile. Proc.Soc.Biol.Med.126: :115-119.
- 195 - Klaassen, C.D.(1971) Studies on the increased biliary flow produced by phenobarbital in rats. J.Pharmacol. Exp.Ther.176: :743-753.
- 196 - Richards, T.G., Tindall, V.R. and Young, A.A.(1959) a modification of the bromsulphthalein liver function test to predict the dye content of the liver and bile. Clin. Sci. 18:499-522.
- 197 - Vonk, R.J., Scholtens, E. and Strubbe, J.H.(1978) Biliary excretion of dibromosulphthalein in the freely moving unanesthetized

- //zed rat: circadian variations and effects of deprivation of food and pentobarbital anaesthesia. Clin.Sci.& Mol.Med. 55: 399-406.
- 198 - Kniedsen-Kudsk, F. (1981) Pharmacokinetic analysis and calculations using a program for the minicalculator TI-59. Int.J.Bio. Med.Comput. 12:83-96.
- 199 - Roberts, R.J., Klaassen, C.D. and Plaa, G.L.(1967) Maximum Biliary excretion of bilirubin and sulfobromophthalein during - anesthesia-induced alteration of rectal temperature. Proc.Soc. Exp.Biol.Med.125: 313-316.
- 200 - Kaplowitz, N. (1980) Physiological significance of glutathione s-transferases. AM.J.Physiol. 239: G.439-G.444.
- 201 - Habig, W.H. and Jakoby, W.B.(1981) Glutathione s-transferases (rat and human). Met.Enzymol.77: 218-231.
- 202 - Tipping, E., Ketterer, B., Christodoulaidis, L. and Enderby, G. (1976) The non-covalent binding of small molecules by ligandin interactions with steroids and their conjugates: fatty acids, bromosulphthalein, carcinogens, glutathione and related compounds. Eur.J.Biochem. 67: 583-590.
- 203 - Markovic, R.D., Eisen, H.L., Barnett, C.A. and Litwack, G.(1980) Evidence for a physiological role of corticosteroid Binder I B. Biochemistry 19: 4556-4564.
- 204 - Ketley, J.N., Habig, W.H., and Jakoby, W.B.(1975) Binding of non-substrates ligands to the glutathione s-transferases. J. Biol. Chem.250: 8670-8673.
- 205 - Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.(1974) Glutathione s-transferases: the first step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem.249: 7130-7139.
- 206 - Goldstein, J. and Combes, E.(1966) Spectrophotometric assay of -

- //the liver enzyme that catalyzes sulfobromophthalein-glutathione conjugation. J.Lab.& Clin.Med. 67: 863-872.
- 207 - Wheeler, H.O., Meltzer, J.I. and Bradley, S.E.(1960) Biliary transport and hepatic storage of sulfobromophthalein sodium in the unanesthetized dog, in normal man, and in patients with hepatic disease. J.Clin.Invest.39: 1131-1144.
- 208 - Wheeler, H.C., Epstein, R.M., Robinson, R.B. and Shell, E.S. - (1960) Hepatic storage and excretion of sulfobromophthalein sodium in the dog. J.Clin.Invest.39: 236-247.
- 209 - Klaassen, C.D. and Plaa, G.L.(1967) Determination of Sulfobromophthalein storage and excretory rate in small animals. J.Appl. Physiol. 22: 1151-1155.
- 210 - Cornelius, C.E., Ben-Ezzer, J. and Arias, I.M.(1967) Binding of sulfobromophthalein (BSF) and other organic anions by isolated hepatic cell membranes in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.124: 665-667.
- 211 - Burr, R., Schwenk, M. and Pfaff, E.(1977) Interaction of bromosulphthalein with mitochondrial membranes. Uptake of bromosulphthalein and effects on ANS-fluorescence. Biochem. Pharmacol. 26: 457-460.
- 212 - Bickel, M.H., and Steele, J.W. (1974) Binding of basic and acidic drugs to rat tissue subcellular fractions. Chem.Biol.Interactions. 8: 151-162.
- 213 - Leyhausen, G. and Muller, W.E.(1981) Liver cytosol protein binding may be not responsible for hepatic uptake of biliary contrast agents. Archiv. Int.Pharmacodyn. 246: 187-204.
- 214 - Penefsky, H.S.(1977) Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J.Biol.Chem.252: 2891-2899.
- 215 - Gornall, A.C., Bardawill, J. and David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.

- J.Biol.Chem.177: 751-763.
- 216 - Rodkey, F.L. (1965) Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. Clin.Chem. 2:478-485.
- 217 - Suranyi, E.V. and Avidor, Y. (1966) Swelling-contraction of mitochondria in hypotonic medium. Biochim. biophys. Acta.118:445-452.
- 218 - Ellman, G.L.(1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch.Bioche. Bio phys. 82: 70-77.
- 219 - Henry, R.J.(1969) Volúmenes plasmático y hemático. En "Química clínica, bases y principios." (Henry, R.J.Ed.) Ed.Jims, Barcelona. pp.1091-1099.
- 220 - Tornberg, A.(1958) Determination of T-1824 (Evans blue dye) in lipemia and hemolysis with a modified extraction method. Acta Med. Scand.161: 69-77.
- 221 - Kleinzeller, A., Kostyuk, P.G., Kotyk, A. and Lev, A.A.(1969) Determination of intracellular ionic concentrations and activities. In "Laboratory techniques in membrane biophysics". (H.Passow, R. Stampfli Ed.) Springer-Verlag, New York. pp.69-84.
- 222 - Roe, H.H., Epstein, J.H. and Goldstein, N.P.(1949) A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. J.Biol.Chem.178: 839-843.
- 223 - Schneider, W.C. (1957) Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In "Methods in enzymology" (S.Collowick, N. Kaplan, Ed.) Academic press New York. Vol.3 pp.680-684.
- 224 - Talalay, P.(1960) Enzymatic analysis of steroid hormones. In "Methods of Biochemical analysis ". 8:119-143.
- 225 - Berthelot, P., Erlinger, S., Preux, A.M. and Dhumeaux, D. (1970) Mechanism of phenobarbital induced hypercholeresis in the rat. Am.J.Physiol. 219: 809-813.

- 226 - Monotest colessterol-Metodo CHOP-PAP (Trinder P. Ann. Clin. Bio - chem. 6:24 1969), Boheringer Mannheim.
- 227 - Bartlett, G.R.(1959) Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234: 466-468.
- 228 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, H.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 229 - Godfrey, P.P., Warner, M.J. and Coleman, R.(1981) Enzymes and proteins in bile: variations in output in rat cannula bile during and after depletion of the bile salt pool. Biochem. J. 196 : 11-16.
- 230 - Whelan, G., Hoch, J. and Combes, B.(1970) A direct assessment of the importance of conjugation for biliary transport of sulfobromophthalein sodium. J. Lab. Clin. Med. 75:542-557.
- 231 - Harris, L.J. and Raymond, W.D.(1939) CCL assessment of the level of nutrition. A method for the estimation of nicotinic acid in urine, Biochem., J. 33:2037-2051.
- 232 - Grodsky, G.M., Carbone, J.V. and Fanska, R.(1961) Biosynthesis of a sulfobromophthalein mercaptide with glutathione. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106: 526-530.
- 233 - Hald, A.(1965) Linear regression analysis with one independent variable. In "Statistical theory with engineering applications." J. Wiley and Sons Inc. New York pp.522-584.
- 234 - Combes, B.(1965) The importance of conjugation with glutathione for sulfobromophthalein sodium (BSP) transfer from blood to bile. J. Clin. Invest. 44:1214-1220.
- 235 - Small, D.M. (1971) The physical chemistry of cholanic acids. In "Bile acids, chemistry, physiology and metabolism." (P. P. Naie and D. Kritchevsky Ed.) Plenum, New York. Vol. 1 pp. 249-253.

- 236 - Hofmann, A.F.(1965) Clinical implications of physicochemical - studies on bile salts. Gastroenterology. 48: 484-493.
- 237 - Mullock, B.M. and Hinton, R.H.(1981) Transport of protein from blood to bile. TIBS 6:188-191.
- 238 - Lin, C.T. and Chang, J.(1975) Electron microscopy of albumin synthesis. Science 190: 465:466.
- 239 - Jones, A.L., Schmucker, D.L., Renston, R.H. and Murakami, T. (1980) The architecture of bile secretion. A morphological - perspective of physiology. Dig.Dis. Sci. 25: 609-614.
- 240 - Kakis, G.and Yousef, I.(1978) Protein composition of rat bile. Can. J.Biochem. 56: 287-292.
- 241 - Varga, F., Fischer, E., Szily, S. (1974) Biliary excretion of bromsulphthalein and glutathione conjugate of bromsulphthalein in rats pretreated with diethyl maleate. Biochem. Pharmacol. 23: 2617-2623.
- 242 - Gregus, Z., Fischer, E. and Varga, F.(1977) Inhibition by bromsulphthalein of the biliary excretion of its glutathione conjugate. Biochem. Pharmacol. 26: 1951-1952.
- 243 - Burr, R., Schwenk, M. and Pfaff, E.(1977) Interaction of bromo - sulfophthalein with mitochondrial membranes - inhibition of respiration. Biochem. Pharmacol. 26: 461-466.
- 244 - Carrillo, M.C., Rodríguez, J.V., Monti, J.A. y Rodríguez Garay E.A. (1983)
Kinetics analysis sulfobromophthalein hepatic transport in aflatoxin B₁ treated rats. Enviado a publicación.
- 245 - Klaassen, C.D. and Plaa, G.L.(1968) Effect of carbon tetrachloride on the metabolism, storage and excretion of sulfobromophthalein. Toxicol. Appl.Pharmacol. 12: 132-139.
- 246 - Wiegand, U.W., Slatery, J.T., Hintze, K.L. and Levy, G.(1979)

- Differences in the protein binding of several drugs and bilirubin in serum and heparinized plasma of rats. *Life Sci.* 25: 471 - 477.
- 247 - Wiegand, U.W., Hintze, K.L., Slatery, J.T. and Levy, G.(1980) Protein binding of several drugs in serum and plasma of healthy subjects. *Clin.Pharm. Ther.*27:297-300.
- 248 - Desmond, P.V., Roberts, R.K., Wood, A.J.J., Dunn, G.D., Wilkinson, G.R. and Schenker, S.(1980) Effect of heparin administration on plasma binding of benzodiazepines. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 9:171-175.
- 249 - Brown, J.E., Kitchell, B.B., Bjornsson, T.D.and Shand, D.G. - (1981) The artifactual nature of heparin-induced drug protein binding alterations. *Clin.Pharm.Ther.*30:636-643.
- 250 - Giacomini, K.M., Swezey, S.E., Giacomini, J.C. and Blaschke, T.E.(1980) Administration of heparin causes in vitro release of non-esterified fatty acids in human plasma. *Life. Sci.*27: 771-780.
- 251 - Frezza, M., Tiribelli, C., Panfili, E. and Sandri, G. (1974) - Evidence for the existence of a carrier for bromosulphthalein in the liver cell plasma membrane. *Febs. Lett.* 38: 125-128.