

SONIA SÁNCHEZ CAMPOS

EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS
EXPERIMENTAL SOBRE LA FUNCIÓN
HEPATOBILIAR EN EL CRICETO



Universidad de León
Secretariado de Publicaciones

Reservados todos los derechos.
Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito del Servicio de Publicaciones de la Universidad de León.

ISBN: 84-7719-801-2
Depósito Legal: LE.343-2000

Imprime: CELARAYN, s.l. (impresión electrónica)
Ordoño II, 31 • 24001 león

© Sonia Sánchez Campos
© Servicio de Publicaciones
Universidad de León

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Departamento de Fisiología por permitirme llevar a cabo este trabajo y especialmente a su Director el Dr. D. Javier González Gallego, que inició mi formación e interés en el campo de la Fisiología.

A las Dras. Dña. María Jesús Tuñón González y Dña. M^a Francisca González Sevilla por su acertada dirección. Por su constante apoyo, por la confianza que han depositado en mí y por su amistad.

A la Dra. Dña. Yolanda Manga González, de la Estación Agrícola Experimental de León (CSIC) por su participación en la infección experimental y su posterior seguimiento.

A la Dra. Dña. M^a del Carmen Ferreras Estrada, del Dpto. de Patología Animal: Medicina Animal de la Universidad de León, por la realización de los estudios histopatológicos.

A los Dres. D. José Juan García Marín y Dña. María Jesús Monte Rio, del Dpto. de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, por su inestimable colaboración en la realización de los análisis cromatográficos de GC-MS. Por la desinteresada ayuda que me han prestado, por sus acertados consejos y agradable compañía.

A mis compañeros y amigos, María José Cuevas, María Victoria García y Jose Luis Mauriz, por haber podido contar siempre con ellos en mi trabajo y en mi vida. A todas las personas con quienes he compartido trabajo y amistad en estos años y que de manera directa e indirecta han contribuido a la realización de la presente memoria.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una Beca de Investigación de la Universidad de León

A mi familia y a mis amigos

A la memoria de Juan

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes comunicaciones:

1- Sánchez-Campos, S., López, P., Campo, R., Tuñón, M.J., González, P., Manga, Y. y González-Gallego, J. Impairment of drug metabolizing system in experimental dicrocoeliosis. *29th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver*. Atenas, septiembre 1994.

2- Campo, R., Sánchez-Campos, S., Ferreras, M.C., González, P., Tuñón, M.J., González-Gallego, J. y Manga-González, M.Y. Estudios preliminares sobre diversos aspectos de la dicroceliosis experimental en el hamster dorado (*Mesocricetus auratus*). *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*. Sitges, Barcelona, septiembre 1994.

3- Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., González, P., Manga, M.Y. y González-Gallego, J. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre el flujo biliar en el criceto (*Mesocricetus auratus*). *VI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Experimentación Animal (SEEA)*. Lugo, noviembre 1997.

4- Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., González, P., Marín, J.J.G. y González-Gallego, J. Modificación en la secreción biliar y estimulación del transporte vesicular transhepatocitario inducido por la dicroceliosis experimental en el criceto. *XXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)*. Sevilla, septiembre 1998.

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han dado lugar al siguiente trabajo:

SÁNCHEZ-CAMPOS, S., CAMPO, R., FERRERAS, M.C., TUÑÓN, M.J., GONZÁLEZ, P., MANGA-GONZÁLEZ, M.Y. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1996). Effects of experimental dicrocoeliosis on oxidative drug metabolism in hamster liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 115c, 55-60.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

ABC	transportadores dependientes de ATP
AC	ácido cólico
ADC	ácido desoxicólico
ADP	adenosín difosfato
ALC	ácido litocólico
ALT	alanina aminotransferasa
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ANT	azul de nitrotetrazolio
AQDC	ácido quenodesoxicólico
AST	aspartato aminotransferasa
ATP	adenosín trifosfato
ATPasa Na⁺-K⁺ -	adenosín trifosfatasa de sodio y potasio
AUFS	unidades de absorbancia
BSP	bromosulfoftaleína
CAT	catalasa
cBST	transportador canalicular de sales biliares
CDNB	ácido cloro dinitrobenzoico
CGH	colil-glicil-hidrolasa
cit.	citocromo
cMOAT/mrp2	transportador canalicular de conjugados aniónicos
CoA	coenzima A
CYP	familia de genes codificantes del citocromo P-450
DCF	diclorofluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico

DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
d.p.i.	días postinfección
dpm	desintegraciones por minuto
DTNB	5-5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
EEM	error estándar de la media
eq	equivalentes
eV	electrónvoltio
FAD	flavín adenín dinucleótido
FDAB	flujo biliar dependiente de los ácidos biliares
FIAB	flujo biliar independiente de los ácidos biliares
FMN	flavín mononucleótido
Foto.	fotografía
GC-MS	cromatografía de gases/espectrometría de masas
GCS	-glutamilcisteína sintetasa
GGT	-glutamiltranspeptidasa
gh	gramo de hígado
GPx	glutación peroxidasa
GPx Se dep.	glutación peroxidasa selenio dependiente
GPx Se indep.	glutación peroxidasa selenio independiente
GR	glutación reductasa
GSH	glutación (forma reducida)
GSSG	glutación (forma oxidada)
GST	glutación S-transferasa
h	hora
HCM	hemoglobina corpuscular media
HDL	lipoproteínas de alta densidad
H-E	hematoxilina-eosina
hpg	huevos por gramo
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
i.v.	intravenoso
kD	kilodalton
LDL	lipoproteínas de baja densidad
MDR	proteínas transportadoras de cationes orgánicos

mgp	miligramo de proteína
min	minuto
NAD	nicotín adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADH	nicotín adenín dinucleótido (forma reducida)
NADP	nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
Ntcp	polipéptido cotransportador de Na ⁺ /taurocolato
Oatp 1	polipéptido transportador de aniones y cationes orgánicos
OCT1	proteína transportadora de cationes orgánicos
OPT	optaldehído
P	polaridad
PAS	ácido peryódico de Shiff
pKa	constante de disociación
POD	piruvato oxidasa
Prot.	proteína
psi	unidad de presión
RNA	ácido ribonucleico
SCP-2	proteína transportadora de esteroides
sg	segundo
sGSHT	transportador sinusoidal de glutatión
SOD	superóxido dismutasa
SPGP	proteína expresada en el hígado de función desconocida
SRmax	capacidad secretora máxima
TBARS	productos de reacción del ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
U	unidades
UDP	uridín dinucleótido fosfato
UDPGA	uridín dinucleótido fosfato ácido glucurónico
V_{máx}	velocidad máxima
VCM	volumen corpuscular medio
xg	aceleración de la gravedad
ΔE	incremento de absorbancia

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	21
2. ANTECEDENTES.....	25
2.1. Estructura hepática.....	25
2.1.1. El hepatocito.....	25
2.1.1.1. Membrana celular.....	25
2.1.1.2. Orgánulos celulares y citoesqueleto.....	26
2.1.2. El sistema biliar.....	27
2.1.3. Organización funcional: el acino hepático.....	28
2.2. Composición y mecanismos de formación de la bilis.....	29
2.2.1. Composición de la bilis.....	29
2.2.2. Funciones de la bilis.....	31
2.2.3. Mecanismos de formación de la bilis.....	32
2.2.3.1. Fracción dependiente de los ácidos biliares.....	33
2.2.3.1.1. Captación hepática y transporte intracelular.....	34
2.2.3.1.2. Salida al canalículo.....	36
2.2.3.2. Fracción independiente de los ácidos biliares.....	38
2.2.3.3. Secreción biliar de los conductos biliares.....	40
2.2.3.4. Coleresis y colestasis.....	41
2.3. Sistemas de biotransformación hepáticos.....	43
2.3.1. Reacciones de fase I.....	45
2.3.1.1. El sistema oxidativo microsómico hepático:	
sistemas de monooxigenasas u oxidasas de función mixta.....	45
2.3.1.1.1. Características de los citocromos P-450.....	46
2.3.2. Reacciones de fase II.....	50
2.4. Defensas antioxidantes hepáticas.....	51
2.4.1. Glutatión.....	53
2.4.2. Actividades enzimáticas antioxidantes.....	57
2.5. Dicroceliosis.....	59
2.5.1. Introducción.....	59
2.5.2. Ciclo biológico.....	60
2.5.3. Manifestaciones clínicas y alteraciones morfológicas en la	
dicroceliosis.....	64
2.5.3.1. Sintomatología y alteraciones bioquímicas.....	64
2.5.3.2. Hallazgos histopatológicos.....	65
2.5.4. Patogenia.....	67

3. METODOLOGÍA.....	71
3.1. Animales.....	71
3.2. Infección experimental con <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	71
3.3. Diseño experimental.....	72
3.4. Procedimiento quirúrgico y desarrollo de los experimentos.....	73
3.4.1. Experimentos tipo A (condiciones basales).....	73
3.4.2. Experimentos tipo B (taurocolato).....	75
3.4.3. Experimentos tipo C (manitol [¹⁴ C]).....	75
3.4.4. Experimentos tipo D (colchicina).....	76
3.5. Estudio histopatológico.....	76
3.6. Soluciones utilizadas.....	77
3.7. Aparatos utilizados.....	78
3.8. Métodos analíticos.....	80
3.8.1. Determinaciones en plasma y bilis.....	80
3.8.1.1. Flujo biliar.....	80
3.8.1.2. Actividades transaminasas (ALT yAST) en plasma.....	80
3.8.1.3. Manitol [¹⁴ C] en plasma y bilis.....	81
3.8.1.4. Ácidos biliares en bilis.....	81
3.8.1.5. Bicarbonato en bilis.....	81
3.8.1.6. Glutación en bilis.....	82
3.8.1.7. Fosfolípidos en bilis.....	82
3.8.1.8. Colesterol en bilis.....	83
3.8.1.9. Determinación del índice litogénico.....	84
3.8.1.10. Actividad fosfatasa alcalina en bilis.....	84
3.8.1.11. Determinación cualitativa y cuantitativa de ácidos biliares por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).....	85
3.8.1.11.1. Preparación de la muestra.....	85
3.8.1.11.1.1. Desamidación enzimática.....	85
3.8.1.11.1.2. Derivatización.....	86
3.8.1.11.1.3. Metilación.....	86
3.8.1.11.1.4. Sililación.....	87
3.8.1.11.2. Método de GC-MS.....	87
3.8.1.11.2.1. Cromatografía de gases.....	88
3.8.1.11.2.2. Espectrometría de masas.....	88
3.8.2. Determinaciones en hígado.....	89
3.8.2.1. Obtención de homogeneizado fresco.....	89
3.8.2.2. Obtención de la fracción citosólica.....	89
3.8.2.3. Obtención de la fracción microsómica.....	89
3.8.2.4. Obtención de la fracción mitocondrial.....	89
3.8.2.5. Concentración de proteínas.....	90
3.8.2.6. Concentración de glutación reducido (GSH).....	91
3.8.2.7. Concentración de glutación oxidado (GSSG).....	91
3.8.2.8. Actividad -glutamylcisteína sintetasa (GCS).....	92
3.8.2.9. Actividad -glutamyltranspeptidasa (GGT).....	93
3.8.2.10. Actividad glutación S-transferasa (GST).....	93
3.8.2.11. Actividad glutación peroxidasa selenio dependiente (GPx Se dep.).....	94
3.8.2.12. Actividad glutación peroxidasa selenio independiente (GPx Se indep.).....	95
3.8.2.13. Concentración de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	95

3.8.2.14. Determinación de hidroperóxidos (DCF).....	96
3.8.2.15. Actividad superóxido dismutasa (SOD).....	96
3.8.2.16. Actividad catalasa (CAT).....	97
3.8.2.17. Actividad glutatión reductasa (GR).....	98
3.8.2.18. Citocromo P-450.....	98
3.8.2.19. Actividad NADPH-citocromo c (P450) reductasa.....	99
3.8.2.20. Actividad 7-etoxicumarina O-desetilasa.....	100
3.8.2.21. Actividad anilina hidroxilasa.....	100
3.8.2.22. Actividad aminopirina N-desmetilasa.....	101
3.8.2.23. Actividad eritromicina N-desmetilasa.....	102
3.8.2.24. Actividad colesterol 7 -hidroxilasa.....	103
3.8.2.25. Fluidez de la membrana microsómica.....	104
3.9. Tratamiento estadístico.....	105
4. RESULTADOS.....	107
4.1. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre diversos parámetros histológicos y bioquímicos.....	107
4.2. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre los mecanismos de formación de la bilis.....	118
4.3. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre el sistema glutatión y las enzimas antioxidantes hepáticas.....	131
4.4. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre el sistema de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450.....	138
5. DISCUSIÓN.....	141
5.1. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre diversos parámetros histológicos y bioquímicos.....	141
5.2. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre los mecanismos de formación de la bilis.....	144
5.3. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre el sistema glutatión y las enzimas antioxidantes hepáticas.....	154
5.4. Efectos de la dicroceliosis experimental sobre el sistema de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450.....	158
6. CONCLUSIONES.....	163
7. BIBLIOGRAFÍA.....	165

30.10.98

*H. Mehlhorn
Heinrich-Heine-Universität
Institut für Zoomorphologie
Zellbiologie und Parasitologie
Universitätsstrasse 1 (Geb. 26.03.00.70)
D-40225. Düsseldorf 1, Germany*

Dear Dr Mehlhorn,

A paper entitled OXIDATIVE STRESS AND CHANGES IN LIVER ANTIOXIDANT ENZYMES INDUCED BY EXPERIMENTAL DICROCOELIOSIS IN HAMSTERS is enclosed for publication, if accepted, in *Parasitology Research*. The paper has not been, as is not intended, to be sent to any other journal. The authors agree that, if and when accepted, the entire copyright shall thereupon pass to the above journal

Looking forward to hearing from you soon,
Sincerely yours,

J. González Gallego
Department of Physiology
University of León
24071 León
Spain
Tel 34 87 291258 - Fax 34 87 291267

1. INTRODUCCIÓN

La dicroceliosis es una enfermedad parasitaria muy frecuente en el ganado ovino y bovino de Europa, Asia y América del Norte (Soulsby, 1968) y la especie responsable en nuestro país *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Digenea). El trematodo se localiza en los conductos biliares y vesícula biliar de numerosos animales mamíferos, fundamentalmente rumiantes, tanto domésticos como silvestres, que actúan como hospedadores definitivos de dicho trematodo.

De acuerdo con la revisión realizada por Cordero del Campillo y cols. (1994), la especie *D. dendriticum* tiene una distribución generalizada en la Península Ibérica, y ha sido hallada en los siguientes hospedadores definitivos: asno, caballo, cabra, cabra montés, cerdo, conejo, liebre, oveja, vaca, perro y, ocasionalmente, el hombre.

Existe una amplia información sobre la prevalencia de la parasitosis por *D. dendriticum* en el ganado en nuestro país (Del Rio Lozano, 1967; Rojo-Vázquez y cols., 1981; García-Pérez y Juste-Jordan, 1987a; 1987b; Reina y cols., 1987; Cabanas y cols., 1989; Manga-González y cols., 1991; González-Lanza y cols., 1993; Ferre, 1994).

La dicroceliosis es mucho más benigna que la fasciolosis, a la que frecuentemente está asociada, y rara vez es mortal. El desarrollo de tratamientos eficaces contra *Fasciola hepatica* ha elevado la importancia relativa de *Dicrocoelium dendriticum*, también llamado pequeña duela lanceolada, especialmente en las regiones donde ambas trematodosis coincidían.

Las manifestaciones clínicas de la infección por *D. dendriticum* son poco llamativas, cursando con frecuencia de forma crónica con alteraciones digestivas y de la nutrición.

Dichos trastornos, derivados de las alteraciones hepatobiliares que provocan los parásitos, causan un retraso en el crecimiento (Hohorst y Lämmler, 1962), reducción en la producción de leche (Cavani y cols., 1982) y disminución en el peso de los animales (Boray, 1985), entre otras.

La importancia económica y sanitaria de la dicroceliosis se debe, por una parte, a las comentadas pérdidas indirectas en la producción, así como a las pérdidas directas ocasionadas por el decomiso de hígados alterados (Del Rio Lozano, 1967; Boch y Supperer, 1982; Lukin, 1980; Karanfilovski, 1983) y, por otra, al propio coste derivado del establecimiento de planes de profilaxis y de control de la parasitosis, con la aplicación de tratamientos antihelmínticos a los que deben ser sometidos los animales.

Sin embargo, todavía es escasa la información existente sobre las alteraciones patológicas provocadas por este parásito en condiciones experimentales, lo que hace difícil valorar las repercusiones económicas.

El control de la dicroceliosis en rumiantes requiere tratamientos intensivos con antihelmínticos y otros fármacos que pueden presentar un transporte y/o metabolismo hepático. Dado que las células hepáticas en los animales infectados pueden perder parte de su capacidad metabolizante y presentar alteraciones de tipo oxidativo, así como modificaciones en su función secretora, cabe esperar que se vea afectada la eficacia terapéutica de los mismos, pudiendo sufrir, asimismo, variaciones en la toxicidad de otros fármacos.

Debido a las dificultades que entraña la infección experimental con *Dicrocoelium dendriticum*, derivadas de su complejo ciclo biológico, es prácticamente nulo el conocimiento que se tiene actualmente sobre las modificaciones inducidas por el parásito sobre los sistemas de biotransformación y los mecanismos de defensa antioxidantes hepatocitarios.

Asimismo, se desconoce el efecto de esta parasitosis sobre los mecanismos de formación y secreción de la bilis y, por tanto, su repercusión sobre la eliminación biliar de fármacos y otros xenobióticos.

El objeto de la presente memoria ha sido investigar, utilizando como modelo cricetos infectados experimentalmente por la administración oral de metacercarias de *Dicrocoelium dendriticum*, las posibles alteraciones que se produzcan en la fisiología hepatobiliar como consecuencia de la dicroceliosis, con el fin de dilucidar en lo posible los mecanismos implicados en las mismas.

Para ello nos planteamos abordar los siguientes objetivos:

- Conseguir la infección experimental de cricetos con una única dosis de metacercarias de *D. dendriticum*, y realizar el seguimiento coprológico y la evolución del peso corporal de los mismos desde el momento de la infección hasta su sacrificio (80 y 120 días postinfección).

- Estudiar macroscópicamente e histológicamente, al microscopio óptico y electrónico, las posibles alteraciones originadas en el hígado y en la vesícula biliar por la presencia de *D. dendriticum* en los cricetos infectados.

- Evaluar las posibles alteraciones inducidas por la dicroceliosis experimental sobre el flujo biliar, la composición de la bilis y los mecanismos de formación de la misma.

- Comprobar los efectos de la dicroceliosis experimental sobre el sistema antioxidante hepático y valorar la posible existencia de estrés oxidativo derivado de la presencia del parásito en el hígado.

- Estudiar los posibles efectos de la dicroceliosis experimental sobre el funcionamiento del sistema oxidativo microsómico hepático, responsable de la biotransformación hepática de xenobióticos. Esto podría permitir ajustar las pautas terapéuticas y precisar los tiempos de espera de los fármacos utilizados en Medicina y Sanidad Animal, mejorando el desarrollo de los programas de control de esta parasitosis.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTRUCTURA HEPÁTICA

El hígado es un órgano que cumple dos funciones fundamentales en el organismo animal: funciones de síntesis y funciones de excreción. Para adaptarse a esta compleja funcionalidad, presenta una peculiar estructura en la que debemos considerar tanto los propios hepatocitos como las características de la circulación hepática.

El 90% de la población celular total del hígado está constituida por los hepatocitos (parénquima hepático), encontrándose en menor cuantía las células endoteliales, células de *Kupffer* (macrófagos tisulares), las células *Pit* (de aspecto granular) y las células de *Ito* (Jacquelyn y cols., 1993). Los hepatocitos se disponen en láminas celulares que irradian en forma centrífuga desde la vena central dejando espacios vasculares libres denominados sinusoides.

2.1.1. EL HEPATOCITO

2.1.1.1. MEMBRANA CELULAR

Los hepatocitos, de aspecto poliédrico, son las células responsables de la elaboración de la bilis canalicular. En la membrana del hepatocito podemos distinguir dos superficies morfológica y funcionalmente diferentes: la *superficie basolateral* (polo sinusoidal, en contacto con el sinusoides y polo lateral o intercelular), y la *superficie canalicular o apical* (polo canalicular).

La superficie basolateral está formada por la membrana plasmática del polo sinusoidal del hepatocito y por la membrana lateral. El polo sinusoidal presenta microvellosidades irregulares que aumentan la superficie de intercambio y se proyectan en el *espacio de Disse*, que se separa de los sinusoides por tres tipos de células sinusoidales: células de Kupffer, células endoteliales y células de Ito (Schachter, 1994). Hay características estructurales que facilitan el intercambio de sustancias en esta zona, como son la existencia de poros en la superficie sinu-

soidal y la ausencia de membrana basal en el sinusoides (Reuben, 1984). La membrana lateral presenta diferenciaciones denominadas complejos de unión, que facilitan la unión entre células. En los complejos de unión están incluidos los desmosomas, las uniones intermedias, las uniones estrechas y las denominadas uniones *gap* o hendidura, que facilitan el intercambio intercelular (Saez y Hertzberg, 1988), además de representar importantes barreras a la difusión entre el espacio intercelular y la bilis (Sellinger y Boyer, 1990). Las uniones estrechas juegan un papel muy importante en el transporte paracelular, facilitando el intercambio de fluidos y electrolitos (Desmet, 1977). Son, además, las principales responsables de la polaridad celular existente en el hepatocito (Sellinger y Boyer, 1990). La membrana lateral, al igual que la zona sinusoidal, se caracteriza por la presencia de una marcada actividad $\text{ATPasa Na}^+\text{-K}^+$ (Poupon y Evans, 1979; Reuben, 1984).

En la superficie canalicular se encuentran los canaliculos biliares, que son pequeños conductos carentes de pared propia con un extremo ciego en la región pericentral y otro abierto en la portal, localizados entre las membranas limitantes de dos o tres hepatocitos vecinos y que se separan de los espacios intercelulares por complejos de unión (Erlinger, 1993). Los canaliculos están rodeados por una estrecha zona de citoplasma libre de orgánulos, denominada ectoplasma pericanalicular. Esta región se caracteriza por la presencia de un citoesqueleto que presenta una gran cantidad de microfilamentos, microtúbulos y tonofilamentos, que son muy importantes tanto en el mantenimiento de la morfología de la membrana canalicular como en la secreción biliar, ya que estabilizan las estructuras de unión y las microvellosidades de la membrana canalicular (Sellinger y Boyer, 1990).

2.1.1.2. ORGÁNULOS CELULARES Y CITOESQUELETO

El citoplasma de los hepatocitos está repleto de orgánulos, especialmente de retículo endoplasmático liso y rugoso, mitocondrias y lisosomas que reflejan la extraordinaria capacidad biosintética y degradativa de estas células. Dependiendo del estado nutricional, el citoplasma contiene cantidades variables de vesículas lipídicas y gránulos de glucógeno.

El complejo de Golgi y el sistema de microtúbulos y microfilamentos son, de todos los elementos intracelulares, las estructuras más directamente relacionadas con la función exocrina de los hepatocitos (Delpierre y cols., 1988; Erlinger, 1993). El aparato de Golgi desempeña una gran variedad de funciones hepatocelulares, incluyendo la producción de lipoproteínas LDL, glicoproteínas y albúmina, y parece estar implicado en la formación de vesículas de exocitosis cuyo contenido en determinadas macromoléculas, como ácidos y lípidos biliares, se vierte como parte de la secreción biliar (Crawford y cols., 1988; Nathanson y Boyer, 1991; Marks y Larusso, 1993; Erlinger, 1996), contribuyendo así a la formación de la bilis. Se ha observado que el tratamiento con hormonas tiroideas, que estimulan la formación de la bilis, aumenta el tamaño del complejo de Golgi (Strange, 1984).

En fracciones subcelulares de los canalículos biliares y en hepatocitos aislados se ha comprobado la existencia de un ritmo característico en la actividad de los microfilamentos, que se modifica por cambios en las concentraciones de calcio y de ácidos biliares (French, 1985). Por otra parte, la administración de citocalasina B, sustancia que induce la despolimerización de los microfilamentos, provoca colestasis (Nathanson y Boyer, 1991). Los microtúbulos, a diferencia de los microfilamentos, se distribuyen por todo el citoplasma y parecen estar implicados en el transporte y secreción de proteínas y enzimas lisosómicas, colesterol, fosfolípidos y, tal vez, ácidos biliares, ya que se ha demostrado que tras la administración de colchicina, que causa la polimerización irreversible de los microtúbulos, se reduce el flujo biliar y la secreción de lípidos biliares en hígado aislado y perfundido (Oshio y cols., 1995).

2.1.2. EL SISTEMA BILIAR

Las vías de excreción de la bilis están constituidas por un sistema convergente de conductos que comienza en los canalículos biliares y termina en la desembocadura duodenal del colédoco o conducto hepático (en especies con o sin vesícula biliar, respectivamente). Esta red tridimensional de canales está formada por los canalículos biliares, los conductos de Hering o colangiolo, los conductos interlobulillares, los conductos biliares y, por último, los conductos hepáticos. El segmento extrahepático del árbol biliar está formado por el conducto hepático común, en el que confluyen los conductos hepáticos procedentes de cada lóbulo y el conducto cístico, que drena la vesícula biliar, formando el conducto colédoco, que llega hasta la región del esfínter de Oddi, situado en la pared del bulbo duodenal (Tavoloni, 1988).

Los canalículos biliares son los conductos más pequeños del árbol biliar, tienen un diámetro de 1-2 mm, carecen de pared propia y están limitados por dos o más hepatocitos adyacentes. El resto de las vías biliares tienen pared propia y tanto el tamaño de las células epiteliales como la luz de los conductos aumentan progresivamente a medida que se aproximan al intestino (Tavoloni, 1988). El epitelio de los conductos biliares está constituido por células muy heterogéneas, que constituyen el 3-5% del total de células del hígado, si bien proporcionan un área elevada para las funciones absorbente y secretora (Wheeler y Mancusi-Ungaro, 1966).

La especial disposición anatómica y estructural del árbol biliar tiene una serie de implicaciones funcionales importantes. En primer lugar, los canalículos, al estar cerrados por un extremo y con una relación superficie/volumen muy alta, se encuentran muy bien adaptados para funcionar como un sistema que permite un flujo inducido por gradientes osmóticos (Tavoloni, 1988). Por otra parte, las características morfológicas y funcionales de las células epiteliales de la red de conductos biliares intrahepáticos, tales como la reducida o nula permeabilidad del epitelio y la abundante vascularización peribiliar, procedente de ramas de la arteria hepática, sugieren que en ningún punto del árbol biliar existen condiciones favorables para la

filtración hidrostática, y que la bilis elaborada por los hepatocitos puede modificarse mediante procesos de secreción y/o absorción a su paso por las vías biliares (Erlinger, 1993). La vesícula biliar, también puede modificar la bilis concentrándola, al reabsorber H_2O , Na^+ y Cl^- , y acidificándola.

2.1.3. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL: EL ACINO HEPÁTICO

Los hepatocitos y el sistema biliar están perfectamente relacionados con los elementos de vascularización del hígado, formando la unidad funcional del mismo, cuyo concepto ha variado con el tiempo. Al hígado llega sangre con dos procedencias diferentes: sangre oxigenada procedente de la circulación general por medio de la arteria hepática y sangre de la circulación portal por medio de la vena porta. Ambos tipos de sangre se mezclan en los sinusoides que se extienden por el parénquima hepático, confluyendo posteriormente en las venas centrolobulillares y después en la vena hepática (Paumgartner y Paumgartner, 1982; Klaassen y Watkins, 1984; Lauth y Greenway, 1987).

Tradicionalmente, se ha considerado al lobulillo hepático como la unidad estructural y funcional del hígado. Los lobulillos hepáticos son espacios de sección hexagonal, delimitados en sus vértices por los espacios porta, que contienen la tríada portal. La sangre irriga a los hepatocitos a partir de los sinusoides y drena en una rama de la vena suprahepática (vena central) situada en el centro del lobulillo (Rappaport, 1973; 1980).

Actualmente, se considera que el hígado está constituido funcionalmente por los llamados acinos hepáticos, que son una masa de parénquima hepático dispuesta alrededor de un eje, el espacio porta, en el que se sitúan las ramas terminales de la vena porta, arteria hepática, conductillos biliares y vasos linfáticos (Lamers y cols., 1989).

La sangre accede por medio de la vena porta a los sinusoides y discurre hacia las ramas de la vena suprahepática (Rappaport, 1973; Lauth y Greenway, 1987). Así, los hepatocitos localizados cerca de los espacios porta son los primeros expuestos a la sangre aferente y reciben, por tanto, las concentraciones más elevadas de solutos y nutrientes. Éstos llegarán en menor cantidad a los hepatocitos centroacinares (Gumucio y Miller, 1982), estableciéndose un gradiente de concentración de solutos en la sangre sinusoidal que permite dividir a los acinos en tres zonas (1, 2 y 3 de Rappaport) desde el espacio porta a la vena central (Klaassen y Watkins, 1984; Lamers y cols., 1989; Gumucio y Guibert, 1993).

Los hepatocitos y las células que revisten los sinusoides están sostenidos por una fina red de fibras de reticulina que irradian desde la periferia de la vena central de cada lobulillo para unirse con la red reticular y con el escaso tejido conectivo de las áreas portales y de la periferia de los lobulillos. La reticulina es, por lo tanto, casi el único tejido conectivo que sirve de soporte al hígado. Esta red se continúa con una cápsula fina, aunque resistente, de tejido conectivo, denominada cápsula de Glisson, que protege la superficie externa del hígado.

2.2. COMPOSICIÓN Y MECANISMOS DE FORMACIÓN DE LA BILIS

2.2.1. COMPOSICIÓN DE LA BILIS

La bilis es una solución acuosa de compuestos orgánicos e inorgánicos, aproximándose su densidad a la unidad debido al elevado contenido en agua, con un pH que oscila entre 5,9 y 7,8 según la dieta y la especie, siendo más alcalina en herbívoros que en carnívoros y con una osmolaridad a su desembocadura en el duodeno similar a la plasmática (300 mosmol/l), modificándose paralelamente a ésta. Los ácidos biliares, lípidos (colesterol y fosfolípidos) y pigmentos biliares son los principales componentes orgánicos, mientras que el Na^+ , K^+ , Cl^- y HCO_3^- son los electrólitos inorgánicos más abundantes (Erlinger, 1993; 1994).

Los ácidos biliares son compuestos de naturaleza esteroide que se sintetizan exclusivamente en los hepatocitos a partir del colesterol, siendo la etapa inicial y limitante en su síntesis una 7- α -dihidroxiclación del ácido 5- α -colanoico, llevada a cabo por la actividad enzimática colesterol 7- α -hidroxilasa (Russell y Setchell, 1992). Así, se forma un grupo altamente polar, fácilmente soluble en agua, a partir de un grupo polar débil. La conversión del colesterol en ácidos biliares representa la vía más importante por la cual el colesterol es eliminado del organismo (Turley y Dietschy, 1988; Russell y Setchell, 1992). La principal forma para regular la expresión de la enzima en el criceto parece consistir en la inhibición de la transcripción génica por los ácidos hidrofóbicos procedentes de la circulación enterohepática (Horton y cols., 1994). En condiciones basales, la actividad 7- α -hidroxilasa es mucho más elevada en la rata que en el criceto (16 veces superior), difiriendo de éste no solo en la expresión basal de la enzima sino también en su capacidad de ser inducible por el sustrato (Horton y cols., 1994).

En la mayoría de los mamíferos, los ácidos biliares predominantes en la bilis están constituidos por cadenas de 24 átomos de carbono, generalmente saturadas y polihidroxicladas y con un grupo carboxilo en la cadena lateral (Hofmann, 1990). En función del lugar de su formación, los ácidos biliares se clasifican en: *Primarios*, sintetizados en el hígado a partir del colesterol (ácidos cólico y quenodesoxicólico); *Secundarios*, formados en el intestino por acción de la flora bacteriana sobre los ácidos biliares primarios (ácidos desoxicólico y litocólico); *Terciarios*, formados en el intestino o en el hígado a partir de los ácidos biliares secundarios, como los ácidos ursodesoxicólico y sulfolitocólico. La principal biotransformación por acción bacteriana es una 7-deshidroxiclación, paso que es precedido por la desconjugación de los ácidos biliares. La deshidroxiclación convierte el ácido quenodesoxicólico (AQDC) en ácido litocólico (ALC), el ácido cólico (AC) en desoxicólico (ADC), el ácido - y -hiocólico en hiodesoxicólico, y el ácido - y -muricólico en ácido muridesoxicólico. Existen diferencias entre las especies en cuanto a la cantidad relativa de los distintos ácidos biliares y a la naturaleza del aminoácido conjugante. En el criceto, los ácidos biliares mayoritarios son el cólico y el quenodesoxicólico (Bellentani y cols., 1987; Matejka y cols., 1990). En los fluidos biológicos los ácidos biliares se encuentran mayoritariamente en su forma aniónica, es decir, como sales biliares.

Los principales ácidos biliares son derivados hidroxilados de un núcleo común, el ácido 5- α -colánico (formado a partir del colesterol), pero su estructura difiere en el número de grupos hidroxilos y en la posición de los mismos (α y β) dentro de la molécula general, ciclopentanoperhidrofenantreno.

Sus propiedades son debidas a un equilibrio entre la estructura esteroidea hidrofóbica y la región hidrofílica que resulta de la yuxtaposición de los grupos hidroxílicos en diferentes posiciones del anillo y de la carga del anión conjugado con el ácido biliar. Por ser moléculas anfipáticas presentan capacidad para formar micelas (simples o mixtas) coloidales polimoleculares formadas en el agua a partir de una concentración micelar crítica determinada y una cierta temperatura.

Tanto los ácidos biliares primarios como los secundarios se conjugan en el hígado con glicocola o taurina (Russel y Setchell, 1992) mediante aciltransferasas, probablemente lisosómicas, y se secretan a la bilis como aniones (Hofmann, 1994). En algunos mamíferos también se secretan como ésteres del ácido glucurónico, aunque se desconoce la importancia del fenómeno y sus efectos sobre los mecanismos de formación de la bilis (Hagey y cols., 1985). También parece existir una cierta conjugación con sulfato, o incluso la formación de glucosídeos, sin que se hayan descrito conjugaciones con glutatión.

Una biotransformación de los ácidos biliares menos importante es la deshidrogenación o conversión de los grupos hidroxilo en grupos ceto (Hylemon, 1985). Dicha deshidrogenación puede tener lugar en cualquiera de los grupos hidroxilo, siendo más frecuente en unas posiciones que en otras. Así, en el hombre, presenta la siguiente secuencia: C3 > C7 > C12 (Björkhem y cols., 1986). Estos hidroxi- cetoácidos pueden ser reducidos tras su captación por los hepatocitos.

Los lípidos biliares se encuentran en la bilis como una mezcla de vesículas y micelas que contienen fosfolípidos y colesterol (Yuet y cols., 1996). La fosfatidilcolina es el más abundante de los fosfolípidos presentes en la bilis, constituyendo el 90-95% de los mismos (Boyer, 1986). Una pequeña fracción de su secreción biliar está constituida por fosfolípidos de nueva síntesis (20%) y el resto a partir de los lípidos preexistentes en el hepatocito (Coleman y Rahman, 1992). El colesterol se encuentra en la bilis casi en su totalidad en forma no esterificada (Coleman, 1987). Las fuentes de incorporación al organismo son la absorción del colesterol de la dieta y la síntesis *de novo* en los tejidos corporales a partir de acetil CoA, también de fuentes preformadas que incluyen el colesterol de las membranas intracelulares y extracelulares del hepatocito, así como el originado a partir de los ésteres de colesterol liberados en el interior del hepatocito mediante la degradación de las lipoproteínas plasmáticas captadas en el sinusoides (Coleman y Rahman, 1992).

La secreción de lípidos biliares parece estar cuantitativamente relacionada con la secreción de ácidos biliares. Se estimula principalmente por los ácidos más hidrofóbicos y no se induce por aquéllos que no forman micelas y, además, parece depender del sistema de microtúbulos (Crawford y cols., 1988; 1991). En cuanto a los pigmentos biliares, en la mayoría de las especies de mamíferos, aparecen en la bilis en forma de bilirrubina (Muraca y cols., 1988). Éste compuesto orgánico procede de tres fuentes, siendo la más importante la fracción obtenida de la destrucción fisiológica de los hematíes senescentes.

En menor proporción, se encuentra la bilirrubina formada mediante eritropoyesis ineficaz por destrucción prematura de los precursores de los eritrocitos en la médula ósea, y la tercera fuente es la relacionada con la degradación de hemoproteínas no hemoglobínicas (citocromos, catalasas, etc).

Otros compuestos orgánicos presentes en la bilis, aunque en pequeñas concentraciones, son las proteínas. La proteína mayoritaria es la albúmina, derivada del conjunto plasmático, estando también presentes otras sustancias peptídicas como el tripéptido glutatión (Lauteburg y cols., 1984; Harvey y cols., 1988). Asimismo, la bilis contiene glucosa y metabolitos de compuestos endógenos, principalmente de hormonas tiroideas y esteroideas (Erlinger, 1993).

Si bien la concentración biliar de compuestos inorgánicos es semejante a la concentración plasmática, las concentraciones de sodio, potasio, bicarbonato y calcio pueden ser más altas que las plasmáticas y menores en caso del cloruro, diferencias que son atribuidas a factores tales como la formación de micelas de ácidos biliares con baja actividad osmótica, diferencias del potencial eléctrico entre la luz y el líquido extracelular, y el transporte activo de iones (Erlinger, 1993).

2.2.2. FUNCIONES DE LA BILIS

La bilis desempeña un papel importante en la digestión y absorción intestinal de nutrientes, especialmente grasas y otras sustancias liposolubles, como las vitaminas A, D, E y K y el colesterol, sobre las que ejerce una acción emulsiva (Carey y cols., 1983).

Contribuye, asimismo, a la neutralización del pH ácido duodenal (Ainsworth y cols., 1991) y es la vía de eliminación mayoritaria o única de muchos compuestos endógenos o exógenos tales como el colesterol, pigmentos biliares, metabolitos de hormonas esteroideas y tiroideas, antibióticos, colorantes coléfilos (bromosulfoftaleína, verde de indocianina, rojo fenol, etc.) y otros xenobióticos (Barnhart y Combes, 1976; Klaassen y Watkins, 1984). La bilis desempeña, además, un papel importante en la defensa inmunológica local al vehicular inmunoglobulina A procedente del hepatocito hacia el intestino (Anwer, 1991).

2.2.3. MECANISMOS DE FORMACIÓN DE LA BILIS

La formación del flujo biliar es un proceso dependiente de ATP y de la acción coordinada de una serie de proteínas transportadoras en las superficies sinusoidal y canalicular del hepatocito. En los últimos años se han identificado, clonado y caracterizado un gran número de proteínas involucradas en la formación de la bilis.

Así, en la membrana sinusoidal de los hepatocitos se encuentra una proteína de transporte multiespecífica u Oatp 1, que media la captación de cationes y aniones orgánicos así como de compuestos orgánicos anfifílicos; una OCT1 específica en el transporte de cationes orgánicos; una Ntcp involucrada en la captación de ácidos biliares y una sGSHT responsable de la secreción de glutatión a sangre (Müller y Jansen, 1997).

En la membrana canalicular distinguimos una serie de transportadores dependientes de la hidrólisis del ATP y que por ello se incluyen en una familia denominada ABC (del inglés: ATP-binding cassette). Así, se encuentra una proteína MDR1 que media la excreción a bilis de metabolitos catiónicos mayoritariamente hidrofóbicos; una MDR3 (mdr2 en ratón) involucrada en la secreción de fosfatidilcolina (Crawford, 1997); una cBST mediadora de la secreción de sales biliares monovalentes y que es la base molecular del flujo biliar dependiente de los ácidos biliares; una proteína SPGP que se expresa exclusivamente en el hígado pero cuya función es todavía desconocida, y una cMOAT/mrp2 responsable de la excreción de conjugados aniónicos multivalentes anfipáticos y conjugados de ácidos biliares bivalentes (Müller y Jansen, 1997).

La bilis se produce de forma ininterrumpida en los canalículos biliares, modificándose al pasar por el sistema de conductos del árbol biliar, por procesos de reabsorción y/o secreción de agua y electrólitos inorgánicos.

Se ha descartado la filtración como mecanismo de formación de la bilis, debido a que el flujo biliar es independiente de la presión de perfusión y a que, además, la presión de secreción biliar excede a la presión de la sangre sinusoidal (Erlinger, 1993; 1994). El flujo biliar se origina como consecuencia de la formación de un gradiente osmótico entre la sangre, el espacio intercelular y los hepatocitos, por una parte, y el espacio canalicular, por otra. Este gradiente está producido por un transporte de solutos osmóticamente activos desde los hepatocitos al canalículo, y la bilis fluye gracias a que dicho gradiente es disipado constantemente por el movimiento de agua y solutos a través de la membrana canalicular y de las uniones estrechas (Sellinger y Boyer, 1990).

El transporte de solutos y agua para formar la bilis primaria se realiza a través del hepatocito, vía transcelular, o por los espacios intercelulares atravesando los complejos de unión, vía paracelular.

Por la vía paracelular tiene lugar el paso de electrólitos y pequeñas proteínas, permitiendo la formación de gradientes osmóticos en el espacio canalicular; la permeabilidad de dicha vía se regula mediante hormonas y por el citoesqueleto (Anwer, 1991).

Podemos distinguir dos fracciones dentro de la secreción biliar, la secreción biliar canalicular, dividida en una fracción dependiente de los ácidos biliares y otra independiente de los ácidos biliares, y la secreción biliar de los conductos (Klaassen y Watkins, 1984; Erlinger, 1993).

La formación de la bilis canalicular puede estimarse por la depuración biliar de diversos solutos inertes tales como el eritritol o el manitol. Se considera que, en la mayoría de las especies, estos compuestos fluyen libremente a través del hepatocito, entrando en los canaliculos biliares por difusión sin metabolizarse, ni secretarse o reabsorberse en los conductillos y/o conductos biliares (Feverly y cols., 1990). Los solutos inertes se caracterizan por presentar una cinética semejante a la del agua. Son altamente solubles en agua e insolubles en las membranas lipídicas, carecen de carga, no reaccionan con moléculas del plasma o de los tejidos ni con constituyentes de la bilis, si bien pueden atravesar en cierta medida el epitelio biliar en la rata (Smith y Boyer, 1982).

2.2.3.1. FRACCIÓN DEPENDIENTE DE LOS ÁCIDOS BILIARES

A la formación de flujo de bilis canalicular que se origina como consecuencia del transporte activo de los ácidos biliares se la conoce como fracción de secreción del flujo biliar dependiente de los ácidos biliares -FDAB- (Lenzen y cols., 1992; Erlinger, 1993).

En 1890, Schiff comprobó que la ingestión de bilis aumentaba el flujo biliar en perros provistos de una fístula biliar. Actualmente se sabe que los ácidos biliares son los agentes colestéricos más eficaces que se conocen (Hofmann, 1994). El flujo de bilis aumenta alrededor de 12 μ l por cada μ mol de ácidos biliares secretado en el hombre y de 16 μ l en la rata (Klaassen y Watkins, 1984).

Los ácidos biliares estimulan el flujo biliar en muchas especies, dándose una relación directa entre el flujo y la secreción biliar de estos ácidos (Sellinger y Boyer, 1990). Sin embargo, el proceso osmótico no es simple. Cuando la concentración de los ácidos biliares supera la concentración micelar crítica, se agrupan formando micelas que deben su poder osmótico a los iones asociados (Cohen y Carey, 1990; Erlinger, 1993). La pendiente de la recta de regresión que relaciona secreción de ácidos biliares y flujo de bilis es mayor para secreciones de ácidos biliares bajas que altas, lo que revela el efecto osmótico de los monómeros de ácidos biliares (Reuben, 1984).

Sólo una pequeña fracción de los ácidos biliares (alrededor del 10%), equivalente a la que se pierde por las heces, procede de la síntesis hepática *de novo*. La mayor parte de los secretados diariamente son reabsorbidos en el intestino, activamente en el íleon y pasivamente en el yeyuno y el colon (Carey y Duane, 1994), y conducidos por la vena porta al hígado, donde son captados con gran eficacia por receptores específicos de la membrana sinusoidal del hepatocito y de nuevo secretados a la bilis, estableciéndose así la circulación enterohepática de los ácidos biliares que es el factor regulador más importante en la síntesis de nuevos ácidos biliares (Carey y Duane, 1994; Hofmann, 1994).

En el transporte hepatobiliar de los ácidos biliares se pueden distinguir tres etapas consecutivas estrechamente relacionadas e interdependientes: captación o depuración hepática, transporte transcelular y secreción canalicular.

2.2.3.1.1. CAPTACIÓN HEPÁTICA Y TRANSPORTE INTRACELULAR

Los ácidos biliares se transportan en la sangre unidos a la albúmina y, en menor proporción, a lipoproteínas HDL, LDL y otras proteínas plasmáticas (Roda y cols., 1982). No se conoce con detalle como se establece la interacción entre los ácidos biliares y los receptores de la membrana sinusoidal del hepatocito, aunque se ha sugerido que la captación de éstos y otros aniones orgánicos se realizaría mediante interacciones directas del complejo albúmina-ligando con el receptor, más que por la pequeña fracción de estos aniones no ligados a la albúmina, que suele ser un 5% del total (Nathanson y Boyer, 1991).

El proceso de captación hepática de los ácidos biliares parece estar regulada por dos posibles mecanismos:

a) Un mecanismo acoplado al transporte activo dependiente de Na^+ (Reuben, 1984), en el que la energía necesaria para la captación proviene de la actividad $\text{ATPasa Na}^+-\text{K}^+$, localizada en la membrana basolateral de los hepatocitos, que mantiene una baja concentración de Na^+ dentro de la célula. Se trata, por tanto, de un transporte activo secundario, ya que no se utiliza directamente la energía procedente del ATP, sino a través de un gradiente iónico secundario (Paumgartner y Sauerbruch, 1983; Erlinger, 1993; Fitz, 1993). La proteína responsable de este transporte se denomina Ntcp (polipéptido cotransportador de taurocolato y sodio) y se encuentra localizada en la membrana basolateral de los hepatocitos (Oude-Elferink y cols., 1995). El transportador, de 51 kD, ha sido clonado y expresado en oocitos de *Xenopus laevis* (Hagenbuch y cols., 1994).

b) Mediante un segundo transportador independiente de sodio, Oatp1 (polipéptido transportador de aniones orgánicos), de 80 kD, clonado en hígado de rata (Meier, 1996).

Los ácidos biliares se acumulan y concentran en el interior del hepatocito, transportándose posteriormente hacia la membrana canalicular para secretarse en la bilis (Erlinger, 1990).

El transporte de los ácidos biliares desde el polo sinusoidal hasta la región pericanalicular no se conoce con exactitud, proponiéndose dos mecanismos no autoexcluyentes y con distinta importancia relativa: el transporte vesicular y/o la difusión de los ácidos biliares ligados a proteínas intracelulares (Erlinger, 1993).

Al menos tres proteínas citosólicas estarían implicadas en la fijación intracelular de los ácidos biliares: la proteína Y, la glutatión S-transferasa y la proteína fijadora de ácidos grasos (Stolz y cols., 1989; Nathanson y Boyer, 1991; Erlinger, 1993; Azer y Stacey, 1996).

Por otra parte, también se ha demostrado que los orgánulos intracelulares juegan un papel en el metabolismo intracelular y la secreción de los ácidos biliares. Así, se ha puesto de manifiesto, mediante estudios autorradiográficos utilizando análogos marcados de ácidos biliares, la presencia de éstos en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Suchy y cols., 1983; Lamri y cols., 1988; Crawford y cols., 1994), que se desplazarían luego a través de la célula por la actividad contráctil del citoesqueleto (Lamri y cols., 1988; Crawford y cols., 1994); además, los ácidos biliares estimulan el movimiento de vesículas desde el aparato de Golgi hasta la región pericanalicular (Crawford y cols., 1991).

Sin embargo, se ha demostrado que tras una inyección única de taurocolato en la vena porta, éste aparece en la bilis a los dos minutos y alcanza un pico a los cinco, lo que indica un curso más rápido que el transporte vesicular asociado a microtúbulos (Lamri y cols., 1988; Erlinger, 1993).

Estudios llevados a cabo por diversos autores indican que la colchicina, fármaco inhibidor de los microtúbulos, carece de efectos inhibidores de la secreción de ácidos biliares en condiciones basales o a dosis bajas de taurocolato, existiendo, sin embargo, una inhibición manifiesta de su secreción a dosis elevadas del mismo (Gregory y cols., 1978; Crawford y cols., 1988; Erlinger, 1996). Esto parece indicar que, en condiciones basales, el transporte hepatocitario de los ácidos biliares se realizaría mediante difusión por el citosol unidos a las proteínas de unión intracelulares (Crawford y cols., 1988), mientras que al aumentar el flujo transhepatocitario de ácidos biliares, éstos usarían la vía vesicular transcitótica dependiente de microtúbulos (Coleman, 1987; Crawford y cols., 1988; Nathanson y Boyer, 1991). Este sistema de transporte parece incluir varios orgánulos, como el retículo endoplasmático liso, el complejo de Golgi y vesículas de transcitosis (Meier, 1995).

Existe, además, una relación directa entre la utilización de esta vía por los ácidos biliares y la hidrofobicidad de los mismos (Crawford y cols., 1994). No obstante, la significación relativa de las proteínas citosólicas y los orgánulos celulares en el transporte intracelular de los ácidos biliares aún no se conoce con exactitud (Erlinger, 1996).

2.2.3.1.2. SALIDA AL CANALÍCULO

Se considera que la secreción canalicular de los ácidos biliares es generalmente el paso limitante en su transferencia desde la sangre a la bilis, ya que la velocidad máxima para la captación basolateral de taurocolato es muy superior a la velocidad de su secreción canalicular (Nathanson y Boyer, 1991; Azer y Stacy, 1996).

La secreción canalicular de los ácidos biliares es un proceso concentrativo y saturable, que parece caracterizarse por la participación de algún tipo de transportador (Tuchweber y cols., 1996). Utilizando vesículas de membranas canaliculares de hepatocitos altamente purificadas, se ha aislado e identificado una glicoproteína con un peso molecular de 110 kD denominada cBST (transportador canalicular de sales biliares) que es responsable de la translocación de los ácidos biliares monovalentes mediante mecanismos dependientes de ATP (Adachi y cols., 1991; Müller y cols., 1991; Meier, 1996), constituyendo la base molecular del FDAB. El transporte de los ácidos biliares bivalentes se realiza mediante la proteína cMOAT/mrp2 o transportador multiespecífico de aniones orgánicos (Paulusma y cols., 1996; Müller y Jansen, 1997).

Existe asimismo una dependencia del voltaje, ya que la hiperpolarización de la membrana canalicular en dupletes de hepatocitos aislados incrementa la secreción biliar en presencia, pero no en ausencia, de taurocolato (Weinman y cols., 1989).

En cualquier caso, parece necesaria la intervención de los microfilamentos y microtúbulos en la secreción canalicular de los ácidos biliares (Dubin y cols., 1980; Hofmann, 1990); tampoco puede descartarse el mecanismo de exocitosis con intervención del retículo endoplasmático y/o el aparato de Golgi (Suchy y cols., 1983; Erlinger, 1993). No obstante, la ruta transcitótica parece estar más relacionada con la regulación de los transportadores de ácidos biliares en la membrana canalicular que en su transporte intracelular y posterior secreción canalicular (Crawford y cols., 1994; Erlinger, 1996; Arrese y cols., 1997).

Los ácidos biliares, por su carácter anfótero, forman en el canalículo agregados polimoleculares o micelas por encima de una concentración y temperatura micelares críticas. Se ha propuesto que la formación del flujo biliar que se origina por la secreción de ácidos biliares sería el resultado de la actividad osmótica del catión inorgánico que acompaña al ácido biliar para mantener la electroneutralidad (Klaassen y Watkins, 1984); otros autores sugieren que no son los ácidos biliares los generadores directos del flujo osmótico, sino que actúan como reguladores sobre los sistemas de transporte de otros solutos osmóticamente activos, como el Na^+ , HCO_3^- y Cl^- , modificando la permeabilidad de las vías transcelular y/o paracelular (Erlinger, 1993).

Se define actividad o potencial colerético de los ácidos biliares como el volumen de flujo biliar que se secreta por cantidad molar de ácidos biliares recuperados en bilis. La activi-

dad osmótica de los ácidos biliares o capacidad colerética varía de unos ácidos biliares a otros en función de una serie de factores tales como el estado de conjugación, la relación de concentraciones de los diferentes tipos de ácidos biliares, etc. Así, el ácido dehidrocólico tiene un poder colerético en la rata superior al glicocólico o al taurocólico (Jiménez y cols., 1992). También se ha observado que la actividad colerética de los ácidos biliares varía con la especie debido, posiblemente, a las diferencias cualitativas del total y a las propiedades micelares de los mismos.

Como resultado del transporte de los ácidos biliares se produce un gradiente de concentración considerable entre sangre y bilis, siendo la concentración biliar 100 a 1000 veces superior a las concentraciones plasmáticas en la sangre sistémica o portal. Parte de este gradiente de concentración, no obstante, se explica mejor probablemente por la formación de micelas, lo cual evita la reabsorción de los ácidos biliares desde la bilis.

La secreción de colesterol a la bilis está ligada a la secreción de ácidos biliares y fosfolípidos, debido a la capacidad de los ácidos biliares para formar micelas mixtas que incorporan cantidades elevadas de lípidos biliares. El colesterol sintetizado se transporta desde el retículo endoplasmático a la bilis mediante un transportador de esteroides denominado proteína-2 (SCP-2), sin que intervenga el sistema de microtúbulos (Puglielli y cols., 1996). Los fosfolípidos destinados a ser secretados a la bilis llegan a la cara interna de la membrana canalicular mediante un transporte vesicular dependiente de microtúbulos (Ahmed y cols., 1995) y/o mediante proteínas citosólicas transportadoras de lípidos (Cohen y cols., 1994; Cohen, 1996), según la hidrofobicidad de los mismos. Posteriormente, el transporte de los fosfolípidos desde la cara interior de la membrana canalicular a la cara exterior se realiza mediante una glicoproteína transportadora de 170 kD, denominada *mdr2* (Beer y cols., 1993; Smit y cols., 1993; Ruetz y Gros, 1995; Oude-Elferink y cols., 1996). Parece existir otro transportador de fosfatidilcolina independiente de ATP, distinto de la *mdr2*, de menor peso molecular (Kullak-Ublick y cols., 1996).

Finalmente, los fosfolípidos y el colesterol se extraen de la membrana canalicular directamente hacia el interior de las micelas de sales biliares o de las vesículas por la acción detergente de los ácidos biliares (Coleman y Rahman, 1992).

Las hipótesis para explicar el mecanismo subcelular mediante el cual los ácidos biliares inducen la secreción de lípidos biliares a la bilis, contemplan un supuesto efecto ejercido dentro del hepatocito (Carey y Mazer, 1984; Crawford y cols., 1988). Así, los ácidos biliares parecen estimular la salida de fosfolípidos desde el retículo endoplasmático a la cara interna de la membrana canalicular mediante la activación de la proteína transportadora específica de fosfatidilcolina (Cohen y cols., 1994). No obstante, la regulación de dicha secreción parece ejercerse principalmente en el canalículo biliar por la interacción entre los ácidos biliares existentes en la luz del canalículo y la superficie de la membrana canalicular, como se ha indicado en la

rata (Verkade y cols., 1990; 1995; Crawford y cols., 1995). Los ácidos biliares podrían solubilizar microdominios específicos de fosfolípidos de la membrana canalicular, los cuales serían reemplazados por vesículas reparadoras de fosfolípidos que provienen del interior del hepatocito (Barnwell y cols., 1984; Lowe y cols., 1986).

Al igual que se ha demostrado para la bilirrubina y otros aniones orgánicos, existe un gradiente de concentración de ácidos biliares desde la zona 1 a la 3 de los acinos hepáticos, de tal modo que, en condiciones fisiológicas, la mayoría de los ácidos biliares son secretados por los hepatocitos de la zona acinar 1 (Blitzer y Boyer, 1982; Klaassen y Watkins, 1984).

Sin embargo, no toda la bilis canalicular depende de la secreción de los ácidos biliares. A la fracción de flujo de bilis que se origina como consecuencia de mecanismos no relacionados con los ácidos biliares se la denomina fracción de secreción independiente de los ácidos biliares.

2.2.3.2. FRACCIÓN INDEPENDIENTE DE LOS ÁCIDOS BILIARES

La existencia de este mecanismo de formación de la bilis canalicular se postuló al comprobar, en hígado aislado y perfundido, que la depuración de solutos inertes podía mantenerse elevada aunque en el medio de perfusión no hubiese ácidos biliares (Boyer y Klatskin, 1970). Convencionalmente, esta fracción se ha identificado con la bilis que se formaría en ausencia teórica de secreción de ácidos biliares. Dicho valor se determina por la intersección con el eje de ordenadas de la recta de regresión que relaciona el flujo de bilis y la secreción de los ácidos biliares (Erlinger y cols., 1970).

Estudios posteriores han cuestionado la validez general de esta aproximación matemática, ya que no es totalmente correcto asumir que la actividad osmótica de los ácidos biliares no se modifica a concentraciones biliares reducidas, inferiores a la concentración micelar crítica (Balabaud y cols., 1977). Además, aparte de sus efectos osmóticos, el flujo de los ácidos biliares a través del hepatocito parece afectar a la actividad de otros sistemas de transporte (Erlinger, 1993). No obstante, el método se sigue empleando en la actualidad y constituye, por el momento, la única vía de aproximación a la realidad fisiológica. Por este procedimiento se ha calculado que el valor de esta fracción independiente varía en relación con las especies, siendo del 40% del total del flujo biliar en humanos y del 40-60% en lagomorfos y roedores (Klaassen y Watkins, 1984; Erlinger, 1993).

El mecanismo de formación de esta fracción del flujo biliar se ha intentado explicar por la existencia de un transporte mediado por una ATPasa dependiente de Na^+ - K^+ , basándose en experimentos en los que se utilizaron inhibidores o inductores de dichas ATPasas. No obstante, la localización de la enzima no apoya la hipótesis del transporte regulado por sodio a través de la membrana canalicular (Erlinger, 1993).

También se ha propuesto un papel del HCO_3^- , ya que, en hígado de rata aislado y perfundido con una solución libre de bicarbonato se produce una disminución en el flujo biliar independiente de los ácidos biliares de un 50% (Hardison y Wood, 1987). En los túbulos renales o en las células epiteliales pancreáticas, el transporte de HCO_3^- está regulado por un sistema de intercambio de Na^+/H^+ , también presente en las membranas basolaterales de los hepatocitos (Arias y Forgac, 1984; Moseley y cols., 1986). No obstante, su papel en la formación biliar no está totalmente esclarecido.

Se han caracterizado diversos sistemas de transporte de electrólitos en la membrana plasmática del hepatocito. Además del sistema ya mencionado anteriormente, se han identificado otros dos sistemas de intercambio: un sistema de intercambio de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ en vesículas de membrana canalicular (Gleeson y cols., 1989; Boyer, 1996) y un sistema de cotransporte de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ en vesículas de membrana basolateral (Renner y cols., 1989). No obstante, la participación de estos iones no está perfectamente establecida y los resultados son aún contradictorios (Graf y Haussinger, 1996).

Diversos estudios implican al glutatión como el principal soluto responsable de la formación del flujo biliar independiente de los ácidos biliares en la rata (Ballatori y Truong, 1989; 1992; Mohan y cols., 1994). Los compuestos que modifican la secreción biliar de glutatión en hígado aislado y perfundido modifican paralelamente el flujo biliar, existiendo una relación lineal en diferentes situaciones experimentales entre el flujo biliar y la secreción de glutatión (Ballatori y Truong, 1989; Hofmann, 1990). No se ha descrito ninguna condición o agente que pueda alterar selectivamente la secreción de glutatión sin producir un cambio concomitante en el flujo de bilis. De este modo, el glutatión sería la principal fuerza en la formación de la bilis canalicular independiente de los ácidos biliares (Hofmann, 1990; Mohan y cols., 1994).

El glutatión se encuentra en la bilis de la rata en concentraciones elevadas, siendo, probablemente, el componente orgánico más abundante de ésta. Debido al catabolismo intrabiliar de éste tripéptido, su concentración en la bilis canalicular es más elevada que la que se encuentra en la bilis excretada (Ballatori y Truong, 1992).

El transporte hepatobiliar del glutatión no es el resultado de una simple difusión (Ballatori y Truong, 1989) sino que es un proceso que se realiza mediante, al menos, dos transportadores diferentes que permiten su salida a sangre y a bilis (Fernández-Checa y cols., 1993b). Estos transportadores son bidireccionales e independientes del sodio y presentan baja afinidad por el glutatión. El transportador sinusoidal se expresa únicamente en el hígado, mientras que el transportador canalicular existe en todos los órganos examinados (Lu y cols., 1996). La proteína cMOAT/mrp2 (transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos), dependiente de ATP, parece ser la responsable del transporte canalicular de glutatión oxidado (Leier y cols., 1996), los conjugados de glutatión (Müller y cols., 1994), de glucurónico y de sulfato y también del transporte canalicular del glutatión reducido (Oude-Elferink y cols., 1995; Lu y cols., 1996).

Los conjugados de glutatión tienen un gran poder colerético. Compuestos como el dietil maleato y la bromosulfotaleína, que se encuentran en gran parte conjugados con el glutatión en el hígado, se secretan a la bilis en altas concentraciones. Estas elevadas concentraciones de glutatión presentes en la bilis crean un gradiente osmótico que obliga a la secreción de agua y electrólitos. El propio glutatión podría crear un gradiente entre la bilis y el hepatocito (Ballatori y Truong, 1992).

La fracción de secreción independiente de los ácidos biliares también podría formarse por vía paracelular, mediante el paso de agua y solutos a través de los espacios intercelulares y los complejos de unión. La permeabilidad de dicha vía se regula por hormonas y por el citoesqueleto (Anwer, 1991). Si bien no se ha determinado cuantitativamente la importancia del proceso, parece ser que las uniones estrechas serían permeables a cationes y a pequeñas moléculas neutras, induciendo movimientos osmóticos de agua (Klaassen y Watkins, 1984; Erlinger, 1993).

El citoesqueleto participa de forma más o menos directa en la formación de la bilis mediante el transporte paracelular de electrólitos y pequeñas proteínas, anteriormente citado y, además, mediante su contracción facilitando el avance de la bilis por el sistema de canaliculos y conductos biliares (Watanabe y cols., 1991).

2.2.3.3. SECRECIÓN BILIAR DE LOS CONDUCTOS BILIARES

El sistema de conductos biliares puede contribuir a la secreción biliar incrementando el volumen y la composición electrolítica de la bilis canalicular gracias a una secreción de agua, que depende a su vez de la secreción activa de bicarbonato. El epitelio biliar, tanto intrahepático como extrahepático, vehicula y modifica la bilis hepatocelular por secreción y/o reabsorción de fluido y electrólitos, siendo el lugar de mayor actividad transportadora (Tavoloni, 1987; Strazzabosco y cols., 1991). Este mecanismo presenta una alta sensibilidad a la secretina, la cual estimula el transporte activo de bicarbonato en las células epiteliales (Erlinger, 1993; Elsing y cols., 1996; Roberts y cols., 1997).

Se ha demostrado la existencia de una relación lineal entre el flujo biliar y el número de células de los conductos biliares, de tal modo que la hiperplasia de los conductos biliares induce una marcada coleresis (González y cols., 1991; López y cols., 1993). Se ha observado esta misma relación en pacientes cirróticos, que presentan proliferación del epitelio de los conductos biliares, en los que el flujo biliar y la concentración biliar de HCO_3^- se incrementan frente a sujetos sanos (Jiménez y cols., 1992).

Las células del epitelio biliar expresan diversos mecanismos de transporte de $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ que incluyen el intercambio Na^+/H^+ , el cotransporte de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ y el intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, entre otros (Strazzabosco y cols., 1991; Villanger y cols., 1993). Si

bien la localización específica de estos transportadores en la membrana plasmática de las células epiteliales aún no ha sido establecida para todos ellos, los mecanismos de salida neta de H^+ parece que residen en la membrana basolateral, mientras que los de salida de HCO_3^- lo hacen en la apical (Strazzabosco y cols., 1996). Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha localizado de forma específica un intercambiador de Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ , en las membranas apicales de las células epiteliales biliares, que parece estar implicado en la secreción biliar de bicarbonato (Martínez-Ansó y cols., 1994).

En la mayoría de las especies, incluyendo el hombre, la secreción de HCO_3^- en los conductos biliares y la formación de la bilis se estimulan por la acción de la secretina. Si bien esta coleresis parece estar regulada por el sistema del AMPc (Lenzen y cols., 1992), los mecanismos de transporte celulares no se conocen todavía. En estudios realizados en cerdos se indicó que la coleresis inducida por la secretina en los conductos biliares se debería a la fusión de vesículas intracitoplasmáticas de exocitosis con la membrana basolateral de las células del epitelio biliar (Buanes y cols., 1988). Estudios más recientes indican, sin embargo, que los mecanismos dependientes de microtúbulos no estarían involucrados en la misma (Dällenbach y Renner, 1995).

Algunos autores también han descrito una intervención del sistema de conductos biliares en el flujo biliar dependiente de los ácidos biliares. En particular, el ácido biliar hipercolerético ursodesoxicólico induce una coleresis rica en bicarbonato, que se ha explicado por la recirculación de la molécula desde el epitelio biliar a los hepatocitos por medio del plexo capilar (Anwer y cols., 1989).

El sistema de conductos biliares puede, asimismo, concentrar la bilis canalicular mediante la reabsorción de agua siguiendo osmóticamente el movimiento de los compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, reabsorbidos activamente por las células epiteliales intrahepáticas (Tavoloni, 1987; Nathanson y Boyer, 1991).

La contribución de la bilis originada en los conductos biliares a la secreción biliar total varía con la especie, siendo inferior a un 10% en la rata y aproximadamente de un 40% en el hombre (Tavoloni, 1988).

2.2.3.4. COLERESIS Y COLESTASIS

El flujo biliar puede aumentar (coleresis) o disminuir (colestasis) por acción de diversos compuestos tanto endógenos como exógenos. Entre los compuestos endógenos se encuentran principalmente los ácidos biliares, de los que hemos hablado anteriormente y entre los exógenos se encuentran diversos aniones y cationes orgánicos, así como compuestos neutros.

Entre los aniones orgánicos podemos citar el verde de indocianina, las cefalosporinas, la iodipamida, la BSP, el rosa de Bengala, el dietil maleato, el ácido valproico o el rojo fenol

(Erlinger, 1982; Okolicsanyi y cols., 1986; Collado y cols., 1988; López y cols., 1992), que estimulan el flujo biliar en diversas especies de mamíferos. La coleresis inducida por los compuestos anteriores se debe predominantemente a la actividad osmótica de los mismos y/o de sus metabolitos excretados en la bilis, de manera similar a como sucede con los ácidos biliares (Esteller y cols., 1981; González y cols., 1989).

Hay otro grupo de sustancias como son la teofilina, el glucagón (Erlinger y Dhumeaux, 1974) o los barbitúricos (Capron y Erlinger, 1975), que también son capaces de incrementar el flujo de bilis independiente de los ácidos biliares. Ninguna de las citadas sustancias se excreta de forma apreciable por la ruta biliar lo que descarta que el aumento del flujo se deba a un efecto osmótico. Parece ser que actuarían por estimulación del transporte de sodio ligado a la AT-Pasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Erlinger, 1993). Se ha descrito, de forma excepcional, la existencia de moléculas capaces de estimular la fracción de secreción dependiente de los ácidos biliares (Ruiz y cols., 1988).

Algunos ácidos biliares, en especial el ursodesoxicólico y el 7-ceto-litocólico, producen un incremento en la concentración de bicarbonato en la bilis y aumentan paralelamente el flujo biliar (Dumont y cols., 1991). Aunque en un principio se postuló que la acumulación de bicarbonato puede ser debida a la estimulación de un sistema de transporte de bicarbonato en las células de los conductos biliares (Hofmann, 1990), actualmente el efecto colerético del ursodesoxicólico se explica mediante la teoría del "circuito hepatocelular". Según ésta, cuando el ursodesoxicólico alcanza la luz del conducto, como ácido débil se protona, es reabsorbido pasivamente por el epitelio biliar y vuelve a los hepatocitos (Strazzabosco y cols., 1991; Elsing y cols., 1994).

A dosis elevadas, muchos aniones orgánicos ejercen efectos colestáticos. Es el caso del verde de indocianina o de la BSP (Priestly y Plaa, 1970). La colestasis puede deberse a una acumulación intrahepática de esos aniones, con inhibición de la respiración mitocondrial (Burr y cols., 1977; Gregus y cols., 1979) o de las ATPasas dependientes de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y de Mg^{2+} (Meijer y cols., 1978) que crean un gradiente que posibilita la entrada de determinados ácidos biliares a las células hepáticas, existiendo agentes colestáticos que actúan destruyendo dicho gradiente; entre ellos, los más conocidos son la clorpromazina y el etinil estradiol (Oeldberg y cols., 1986; Utili y cols., 1992).

Por otra parte, el flujo biliar está relacionado directamente con el movimiento transcelular de solutos osmóticamente activos. Por lo tanto, los agentes que inhiban el movimiento activo o pasivo de estos solutos a través de la célula actuarán favoreciendo la colestasis (Oeldberg y cols., 1986). Así, las toxinas faloidina y citocatalasina B alteran la estructura de los microfilamentos con consecuencias diversas, tales como modificaciones de la permeabilidad paracelular, disminución de la contractibilidad canalicular o reducción de la exocitosis (Phillips y cols., 1986). El agente inmunosupresor ciclosporina A produce un efecto colestático, el cual

está relacionado, al menos parcialmente, con alteraciones del sistema de transporte microtúbulo-vesicular (Román y cols., 1990; Azer y Stacey, 1996). La administración de dosis elevadas del fármaco inmunosupresor Tacrolimus (FK506) induce en la rata una colestasis debida a una reducción de la fracción independiente de los ácidos biliares, al disminuir la secreción biliar de glutatión al aumentar su eflujo sinusoidal, acompañada de una disminución menos manifiesta de la secreción biliar de bicarbonato (Sánchez-Campos y cols., 1998).

Otra vía de estimulación de la colestasis sería la disminución en el número de receptores para los ácidos biliares asociados a la membrana del hepatocito. Un agente colestático que presenta este modo de actuación es la cicloheximida, inhibidora de la síntesis de proteínas y, por tanto, de los receptores proteicos mencionados (Oelberg y cols., 1986).

En ocasiones puede existir una alteración predominante del polo canalicular del hepatocito. Un ejemplo es la colestasis inducida por bilirrubina-manganeso, que se debe a la incorporación de los complejos a la membrana canalicular (Witzleben y cols., 1987). En la colestasis causada por litocólico y taurolitocólico se observan alteraciones morfológicas de la membrana canalicular que se han atribuido a una excesiva incorporación de colesterol y reducción en la fluidez de la misma (Tuchweber y cols., 1992).

Por último, existen mecanismos colestáticos relacionados con el calcio intracelular. Muchos ácidos biliares a dosis elevadas reducen el flujo biliar como consecuencia de un incremento en la concentración del mismo, bien por su acción como ionóforos, o por la liberación selectiva de éste desde los compartimentos intracelulares (Nathanson y Boyer, 1991).

2.3. SISTEMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN HEPÁTICOS

Los animales, incluyendo los humanos, están expuestos a un gran número de compuestos potencialmente tóxicos tanto de origen endógeno como exógeno, y parecen haber desarrollado sistemas enzimáticos que facilitan la eliminación de dichos compuestos. El metabolismo de los xenobióticos se ha desarrollado como una forma de protección contra las toxinas ambientales. Esto es especialmente cierto para compuestos lipofílicos, fácilmente absorbibles, que pueden ser convertidos en derivados polares antes de ser excretados en orina o bilis.

La mayoría de los fármacos y de otros xenobióticos que ingresan en el organismo son metabolizados y transformados total o parcialmente en otras sustancias. Las enzimas encargadas de realizar estas transformaciones, que también pueden actuar sobre diferentes compuestos endógenos, se encuentran principalmente en el hígado (Watkins, 1990), en su mayoría en el retículo endoplasmático, aunque también se localizan en menor concentración en mitocondrias, núcleo y otras membranas (Loeper y cols., 1990). Dichas transformaciones tienen lugar en menor proporción en otros órganos tales como el riñón, pulmón, intestino, glándulas adrenales

y otros tejidos, así como en la propia luz intestinal (por acción bacteriana). Existen pocos fármacos que no sufren biotransformación y son excretados sin modificar.

El hígado reúne condiciones idóneas para metabolizar fármacos lipofílicos, debido a que posee un endotelio sinusoidal fenestrado que permite el paso de las proteínas plasmáticas mediante difusión pasiva desde dichos sinusoides al espacio de Disse. Así, los fármacos ligados a proteínas pueden contactar con la membrana hepatocitaria y desde allí difundir o ser activamente transportados hasta el interior del hepatocito. Una vez formados, los metabolitos hidrosolubles pueden ser excretados de nuevo al espacio de Disse para pasar de aquí a los sinusoides y a la circulación sistémica disueltos en el plasma, y ser eliminados por el riñón. También pueden ser excretados a bilis desde el hepatocito, desde donde generalmente pasarán a las heces, dado que los metabolitos hidrosolubles suelen ser mal absorbidos por la mucosa intestinal.

Los xenobióticos experimentan cambios metabólicos en el organismo orientados principalmente hacia la formación de metabolitos que tengan propiedades fisicoquímicas favorables para su excreción. Los productos de biotransformación son generalmente menos solubles en los lípidos y son polares por naturaleza. Esta polaridad hace a los metabolitos aptos para los procesos de excreción regulados por transportadores.

Los compuestos tóxicos de origen endógeno no modifican el material enzimático de un organismo, sino que son transformados por sistemas enzimáticos ya existentes. En lo que se refiere a los compuestos exógenos, si bien son transformados por sistemas enzimáticos que a su vez metabolizan compuestos endógenos, poseen la capacidad de modificar la síntesis de algunas enzimas, e incluso para desreprimir o inducir algunos de los sistemas ligados al proceso de metabolización.

Las reacciones químicas que participan en el mecanismo de la biotransformación de compuestos endógenos y xenobióticos se clasifican en reacciones de fase I y de fase II. En la fase I se producen los procesos de oxidación, reducción e hidrólisis, dando lugar a alguno o varios de estos resultados: a) inactivación; b) conversión de un producto inactivo en otro activo; c) conversión de un producto activo en otro también activo cuya actividad terapéutica puede ser cuantitativamente similar o distinta a la del fármaco original y d) conversión de un producto activo en otro igualmente activo pero cuya actividad resulta tóxica.

En las reacciones de fase I se introducen grupos $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, que hacen posible que los compuestos experimenten los procesos de conjugación (fase II) de los que resultan compuestos polares, hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente eliminables por la orina y la bilis.

En las reacciones de fase II tienen lugar los procesos de conjugación o síntesis, que incluyen el acoplamiento entre el fármaco o su metabolito y un sustrato endógeno como el ácido

glucurónico, sulfúrico, acético o un péptido como el glutatión. Estos agentes conjugantes no reaccionan directamente con el fármaco o su metabolito sino que lo hacen con una forma activada del fármaco (generalmente en forma de nucleótidos). Los conjugados formados son solubles en agua y casi siempre inactivos desde el punto de vista farmacológico (Williams, 1971).

Las reacciones de oxidación tienen lugar preferentemente en la fracción microsómica del hígado y de otros tejidos y, en menor medida, en la fracción mitocondrial; las reacciones de reducción en la fracción microsómica; las de hidrólisis en el plasma y diversos tejidos, mientras que las de conjugación se producen en los microsomas y en el citosol del hígado y otros tejidos (De Bethizy y Hayes, 1989; Jakoby, 1994; Ziegler, 1994).

Una determinada molécula puede ser transformada simultáneamente en varios lugares, y convertirse simultánea o consecutivamente en múltiples metabolitos. La variedad de metabolitos y la concentración de cada uno de ellos dependerá de la dotación enzimática del individuo.

2.3.1. REACCIONES DE FASE I

2.3.1.1. EL SISTEMA OXIDATIVO MICROSÓMICO HEPÁTICO: SISTEMAS DE MONOOXIGENASAS U OXIDASAS DE FUNCIÓN MIXTA

Los sistemas enzimáticos que intervienen en la biotransformación de muchos xenobióticos están ubicados principalmente en el retículo endoplasmático liso hepático. Estas enzimas están presentes también en el riñón y en el epitelio gastrointestinal, estos últimos localizados en la punta de la vellosidad (Kolars y cols., 1992). Los xenobióticos absorbidos en el intestino pueden así ser sometidos al denominado "efecto del primer paso", que representa la acción combinada de enzimas epiteliales gastrointestinales y hepáticas metabolizadoras, que pueden evitar la aparición de concentraciones significativas de un fármaco en la circulación después de su administración oral.

El retículo endoplasmático no puede aislarse como una estructura intacta a partir de tejidos enteros, pero puede obtenerse selectivamente desde tejidos lisados como un precipitado que contiene minúsculas vesículas de membranas rotas denominadas microsomas. El sistema de monooxigenasas se encuentra en la fracción microsómica de muchos tipos celulares, pero presenta su más alta concentración en los hepatocitos.

Las enzimas microsómicas, adosadas a la estructura membranosa del retículo, catalizan las conjugaciones de glucurónidos y casi todas las oxidaciones de los fármacos, mientras que en las reacciones de reducción e hidrólisis intervienen tanto enzimas microsómicas como no microsómicas. También contribuyen a la biotransformación de los ácidos grasos y hormonas esteroideas e intervienen en la conjugación de la bilirrubina.

Para que una determinada sustancia sea metabolizada por los microsomas hepáticos ha de tener un cierto grado de lipofilia para penetrar en el retículo endoplasmático e interactuar con sus enzimas. La actividad de estas enzimas puede ser inducida por muchos fármacos y sustancias químicas ambientales, y tanto la susceptibilidad a la inducción como la actividad enzimática están determinadas genéticamente.

La oxidación es, desde el punto de vista fisicoquímico, la pérdida de electrones por una molécula o átomo, disminuyendo su carga negativa o aumentando la positiva. En los sistemas redox, los electrones van recorriendo una serie de moléculas químicas que los transpasan a otras. En varios sistemas intervienen los citocromos, evitando que la oxidación sea una acción violenta con una gran pérdida de energía en forma de calor. El mecanismo común mediante el cual se producen la gran variedad de reacciones oxidativas es la hidroxilación.

Las enzimas que intervienen son oxigenasas microsómicas que utilizan tan sólo un átomo de la molécula de oxígeno para la oxidación del sustrato, por lo que se llaman monooxigenasas, mientras que el otro se reduce para formar agua (por lo que se llaman oxidasas mixtas) merced a la presencia de un donante externo de electrones que en el hígado es el NADPH (Ziegler, 1994).

La fracción microsómica hepática contiene las distintas monooxigenasas que catalizan la oxidación de una gran cantidad de xenobióticos, de los que el sistema citocromo P-450 es el más importante (Ziegler, 1994).

Las actividades del sistema monooxigenasa requieren la integridad de un flujo de electrones, siendo componentes esenciales del sistema la flavoproteína NADPH citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450. Éste es el aceptor electrónico terminal y el lugar de unión de sustratos del sistema oxidasa microsómico de función mixta, siendo, probablemente, el más versátil y singular de los catalizadores biológicos (Gascon y Dayer, 1993).

2.3.1.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS CITOCROMOS P-450

Con el término citocromo P-450 se agrupa un amplio conjunto de enzimas cuyo conocimiento ha aumentado de forma extraordinaria en la última década. Especial interés ha despertado su papel primordial en la capacidad hepática para metabolizar xenobióticos y su participación en los mecanismos de hepatotoxicidad. El citocromo P-450 interviene en el metabolismo oxidativo, indispensable para transformar sustancias químicas endógenas o exógenas para que posteriormente puedan ser eliminadas. Prostaglandinas, ácidos biliares, esteroides endógenos, carcinógenos y multitud de fármacos, entre otras muchas sustancias, precisan de este sistema para que el organismo siga manteniendo su funcionalidad (Watkins, 1990). Su localización es ubícuca, aunque el papel desempeñado por las formas extrahepáticas no está totalmente establecido.

El citocromo P-450 es una hemoproteína denominada así porque absorbe luz a una longitud de onda de 450 nm cuando se expone a monóxido de carbono, propiedad que constituye también la base de su determinación analítica. El CO bloquea, además, el metabolismo de muchos fármacos por parte del sistema oxidativo microsómico. En 1958 se puso de manifiesto la existencia de un pigmento con esas características y se denominó P(pigmento)-450 (Garfinkle, 1958; Klingenberg, 1958), identificándose posteriormente mediante estudios espectrofotométricos como una hemoproteína, un nuevo citocromo de tipo b (Omura y Sato, 1964). En mamíferos, el citocromo P-450 se encuentra en concentraciones variables en microsomas de hígado, riñón, intestino delgado, pulmón, corteza adrenal, piel, testículos, placenta y otros tejidos (Sato y Omura, 1978). Las mitocondrias del hígado, del riñón y, especialmente, de las glándulas endocrinas que metabolizan hormonas esteroideas, contienen citocromo P-450. Asimismo, se ha detectado la presencia de pequeñas cantidades de P-450 en las membranas plasmáticas hepáticas (Romano y cols., 1983).

En realidad el citocromo P-450 consiste en un numeroso grupo de isoenzimas o formas P-450 que poseen especificidades superponibles hacia muy diversos sustratos (Gonzalez, 1992; Ziegler, 1994), con distintas propiedades inmunológicas, mapas peptídicos, composición y secuencia de aminoácidos, así como distintos genes y con diferentes mecanismos de regulación. La exposición a determinados productos exógenos aumenta la actividad metabolizante de ciertos sustratos y no de otros, debido al incremento de determinadas y específicas formas de citocromo P-450, lo que significa que estas isoenzimas se encuentran sometidos a mecanismos de control independiente.

El sistema microsómico del hígado, pulmón y piel juega un importante papel en la conversión de un elevado número de xenobióticos lipofílicos, incluyendo fármacos, insecticidas, carcinógenos, aditivos alimentarios y contaminantes ambientales, en compuestos más polares, para que puedan ser más fácilmente excretados. El P-450 se considera como un importante mecanismo de detoxificación celular. No obstante, en algunos casos, el metabolismo por medio del citocromo P-450 de diversos compuestos inicialmente no tóxicos puede generar intermediarios reactivos que atacan a ciertos constituyentes hepáticos (DNA, lípidos insaturados, proteínas y glutatión) provocando daño celular hepático o cáncer. Por ello, la función de oxidación mixta dependiente del citocromo P-450 no representa siempre un mecanismo de detoxificación (Winters y Cederbaum, 1993).

El sistema microsómico citocromo P-450 requiere NADPH o NADH para activar el oxígeno molecular. Consiste en una flavoproteína y una familia de hemoproteínas relacionadas, pero distintas. La flavoproteína cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH a la hemoproteína, que es la verdadera monooxigenasa. La reductasa (NADPH-citocromo P-450) es una flavoproteína monomérica de 74-80 kD que contiene FAD y FMN en una relación 1:1 por molécula de enzima. El citocromo P-450 se encuentra en gran cantidad en la fracción microsómica, en una relación de 10-100 moléculas de citocromo P-450 por una de reductasa.

Los microsomas de hígado de rata contienen NADPH P-450 y NADH b₅ reductasa, citocromo P-450 y citocromo b₅. Las dos reductasas y el citocromo b₅ son proteínas integrales de la membrana que son anfipáticas (Winters y Cederbaum, 1993).

Las reacciones catalizadas por las oxidasas microsómicas de función mixta incluyen S-, N-, y O-desalquilación, hidroxilación, desaminación de aminas primarias y secundarias, desulfuración, formación de sulfóxidos y epoxidación. En relación con este último tipo de reacción oxidativa, los intermediarios de alta energía resultantes (epóxidos) pueden atacar al DNA y RNA celulares así como a proteínas, produciendo toxicidad, muerte celular, mutaciones, y transformación celular (González, 1989).

Las reacciones catalizadas por el citocromo P-450 pueden clasificarse en tres grupos distintos: a) metabolismo de constituyentes endógenos como esteroides, colesterol, ácidos biliares, vitaminas, ácidos grasos y eicosanoides; b) conversión de xenobióticos lipofílicos tales como fármacos, insecticidas, pesticidas, aditivos alimentarios y derivados, productos del tabaco y del aire y productos originados al cocinar, a productos más solubles que permitan su detoxificación y eliminación del organismo; c) metabolismo de diversos xenobióticos como el CCl₄, benzeno, halotano, acetaminofeno y nitrosaminas, a productos más reactivos que son tóxicos y/o carcinogénicos (Winters y Cederbaum, 1993).

En cuanto a las funciones metabólicas del citocromo P-450, tiene un papel en la 21-hidroxilación de esteroides y en la formación de andrógenos y estrógenos (Sato y Omura, 1978; Black y Coon, 1987; Guengerich, 1987). Interviene, asimismo, en la biosíntesis del colesterol y en la conversión de colesterol a ácidos biliares en los microsomas y en las mitocondrias hepáticas. Juega, además, un papel crítico en el metabolismo de la vitamina D₃. La 11-hidroxilación de los ácidos grasos, y el metabolismo del ácido araquidónico pueden producirse por reacciones dependientes del P-450 (Capdevilla y cols., 1992). Metaboliza también productos exógenos tales como fármacos, pesticidas, carcinógenos (incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos), nitrosaminas, hidrazinas y arilaminas (Gonzalez, 1989).

El citocromo P-450 también cataliza reacciones reductoras, especialmente bajo condiciones anaeróbicas o de hipoxia, tales como nitro-reducciones (nitropirenos), azorreducciones (aminobenzenos), deshalogenaciones reductoras (CCl₄), etc. Algunos agentes pueden ser oxidados por unas formas de P-450 cuando las concentraciones del sustrato son bajas, utilizando otras formas distintas a concentraciones elevadas (Vang y cols., 1990). Además, las enzimas citocromo P-450 pueden actuar en diversas reacciones de hidroxilación de un sustrato dependientes de peróxido (Ortiz de Montellano, 1986).

La velocidad de biotransformación de fármacos por este sistema enzimático está determinada por una serie de factores como son, la concentración de citocromo P-450, de citocromo P-450 reductasa, la presencia de competidores, etc. Numerosos agentes que reaccionan

con los grupos sulfidrilo o que rompen las interacciones hidrofóbicas, convierten al P-450 en una forma inactiva llamada P-420 (Tekwani y cols., 1988).

En los microsomas hepáticos de varias especies examinadas se han encontrado múltiples formas de la oxidasa terminal del citocromo P-450. Cada proteína P-450 humana identificada parece reflejar la expresión de un único gen (Gonzalez, 1989) y estos genes a su vez están en, al menos, varios cromosomas. Los diferentes citocromos P-450 tienen el mismo centro catalítico (el hierro hémico), pero difieren en sus grupos proteicos (Nebert y cols., 1989). A pesar de las marcadas diferencias en estructura, regulación y localización cromosómica, hay una significativa homología en algunas regiones proteicas de todos los citocromos P-450, lo que parece indicar una evolución a partir de una forma ancestral común (Nebert y cols., 1987; 1989).

Se ha desarrollado un sistema de clasificación de las distintas formas de citocromo P-450 basada en su secuencia aminoacídica (Nebert y cols., 1987, 1989, 1991). En este sistema, las formas de citocromo P-450 están agrupadas dentro de una superfamilia de genes, que a su vez se divide en familias de genes (cuyos constituyentes presentan una homología en su secuencia aminoacídica mayor del 40%) y, finalmente, en subfamilias de genes (Nebert y cols., 1987). Las subfamilias, en los mamíferos, presentan una homología superior al 55% en la secuencia de aminoácidos (Watkins, 1992). Se han identificado, al menos, 27 familias de genes P-450 distintas, de las cuales 10 son comunes a todos los mamíferos. Estas 10 familias comprenden a su vez 18 subfamilias de las cuales 16 han sido mapeadas en el genoma humano (Guengerich, 1992; Winters y Cederbaum, 1993).

La mayoría de las formas relacionadas con el metabolismo de fármacos parecen pertenecer a tres familias de genes distintos denominadas CYP1, CYP2, y CYP3 (Nebert y cols., 1991). Aunque parece recomendable usar esta misma terminología para identificar la proteína que corresponde a cada gen, actualmente se utilizan números romanos para identificar las familias, letras mayúsculas para las subfamilias en las que se dividen las anteriores, y números arábigos para las formas individuales de citocromo P-450.

Existen dos formas mayoritarias de citocromo P-450, el P-450 inducible por fenobarbital (subfamilia P-450 2B) y el P-448 inducible por 3-metilcolantreno (subfamilia P-450 1A). Las formas mayoritarias de P-450 inducibles por fenobarbital y por hidrocarburos aromáticos muestran diferencias en el peso molecular, la especificidad por el sustrato, su secuencia aminoacídica, su RNAm y DNAc, sus propiedades inmunológicas, la naturaleza de sus inductores, su regulación y sus receptores, así como en el lugar de actuación de la actividad enzimática asociada (Ioannides y Parke, 1987; 1990). Existen, sin embargo, marcadas diferencias interespecíficas en cuanto a la representación relativa en el hígado de las distintas isoformas. Así, la subfamilia 3A constituye el 30% del citocromo P-450 total en el hombre (Guengerich, 1992), siendo la isoenzima 3A4 la más abundante en el hígado humano, pudiendo inducirse por la

exposición a glucocorticoides, rifampicina, clotrimazol y otros compuestos químicos (Watkins, 1992). Sin embargo, en la rata, la subfamilia 3A representa un 15% del citocromo total hepático, mientras que la subfamilia 2C constituye el 65% del mismo (Funae y Imaoka, 1993).

Hay que destacar el interés que en la actualidad ha despertado la isoenzima 2E1 humana, al estar involucrada en los procesos de metabolización hepática de etanol, que a su vez es inductor de dicho citocromo P-450, y su repercusión en la producción de metabolitos tóxicos y radicales libres relacionados con la hepatotoxicidad derivada de su administración (Gorsky y cols., 1984; Koop y Coon, 1986; Ingelman-Sundberg, 1993; Ingelman-Sundberg y cols., 1994; Kukielka y Cederbaum, 1994; Somani y cols., 1996).

Respecto a las actividades que corresponden a cada isoforma, existen algunas específicas de una isoenzima en particular, mientras que otras actividades pueden desempeñarse por varias formas distintas de citocromo P-450, por lo que la determinación de dicha actividad no sirve como marcador exclusivo de una isoenzima. Asimismo, una determinada isoenzima puede presentar varias actividades enzimáticas distintas. Por ejemplo, la actividad etoxiresorufina O-desetilasa (EROD) es altamente específica de la subfamilia 1A (Lewis y cols., 1995) que, como hemos indicado, es inducible por compuestos aromáticos como 3-metilcolantreno, y que parece desempeñar un papel importante en la carcinogénesis en el hombre (Kawajiri y cols., 1993; Okada y cols., 1994). Sin embargo, las isoenzimas pertenecientes a esta familia también tienen asociadas actividades anilina hidroxilasa y aminopirina N-desmetilasa, entre otras, que comparten con otras familias de citocromo P-450.

Es importante destacar la gran heterogeneidad interindividual que muestra el sistema de los citocromos P-450, tanto en lo que se refiere a su concentración hepática como a su actividad catalítica. Esto refleja, sin duda, diferencias genéticas (Watkins, 1990; 1992), pero también la influencia sobre el sistema de un elevado número de sustancias y circunstancias, muchas de las cuales ni siquiera son conocidas (Breimer, 1983).

2.3.2. REACCIONES DE FASE II

Son procesos en los que el organismo incorpora pequeñas moléculas a un determinado xenobiótico mediante la acción de enzimas transferasas.

La glucuronidación es la reacción de conjugación (fase II) más frecuente en mamíferos (Dutton, 1980) y tiene lugar principalmente en la fracción microsómica hepática, aunque también puede darse en otros tejidos como, por ejemplo, el riñón. Constituye la principal vía de metabolización de muchos fenoles, alcoholes y ácidos carboxílicos exógenos, así como compuestos endógenos tales como la bilirrubina, la tiroxina, y las hormonas esteroides (Chowdhury y cols., 1986). Entre los fármacos excretados en gran parte como glucurónidos se encuen-

tran la morfina, el cloranfenicol, salicilatos, así como los metabolitos de la fase I del diazepam, fenobarbital, etc.

La síntesis de glucurónidos tiene lugar al unirse el átomo C-1 del ácido glucurónico con un compuesto xenobiótico mediante la acción de las UDP-glucuroniltransferasas microsómicas. La transferencia del ácido glucurónico se realiza a partir del uridindifosfo-ácido glucurónico (UDPGA), que se forma a partir de la glucosa mediante enzimas citosólicas y que constituye la forma activada del agente conjugante. Puede conjugarse con grupos carboxílicos, así como con aminas aromáticas y grupos sulfhidrilo (Dutton, 1980; Tephly y Burchell, 1990).

La adición de glucuronato aumenta el tamaño de la molécula, y la presencia del grupo carboxilo libre en C-6 asegura la polaridad del glucurónido formado. Los glucurónidos son generalmente inactivos y más hidrosolubles (a causa de su gran contenido glucídico hidrofílico) que los fármacos originales y están ionizados a pH fisiológico. Estas propiedades facilitan su eliminación del organismo al disminuir su distribución extravascular y al hacerlos más apropiados como sustratos para su excreción mediada por un transportador en la orina y en la bilis. Su excreción por la bilis parece estar determinada principalmente por su peso molecular.

Los glucurónidos que se excretan en la bilis pueden sufrir hidrólisis en el intestino, liberándose entonces el fármaco, que puede ser reabsorbido estableciéndose un ciclo enterohepático. Esta hidrólisis es realizada en el intestino grueso por acción de la enzima β -glucuronidasa bacteriana, presente sobre todo en la especie *E. coli*. Esta reacción es necesaria para liberar a los ácidos biliares de sus conjugados en el intestino, permitiendo que jueguen su papel esencial en la absorción de las grasas.

Exceptuando la glucuronidación, el resto de las reacciones de conjugación o síntesis (fase II) están catalizadas por enzimas no microsómicas. En general, las reacciones de síntesis pueden producirse cuando un fármaco o un metabolito de fase I contiene un grupo funcional como -OH, -COOH, -NH₂ o -SH. Una de las reacciones de mayor interés es la conjugación con el glutatión, que consideraremos en el apartado siguiente como una de las principales defensas antioxidantes del organismo.

2.4. DEFENSAS ANTIOXIDANTES HEPÁTICAS

Para el metabolismo del ATP se requiere oxígeno. El sistema de transporte de electrones mitocondrial consume el 85-90% del oxígeno utilizado por la célula (Shigenaga y cols., 1994). La mitocondria, al ser el principal consumidor de oxígeno molecular de las células, es una fuente importante de intermediarios reactivos de oxígeno. En condiciones fisiológicas, estos radicales se generan en un 45, 35, 15 y 5% en los microsomas, peroxisomas, mitocondrias y compartimento citosólico, respectivamente (Chance y cols., 1979).

Así, la cantidad de radicales libres generada en las mitocondrias es pequeña comparada con la cantidad de oxígeno utilizada por este orgánulo, lo cual indica la presencia de un potente mecanismo que inhibe la formación de especies reactivas de oxígeno. En condiciones fisiológicas, la reducción del oxígeno a H_2O en la cadena respiratoria es incompleta e implica la formación de intermediarios de oxígeno tóxicos (Martensson y Meister, 1989), como superóxidos (O_2^-) que posteriormente originan H_2O_2 y metabolitos relacionados, así como óxido nítrico ($NO\cdot$) y monóxido de carbono (CO). Si el H_2O_2 no se reduce a H_2O , provoca, al interaccionar con metales de transición como el hierro, la formación de radicales hidroxilo que inducen peroxidación lipídica dañándose la estructura y función de la membrana mitocondrial (Cadenas, 1989; Martensson y Meister, 1989).

Sólo un 2-5% del oxígeno consumido en la mitocondria origina radicales superóxido, formándose predominantemente en el complejo I y en el complejo III de la cadena respiratoria (Turrens y cols., 1985). Otra fuente de radicales libres son los peroxisomas. Estos orgánulos son ricos en enzimas que generan H_2O_2 . Las enzimas implicadas en la α -oxidación (proceso en el que se forma H_2O_2) se hallan presentes en estos orgánulos en donde se degradan cadenas largas de ácidos grasos en ácidos grasos de cadena media que se transfieren a la mitocondria por la lanzadera de carnitina. Los peroxisomas también contienen enzimas implicadas en el metabolismo del ácido glioxílico, de purinas y de aminoácidos, formándose H_2O_2 .

El óxido nítrico ($NO\cdot$) y el CO se producen por acción de la forma inducible de la NO sintetasa y por la hemoxygenasa, respectivamente. El $NO\cdot$, intermediario reactivo de nitrógeno, es un pequeño radical hidrofóbico sin carga cuya regulación en el organismo es de gran importancia, llevando a cabo diversas funciones (Kotska, 1992; Snyder y Brecht, 1992; Feldman y cols., 1993). Entre sus acciones fisiológicas se encuentran la regulación de la presión sanguínea, la destrucción de agentes patógenos en el sistema inmunitario y su función como neurotransmisor retrógrado de gran importancia en la memoria a largo plazo (Snyder y Brecht, 1992). Sin embargo, cuando su concentración es elevada puede dañar directamente proteínas con hierro y sulfuro (Moncada y Higgs, 1993) y otras metaloproteínas (Radi, 1996). Además, puede reaccionar con radicales superóxido dando lugar a peroxinitrito, una molécula muy reactiva capaz de atacar diversas moléculas de elevada importancia biológica.

El citocromo P-450 microsómico cataliza reacciones que generan O_2^- mediante mecanismos dependientes de NADPH (Kuthan y Ullrich, 1982; Ortiz de Montellano, 1986). Algunos compuestos que sufren destoxicación por reacciones catalizadas por el citocromo P450 se convierten en intermediarios reactivos que inician la peroxidación lipídica provocando daño en la membrana microsómica que causa a su vez daño hepatocelular (Slater, 1984).

El daño celular causado por los radicales libres incluye peroxidación lipídica, inactivación enzimática, alteración del estado redox intracelular y del material genético, etc. (Slater y cols., 1987). Para evitar estos problemas, las células de los mamíferos poseen un sistema de

defensa antioxidante tanto de naturaleza enzimática como no enzimática, constituido por antioxidantes endógenos como por ejemplo la vitamina C, vitamina E, ubiquinol, carotenoides, bilirrubina y glutatión, que tras eliminar los radicales libres se regeneran, excepto la bilirrubina que sufre degradación irreversible. Las actividades enzimáticas antioxidantes, que están distribuidas por todo el organismo, dependen del consumo de oxígeno, de la tasa metabólica, de la concentración de iones metálicos presente y de la cantidad de ácidos grasos existente. Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen la actividad superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión disulfuro reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) (Inoue, 1994). Para minimizar los efectos tóxicos de los radicales libres formados es necesario un adecuado equilibrio de las enzimas antioxidantes señaladas (Sies, 1993). La regulación de las enzimas antioxidantes depende principalmente de su sustrato (radicales libres y especies reactivas de oxígeno), de la producción de cosustratos y de la afinidad, selectividad y especificidad por ese sustrato.

El estrés oxidativo puede definirse como una alteración en el sistema antioxidante, el cual no es capaz de contrarrestar adecuadamente los radicales libres y especies de oxígeno reactivo y detener las reacciones en cadena de peroxidación lipídica. El estrés oxidativo puede producirse por la realización de ejercicio extenuante, algunos fármacos, procesos patológicos y una combinación de éstos y otros factores.

2.4.1. GLUTATIÓN

El glutatión es un tripéptido (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) con dos aminoácidos, glutamato y glicina, los cuales determinan su disposición, y otro aminoácido, la cisteína, que es la responsable de sus funciones. El glutatión está presente en casi todas las células animales, aunque predominantemente en el tejido hepático. Se produce exclusivamente en el citosol celular, pero el 10-15% del formado se localiza en la mitocondria (Fernández-Checa y cols., 1991), con la ayuda de un transportador mitocondrial que lleva el glutatión citosólico a la matriz mitocondrial (Griffith y Meister, 1985; Martensson y cols., 1990; Fernández-Checa y cols., 1991).

La molécula de glutatión posee dos características que lo hacen particularmente interesante: por un lado un enlace γ -glutamilo y por otro un grupo tiol (SH), grupo que lo hace extraordinariamente reactivo para sustancias endógenas o exógenas, e incluso para consigo mismo (Meister y Anderson, 1983).

El glutatión reducido (GSH), es el principal antioxidante del organismo, siendo capaz de contrarrestar los metabolitos reactivos derivados de fármacos y otros compuestos químicos. El glutatión funciona, directa o indirectamente, en muchos fenómenos biológicos importantes incluyendo: destoxificación de electrófilos inestables para la formación de tioésteres;

proporcionar una forma adecuada para el almacenamiento y transferencia interórganos de cisteína; mantenimiento del estado tiol, esencial para las proteínas en la prevención de la oxidación de los grupos -SH o para reducir los puentes disulfuro inducidos por estrés oxidativo; reducción de peróxidos de hidrógeno y de peróxidos orgánicos, actuando como cosustrato de la enzima glutatión peroxidasa; conjugación con compuestos endógenos y exógenos, reacción catalizada por la glutatión S-transferasa; un papel importante en el metabolismo de las prostaglandinas, leucotrienos y varias hormonas; mantenimiento de las vitaminas E y C en su estado reducido; participación en la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos y, finalmente, regulación de procesos relacionados con los microtúbulos (Fernández-Checa y cols., 1993a).

El GSH se sintetiza a partir de sus precursores aminoacídicos en todas las células de mamíferos. El hígado es único en la biosíntesis de glutatión en dos aspectos. Primero, es el único órgano capaz de formar cisteína a partir de metionina mediante la vía de la transulfuración y, segundo, exporta GSH al plasma y a la bilis (Sies y cols., 1978; Lauteburg y cols., 1984). La síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos constituyentes implica dos pasos enzimáticos que requieren ATP. El primer paso en la biosíntesis de glutatión es el limitante de la velocidad de reacción y está catalizado por la γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) la cual requiere Mg^{2+} o Mn^{2+} (Kretschman y cols., 1989). Esta enzima está constituida por dos subunidades diferentes que se disocian por tratamiento con ditiotreitol (Yan y Meister, 1990). La actividad catalítica reside en la subunidad pesada y se inhibe por el glutatión (retroalimentación negativa) (Seeling y Meister, 1984). La subunidad ligera es inactiva enzimáticamente (Yan y Meister, 1990). Cataliza la unión isopeptídica de glutamato y de cisteína para formar γ -glutamilcisteína. La regulación de la GCS es de vital importancia en la homeostasis del GSH. El segundo paso en la síntesis de glutatión está catalizado por la glutatión sintetasa (Jackson, 1969; Shan y cols., 1990), la cual está formada por dos subunidades idénticas. Dicha enzima posiblemente esté regulada por el ADP y no está sujeta a retroalimentación negativa por el glutatión.

La degradación del glutatión está catalizada por la γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) por transferencia del grupo γ -glutamilo a sus aceptores. La enzima se encuentra mayoritariamente en la superficie externa de las membranas celulares, si bien el glutatión intracelular es su principal sustrato (Meister y Anderson, 1983). Debido a que la actividad GGT es muy elevada en las células renales, su depuración se produce en primer lugar en el riñón (Griffith y Meister, 1979; Speisky y cols., 1990). El riñón también elimina glutatión por filtración glomerular, proceso que es seguido por su degradación cuantitativa catalizada por la GGT presente en la cara luminal del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. Se ha estimado que, aproximadamente, dos terceras partes del glutatión plasmático en la rata son metabolizadas por el riñón (Inoue, 1994).

La degradación del glutatión extracelular catalizada por la GGT, se considera como un proceso esencial en la recuperación de los aminoácidos constituyentes del glutatión intracelular (Hirata y cols., 1984). Individuos que presentan déficit en la actividad GGT y animales de experimentación tratados con inhibidores de dicha actividad enzimática, como la acivicina, presentan concentraciones elevadas de glutatión en el plasma y la orina (Anderson y Meister, 1986). La actividad GGT en el hígado de ratas adultas es muy baja (Orlowski y Wilk, 1976) y se encuentra predominantemente en las estructuras biliar y canalicular, sin acceso inmediato al glutatión reducido presente en la sangre sinusoidal; por lo cual, el hígado ha sido considerado como un órgano incapaz de utilizar el glutatión circulante. Esta visión, no obstante, ha sido modificada posteriormente al comprobarse que en el hígado de rata intacto se detecta cierta actividad GGT en la zona basolateral de los hepatocitos, dotando al hígado de la rata de la capacidad de retirar cantidades pequeñas pero significativas de glutatión desde la circulación (Speisky y cols., 1987).

El glutatión puede conjugarse directamente con gran variedad de compuestos tóxicos de forma espontánea (no enzimática) o mediante la acción de un grupo de enzimas tisulares conocidas como glutatión transferasas (GST), las cuales pueden ser inducidas (Pickett y Lu, 1989). Se ha comprobado la existencia de GST en cantidades relativamente importantes en distintos tejidos de mamíferos, pero fundamentalmente en el hígado (Jakoby, 1978). Así, por ejemplo, en el hígado de rata, las GST suponen el 10% de la proteína soluble total (Ketterer y cols., 1983).

El GSH es convertido a GSSG (glutatión forma oxidada) por una glutatión peroxidasa (GPx) que contiene selenio, la cual cataliza la reducción de H_2O_2 y de peróxidos orgánicos, proceso de gran importancia en la protección de las membranas lipídicas de la oxidación. De hecho, una de las principales funciones celulares del glutatión es el mantenimiento estructural de las membranas (Kosower y Kosower, 1978). Hay evidencias de que diversas glutatión transferasas pueden también catalizar dichas reacciones. Estas enzimas están asociadas en las mismas fracciones cromatográficas a actividad glutatión peroxidasa (Meister y Anderson, 1983; Ketterer, 1986).

Entre las actividades enzimáticas antioxidantes se encuentra la actividad peroxidasa, presente en muchas especies de mamíferos y en muchos tejidos de éstas siendo considerada como la principal defensa frente a H_2O_2 (Flohé, 1982). Está representada por un lado por algunas isoenzimas de la GST y, por otro, por una enzima tetramérica de localización citosólica en un 75%, encontrándose el resto en la mitocondria (Green y O'Brien, 1970), y que contiene selenio en forma de seleniocisteína en el centro activo de cada subunidad y que constituye la forma enzimática de actividad peroxidasa más común en los mamíferos (Rotruck y cols., 1973; Jenkins, 1993). Las primeras poseen una función catalítica frente a peróxidos orgánicos similar a la glutatión peroxidasa pero no reducen el H_2O_2 . Las actividades glutatión peroxidasa

selenio dependiente y selenio independiente son específicas para GSH, que actúa como donante de electrones en la reacción. La deficiencia en selenio provoca gran variedad de perturbaciones bioquímicas, destacando la depleción de la actividad glutatión peroxidasa. Como adaptación se produce un aumento de la actividad GST y de la concentración plasmática de glutatión (Hafeman y cols., 1974; Hill y cols., 1987).

Los mecanismos mediante los cuales la peroxidación lipídica causa alteración celular no se conocen con exactitud, si bien se sabe que la alteración de los lípidos de la membrana puede hacer perder la funcionalidad de ésta y alterar sus enzimas. Asimismo, diferentes radicales libres, altamente reactivos, generados en el proceso de peroxidación lipídica, pueden atacar directamente o inactivar enzimas u otros constituyentes celulares. Además, al degradarse los lípidos de la membrana, se pueden formar aldehídos reactivos y otros compuestos, los cuales son tóxicos por sí mismos.

Estos mecanismos pueden tener la misma importancia y de hecho tienen una acción simultánea o consecutiva. Pese a que la formación de aldehídos citotóxicos, con una vida media relativamente larga, es menor en comparación con la de los radicales libres, los primeros pueden explicar los efectos a largo plazo promovidos por la peroxidación de los lípidos (Esterbauer, 1982). La restitución de los grupos -SH, o bien una adecuada concentración de glutatión pueden ser capaces de inhibir, en cierta medida, la peroxidación de los lípidos de membrana en determinadas condiciones (Anundi y cols., 1979).

La integridad de la membrana celular se atribuye a un adecuado estado del glutatión, ya que éste y las enzimas correspondientes protegen los lípidos de la membrana de las agresiones externas. Ciertos lípidos estructurales de la membrana como el L-tocoferol ejercen asimismo una protección pasiva por su propia localización (Romero y Cadenas, 1987).

La regeneración del glutatión está catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR), actividad observada por primera vez en 1930, y cuya purificación se ha realizado en diversas etapas (Meister, 1975). Dicha enzima es la flavoproteína más ampliamente distribuida, está formada por dos subunidades idénticas y se localiza en el citosol. La inactivación de la enzima se debe a una modificación covalente intramolecular, que bloquea la aparición de ditioles en el lugar de unión del glutatión (López-Barea y cols., 1990). La enzima tiene dos subunidades idénticas y cada subunidad contiene tanto el sitio de unión para el GSSG, como aquél en el cual se reduce (Meister y Anderson, 1983). Como sustratos efectivos se encuentran el GSSG y los disulfuros mixtos de glutatión y de γ -glutamilcisteína, y de GSH y CoA (Meister y Anderson, 1983) así como entre el GSH y varias proteínas.

La glutatión reductasa cataliza la reducción de disulfuros de glutatión por NADPH procedente de la fase oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato (Meister, 1975; Holmgren, 1980; Schirmer y cols., 1989). Su actividad está controlada por el estado redox del NAD(P)H

y las concentraciones de glutatión. La relación intracelular de GSH/GSSG es generalmente superior a 10:1, por acción de la glutatión reductasa. Al mantener esta relación elevada, la célula conserva su capacidad de combatir el estrés oxidativo. Cuando un tejido se expone a gran cantidad de radicales libres, éste puede no ser capaz de mantener esta relación y se acumula GSSG. Esto provoca la alteración del estado redox intracelular, la inactivación de enzimas que poseen uno o más grupos sulfidrilos en sus sitios activos y la formación de enlaces disulfuro inter o intramoleculares (Lieber y cols., 1990).

La mayoría del GSSG formado intracelularmente puede ser reducido por la glutatión reductasa, sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo en las que la formación de glutatión oxidado supera la capacidad de ser regenerado mediante la GR, abandona el hepatocito hacia la bilis, fundamentalmente, y en menor medida hacia la sangre (Sies y cols., 1978; Akerboom y cols., 1982; Kaplowitz y cols., 1983; Lauteburg y cols., 1984; Akerboom y Sies, 1989). El flujo de GSSG hacia la bilis ha sido demostrado en hígado aislado y perfundido (Sies y cols., 1978; Ballatori y cols., 1989) y en hígado de rata "in vivo" (Eberle y cols., 1981). El sistema de transporte canalicular de GSSG es compartido con los conjugados de glutatión y, posiblemente, con el GSH, mediante un transportador multiespecífico de aniones orgánicos, dependiente de ATP, denominado cMOAT/mrp2 (Akerboom y cols., 1982; Akerboom y Sies, 1989; Oude Elferink y cols., 1991; Leier y cols., 1996). En ausencia de estrés oxidativo tanto la secreción a la bilis de glutatión como la secreción a los sinusoides se realiza fundamentalmente en su forma reducida (Adams y cols., 1983).

Además del glutatión existen otros antioxidantes de bajo peso molecular en el hígado, como la vitamina C, vitamina E, ubiquinol, carotenoides y bilirrubina (Machlin y Bendich, 1987). La vitamina C, al igual que el glutatión, elimina los radicales libres en plasma, citosol y otros compartimentos acuosos. Sin embargo, la vitamina E y otros antioxidantes hidrofóbicos actúan fundamentalmente en las membranas y en las bicapas lipídicas. Ambas actuaciones se complementan, ya que los radicales libres formados en medios hidrófobos son eliminados por antioxidantes de medios acuosos (Inoue, 1994). Tanto la vitamina C, la vitamina E como el GSSG, se regeneran enzimática o no enzimáticamente tras ejercer su actividad antioxidante. La regeneración enzimática generalmente requiere la presencia de NADPH y NADH como cofactores (Sato y cols., 1990).

2.4.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES

Además de las actividades citadas anteriormente, relacionadas con el ciclo redox del glutatión (GPx y GR), existen otras actividades enzimáticas antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa, que intervienen en la protección tisular frente al daño oxidativo.

La catalasa se localiza principalmente en los peroxisomas del hígado y del riñón y en los microperoxisomas de otros tejidos. En el hígado existe también actividad en los microso-

mas y en el citosol (Thomas y Aust, 1985). La concentración intracelular de H_2O_2 se controla mediante la actividad catalasa y la actividad glutatión peroxidasa (Chance y cols., 1979; Borg y Schaich, 1984). La actividad catalasa presenta un K_m mucho mayor que la glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno (Burk y cols., 1978; Jenkins, 1993), por lo que está implicada en la destoxicación de H_2O_2 cuando su concentración es elevada, mientras que la glutatión peroxidasa actúa a concentraciones bajas del mismo. En órganos que poseen una elevada actividad catalasa, como es el hígado, la concentración de peróxido de hidrógeno es generalmente baja. Las actividades glutatión peroxidasa y catalasa presentan una correlación negativa en su concentración (Inoue, 1994). La glutatión peroxidasa complementa a la catalasa constituyendo un sistema reductor de H_2O_2 , pero supera a la actividad catalasa en la eliminación de otros peróxidos intracelulares tóxicos (Suttorp y cols., 1986).

La actividad catalasa puede alterarse en condiciones fisiológicas especiales y en condiciones patológicas. Así, el ejercicio físico aumenta la actividad catalasa en el hígado y en el riñón (Alessio y Goldfarb, 1988; Radak y cols., 1996). En ciertas enfermedades inflamatorias y neuromusculares también aumenta dicha actividad (Mezes y cols., 1987). La actividad catalasa está regulada por su único sustrato, el peróxido de hidrógeno. Las mitocondrias de la mayoría de los mamíferos carecen de actividad catalasa, por lo que el glutatión de la matriz mitocondrial es la única defensa posible frente a los peróxidos de hidrógeno formados en la cadena de electrones (Chance y cols., 1979; Radi y cols., 1991).

La mitocondria, como se ha comentado, es una fuente importante de especies de oxígeno reactivo, siendo el glutatión mitocondrial especialmente importante en la destoxicación de los peróxidos de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos que se generan en la mitocondria, participando en un ciclo redox mediante las actividades glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Reed, 1986). El glutatión mitocondrial mantiene la viabilidad celular mediante la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a través del mantenimiento de los grupos sulfidrilo en estado reducido (Beatrice y cols., 1984). El estrés oxidativo y una disminución importante de glutatión afectan al estado redox de la mitocondria, existiendo una correlación entre la disminución del mismo y la incapacidad de la mitocondria para secuestrar calcio (Martensson y Meister, 1989). Así, la administración de etanol disminuye el glutatión intramitocondrial al alterar la fluidez de la membrana interna de la misma (Colell y cols., 1997) con la consecuente alteración en su funcionamiento (Meredith y Reed, 1988; Martensson y Meister, 1989; Martensson y cols., 1989).

La mitocondria no contiene catalasa y, por lo tanto, la destoxicación de los hidroperóxidos formados depende exclusivamente de la glutatión peroxidasa y del sistema redox del glutatión (Radi y cols., 1991).

Los aniones superóxido se dismutan por la acción de la actividad superóxido dismutasa, produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno "singlet" (1O_2). Existen dos formas de SOD,

el homodímero que contiene cobre y zinc (CuZnSOD), que se encuentra en el citosol y en la matriz nuclear, y un homotetrámero que contiene manganeso (MnSOD) y que se encuentra predominantemente en la matriz mitocondrial (Deby y Goutier, 1990). En los hepatocitos de la rata, el 70% de la actividad CuZnSOD se encuentra en el citosol, siendo los lisosomas el orgánulo donde se encuentra en mayor abundancia (Harris, 1992). La actividad SOD se regula a través de su biosíntesis, la cual depende de la oxigenación tisular (Gregory y Fridovich, 1973; Rister y Baehner, 1976), como se comprobó en ratas sometidas a tensiones de oxígeno elevadas (Crapo y Tierney, 1974).

Respecto a la regulación de la actividad CuZnSOD, modificaciones en la dieta o la administración de agentes quelantes de metales pueden limitar su expresión en los tejidos. En la rata, una deficiencia importante de cobre es decisiva en la actividad enzimática, mientras que la deficiencia de zinc no parece tener tanta repercusión (Harris, 1992). Cuando disminuye la actividad enzimática de una de las formas de SOD, aumenta la otra como mecanismo compensador.

La actividad SOD mitocondrial hepática, pero no la citosólica, aumenta significativamente tras 10 semanas de entrenamiento físico (situación en la que también aumenta la peroxidación lipídica), lo cual está en concordancia con las conclusiones de autores que afirman que la SOD mitocondrial es la única forma que puede ser inducida (Oberley y cols., 1987). La actividad SOD evita el daño oxidativo derivado del ejercicio extenuante en el hígado y en el riñón (Radak y cols., 1996). El fallo en la respuesta antioxidante de la actividad MnSOD frente al daño oxidativo se plantea como una posible causa en la etiología de la oncogénesis (Oberley y Oberley, 1988). Además, la SOD parece proteger frente a los efectos letales de la radiación ionizante mediante la dismutación de los radicales de oxígeno formados (Kent y Blekkenhorst, 1991).

2.5. DICROCELIOSIS

2.5.1. INTRODUCCIÓN

El género *Dicrocoelium* (Dujardin, 1845) se encuadra en la Subfamilia Dicrocoeliinae (Looss, 1899), de la Familia Dicrocoeliidae (Odhner, 1901). Dicha Familia, de acuerdo con La Rue (1957) pertenece a la Superfamilia Plagiorchioidea, al Suborden Plagiorchiata, al Orden Plagiorchiida y al Superorden Epitheliocystida. No obstante, no existe un criterio unánime entre los diversos autores en cuanto a la denominación de los distintos taxones, como se pone de manifiesto en la revisión realizada por Cabanas (1995). Las especies más importantes del género *Dicrocoelium* que parasitan rumiantes son: *D. dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899; *D. hospes* (Looss, 1907) y *D. chinensis* (Tang y Tang, 1978). La descripción de *D. dendriticum* fue tardía, pues se confundió durante mucho tiempo con una forma inmadura de

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758), ya que ambos trematodos se encuentran con frecuencia parasitando, al mismo tiempo, el hígado de los rumiantes.

La dicroceliosis es una enfermedad parasitaria debida a la presencia y acción de *D. dendriticum* en los conductos biliares y en la vesícula biliar de numerosos animales mamíferos, tanto domésticos como silvestres, que actúan como hospedadores definitivos de dicho trematodo. Así, el ganado ovino, bovino, caprino y antilopino está frecuentemente infectado por este parásito, encontrándose además en otras especies de mamíferos, incluido el hombre (Mapes, 1950; Mapes y Baker, 1950; Mapes, 1951; Del Rio Lozano, 1967; Malek, 1980). Por otra parte, Krull (1956) probó como hospedadores definitivos de *D. dendriticum* en el laboratorio ejemplares de ratón albino, rata, ratón silvestre, criceto, cobaya y gato. Dicho autor concluyó que el criceto dorado (*Mesocricetus auratus*) especialmente, y el conejo, eran buenos hospedadores, mientras que el cobaya era menos adecuado y el ratón albino actuaba como hospedador ocasionalmente.

Respecto a su distribución, es cosmopolita, aunque hay regiones con mayor incidencia, como son el área Mediterránea, Países del Este y Centro de Europa, principalmente, habiendo sido descrita también en China, Japón, Canadá, India, Filipinas, Brasil, Colombia y Cuba, entre otros países (Steele, 1982). Hay que resaltar la importancia epidemiológica de los hospedadores definitivos silvestres como reservorios que mantienen la parasitosis en las distintas zonas. Respecto a su distribución en España, *D. dendriticum* ha sido hallado en todas las regiones (Cordero del Campillo y cols., 1994), siendo la incidencia de la infección muy alta en todas ellas.

La dicroceliosis es una zoonosis rara pero posible, adquirida generalmente por la ingestión accidental de hormigas con las frutas o legumbres mal lavadas. La existencia de infecciones en el hombre está muy ampliamente extendida, habiéndose descrito en España, entre otros muchos países (Steele, 1982; Mohamed y Mummery, 1990; Theodoridis y cols., 1991).

En general, la dicroceliosis es más benigna que la fasciolosis, a la que frecuentemente está asociada, y rara vez es mortal. La importancia económica y sanitaria se debe, por una parte, a las pérdidas directas ocasionadas por el decomiso de los hígados afectados (Del Rio Lozano, 1967; Boch y Supperer, 1982; Lukin, 1980; Karanfilovski, 1983) y, por otra, a las pérdidas indirectas ocasionadas por los trastornos digestivos y de la nutrición derivados de las alteraciones hepatobiliares con las que cursa la dicroceliosis, como son un retraso en el crecimiento (Hohorst y Lämmeler, 1962), reducción en la producción de leche (Cavani y cols., 1982) y disminución en el peso de los animales (Boray, 1985), entre otras.

2.5.2. CICLO BIOLÓGICO

D. dendriticum requiere dos hospedadores intermediarios en su ciclo biológico. El desarrollo larvario hasta la fase de cercaria tiene lugar en un caracol terrestre y el enquistamiento

de esta fase y la adquisición de la capacidad infectante para el hospedador definitivo se produce en una hormiga.

Hasta que Krull y Mapes (1952d, 1953) consiguieron cerrar por primera vez el complejo ciclo de *D. dendriticum*, al encontrar metacercarias de dicho digenea en hormigas (*Formica fusca*), y administrar posteriormente hormigas parasitadas o las metacercarias extraídas de las mismas a corderos libres de infección, se realizaron, durante más de un siglo, numerosos estudios tendentes a su esclarecimiento, los cuales fueron recopilados por Mapes (1951) y Del Rio Lozano (1967).

En el hospedador definitivo, los adultos de tipo distoma, que miden de 6 a 10 mm de longitud por 1,5-2,5 mm de anchura, tienen un cuerpo de color pálido, aplanado en sentido dorso-ventral, con la máxima anchura cerca de la mitad del mismo, siendo más afilado en su parte anterior que en la posterior. Su tegumento liso permite que se transparente el útero y las vitelógenas, que son de color marrón-rojizo, y se diferencia así de *Fasciola hepatica*, cuyo tegumento está provisto de espículas. Esta característica, junto con su menor tamaño, explica su menor efecto lesivo en el hígado.

El ciclo comienza cuando, en el hospedador definitivo, dichos parásitos adultos, que viven en los conductos biliares y en la vesícula biliar, después de la fecundación depositan los huevos embrionados en los conductos biliares, de los que pasan al intestino a través del conducto colédoco vehiculados en la bilis, para ser evacuados con las heces del hospedador. Los huevos, de 36-50 μm x 22-40 μm de tamaño, son operculados, de pared gruesa y color marrón oscuro, con dos manchas grandes más intensas que se corresponden con las masas germinales.

Una característica epidemiológica muy importante es la alta resistencia de los huevos a los factores ambientales, pudiendo sobrevivir a temperaturas tan bajas como de -20°C a -50°C y soportando desecación a altas temperaturas (Boray, 1985). La supervivencia de los huevos en heces ovinas y en condiciones naturales es máxima en los meses de invierno (generalmente mayor del 85%) y mínima en los meses de verano, alcanzando su valor más bajo en agosto. Es, por tanto, marcadamente estacional. Asimismo, la supervivencia de los huevos parece ser independiente de la edad de los mismos (Alunda y Rojo-Vazquez, 1983).

Según Kopp (1975), la mayor concentración de huevos en las heces se encuentra en los meses de primavera, siendo mucho mayor en hospedadores adultos que en jóvenes (en función de la mayor carga parasitaria). En este sentido, se suele admitir la existencia de dos máximos de eliminación de huevos al año, uno en primavera y otro en otoño, influenciados por la distinta composición de la bilis derivada del cambio del contenido graso en la alimentación (Alunda, 1984).

La eclosión del huevo y la liberación del miracidio que contiene tienen lugar únicamente en el tubo digestivo de numerosas especies de moluscos terrestres, que actúan como primeros

hospedadores intermediarios, por la acción de diversos estímulos fisicoquímicos (Ractliffe, 1968; Mitterer, 1975). El miracidio, de 20 por 25 μm , posee cilios en la parte anterior y una papila provista de un estilete, pero carece de manchas oculares. El miracidio libre atraviesa la pared intestinal del molusco, pierde los cilios y se asienta en los espacios interlobulares del hepatopáncreas cercanos al corazón y al riñón (Álvarez-Nogal y cols., 1992). Allí se transforma en esporocisto madre o de primer orden que, al no poseer pared propia, toma la forma del espacio en que se aloja. A partir de las masas germinales del esporocisto madre se diferencian los esporocistos hijos o de segundo orden, cuyo tamaño oscila entre 140 y 4.005 μm (Manga-González, 1987) de acuerdo con su grado de madurez y con la especie de molusco que lo alberga, principalmente. Los esporocistos hijos son sacciformes, poseen pared propia y tocostoma. Migran hasta asentarse en diferentes partes del hepatopáncreas del molusco y, en las infecciones intensas, pueden localizarse también en el aparato reproductor. Las masas germinales, que llenan los esporocistos hijos inmaduros, se transforman en cercarias de tipo Distoma y Xifidiocercaria. El cuerpo de dichas cercarias mide de 360-760 μm de longitud por 50-165 μm de anchura, y tiene en su parte anterior la ventosa oral, que incluye la boca y un estilete perforador, y en la parte central la ventosa ventral. Además, la cercaria posee una larga cola de 200 a 1.000 μm de longitud.

El período transcurrido desde la ingestión del huevo por el caracol hasta que la cercaria está madura, de 3 a 6 meses mínimo (Svadzhyan, 1951; Krull y Mapes, 1952c; Tarry, 1969; González-Lanza y cols., 1994), varía principalmente con la especie de molusco y con la temperatura.

Las cercarias maduras abandonan los esporocistos por el tocostoma y se dirigen, a través del aparato circulatorio, a la cámara respiratoria del molusco, donde son recubiertas por mucus formando pequeños grumos mucosos de 1 a 2 mm, conteniendo un número generalmente elevado de cercarias. Varios de estos grumos se asocian a modo de racimo y constituyen la bola de mucus que puede llegar a albergar de 300 a 7800 cercarias (Neuhaus, 1936; Del Rio Lozano, 1967; Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991). Mediante los movimientos respiratorios del caracol, dichas bolas de mucus son expulsadas al exterior por el pneumostoma (orificio respiratorio) y permanecen adheridas al borde del manto del molusco, hasta que son depositadas sobre las plantas u otros soportes al desplazarse el caracol.

La especie de caracol más importante desde el punto de vista epidemiológico en la provincia de León parece ser *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, distribuida por toda la provincia (Alunda, 1984).

Cuando las bolas de mucus, en condiciones adecuadas, son ingeridas por distintas especies de hormigas de la familia Formicidae, que actúan como segundos hospedadores intermediarios, las cercarias atraviesan el buche de las hormigas, con la ayuda del estilete, y se localizan en el abdomen o gaster, donde se enquistan, perdiendo la cola y transformándose en me-

tacercarias en las primeras horas tras su ingestión (Hohorst y Graefe, 1961; Hohorst, 1962). Alguna de ellas (a veces 2 ó 3), llamada "larva cerebral", se aloja en el ganglio subesofágico de la hormiga. Al descender la temperatura, la metacercaria (o metacercarias) alojada en el ganglio subesofágico altera el comportamiento de la hormiga, al provocar en ella una parálisis de los músculos mandibulares (tetania), lo que hace que se fije a la hierba. Esto facilita enormemente la ingestión por el hospedador definitivo, mediante el proceso de pastoreo, de las hormigas infectadas. Para llegar a ser infectantes, las metacercarias necesitan vivir en el interior de la hormiga aproximadamente 45 días.

La especie de hormiga *Formica rufibarbis* (Formicinae) actúa como segundo hospedador intermediario de *D. dendriticum* en zonas situadas en la cuenca baja del Bernesga y Porma, y en las proximidades de la confluencia de dichos ríos con el Esla. Ejemplares de esta especie pueden permanecer en fase de tetania entre Mayo y Octubre a una temperatura comprendida entre 16°C y 28°C (Campo, 1996).

Cuando los hospedadores definitivos ingieren las hormigas infectadas, las metacercarias maduras se desenquistan en el tubo digestivo y por vía del conducto colédoco (Krull, 1958; Svadzhyan, 1959) y, a veces de la circulación portal (Srivastava y cols., 1978), llegan al hígado, situándose en los conductos biliares, donde se transforman en vermes adultos. No existe unanimidad entre los autores en cuanto a la ruta seguida por las metacercarias desde que se desenquistan en el estómago o en el intestino, por la acción del jugo gástrico y la bilis, respectivamente, sobre la envuelta protectora (Krull, 1958; Srivastava y cols., 1978) y la posterior ruptura por la propia metacercaria activada (Steele, 1982), hasta que se establecen en el sistema biliar de los diferentes hospedadores definitivos. De acuerdo con las experiencias realizadas por Hohorst y Lämmler (1962) en el criceto dorado, y por Krull (1958) en el criceto dorado y en el ratón albino, las metacercarias migran desde el intestino a los conductos biliares del hígado a través del conducto colédoco. Sin embargo, distintos estudios parecen indicar que si bien la vía común a través de la cual los trematodos acceden al sistema biliar es el conducto colédoco, en ciertas circunstancias no muy bien establecidas pueden alcanzar este sistema a través de la circulación portal, localizándose en los espacios intercelulares en el hígado, y estableciéndose posteriormente en los conductos biliares (Ayupov, 1967; Srivastava y cols., 1978).

Respecto al tiempo empleado en el proceso, Krull (1958) señaló como mínimo una hora para que las metacercarias se establecieran en el sistema biliar del criceto, observando, además, que a las 24 horas la mayor parte de los parásitos ya se hallaban en los conductos biliares del criceto. Sin embargo, Hohorts y Lämmler (1962), establecieron que se requerían 4 horas para que las metacercarias llegaran a los conductos biliares en el criceto.

La prepatencia es de aproximadamente 55 días postinfección (d.p.i.) (47 según Salimova, 1972; de 47 a 48 según Chandra, 1973; de 49 a 79 de acuerdo con Campo y cols., 1993), y el período de vida de *D. dendriticum* en la oveja es de, al menos, 6 años, de acuerdo con Kirkwood y Peirce (1971).

2.5.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y ALTERACIONES MORFOPATOLÓGICAS EN LA DICROCELIOSIS

2.5.3.1. SINTOMATOLOGÍA Y ALTERACIONES BIOQUÍMICAS

Existe diversidad de criterios respecto a la influencia de la intensidad y de la duración de la infección en el desarrollo del cuadro clínico y lesivo. Algunos autores consideran que la intensidad de la infección es el principal factor en el desarrollo del proceso patológico (Marchand, 1966; Prunescu y cols., 1979), mientras otros consideran que el cuadro de lesiones se incrementa sólo con la duración de la infección (Soulsby, 1965, citado por Sinclair, 1967). Para algunos investigadores tanto la intensidad como la duración de la infección determinan el alcance de las lesiones orgánicas (Malek, 1980; Borchet, 1981).

La sintomatología varía según la fase y la carga parasitaria que soporte el hospedador, aunque en general cursa con mayor gravedad en el ovino que en el bovino, donde suele desarrollarse como un proceso subclínico. La forma aguda de la parasitosis, que se correspondería con una migración larvaria masiva en infecciones muy intensas, ha sido descrita en ovino pero nunca en bovino. La dicroceliosis crónica, descrita como la forma clínica más común en todas las especies, cursa en general con manifestaciones clínicas ligeras, aún cuando pueden encontrarse normalmente miles de parásitos adultos por animal, dada la longevidad del parásito en el hospedador definitivo y la continua reinfección a lo largo de la vida del animal. En el período inicial se limita a anorexia y apatía mientras que en la fase siguiente se puede observar ya adelgazamiento progresivo, ligera anemia y diarrea esporádica. En la fase terminal, en animales con las defensas disminuidas, puede coexistir la dicroceliosis con metritis, sarna etc. En las infecciones muy intensas podemos encontrar caquexia y ascitis como resultado de la grave cirrosis biliar. No es infrecuente la parasitación mixta con *F. hepática* (Toparlak y Gul, 1988), así como la complicación de la parasitosis con infecciones que derivan en hepatitis colibacilar y piógena (Quiróz, 1984), lo que dificulta el establecimiento de las alteraciones patológicas debidas exclusivamente a *D. dendriticum*.

Respecto a los efectos de la dicroceliosis sobre distintos parámetros hemáticos, bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas séricas, existen pocos datos debido a las dificultades en la consecución de infecciones experimentales con *D. dendriticum* en los hospedadores definitivos. Los cambios patológicos originados por la parasitosis en el hígado derivan en un incremento en las actividades séricas de las enzimas alaninoaminotransferasa (ALT), aspartatoaminotransferasa (AST) y γ -glutamiltanspeptidasa (GGT) (Ranucci y Grol-Ranucci, 1978; Reinhardt, 1978).

Por otra parte, en la dicroceliosis aguda se incrementa la tasa microbiana de la bilis, mientras que disminuye en la crónica. Según el estudio realizado por Campo (1996) en corderos infectados experimentalmente con *D. dendriticum*, los valores de los parámetros bioquími-

cos no se alteraron prácticamente en los animales infectados respecto a los testigos, sin embargo sí se incrementaron, en general, los de las enzimas marcadoras hepáticas, sobre todo AST y ALT en los corderos infectados con la dosis más alta de metacercarias.

En el ganado ovino infectado naturalmente con *D. dendriticum* se incrementaron los valores de AST, ALT, proteínas totales, albúmina, globulinas, urea, fósforo, leucocitos y eosinófilos, y disminuyeron los de eritrocitos, colesterol y calcio. El valor del incremento o del descenso, según los casos, de algunos de los parámetros alterados por *D. dendriticum* estaba relacionado con la dosis infectante (Salimova y Salimov, 1972; Petrov y Abalikhin, 1983), o con la menor carga parasitaria (Ranucci y cols., 1981; Theodoridis y cols., 1991).

2.5.3.2. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Lesiones macroscópicas:

Las alteraciones macroscópicas inducidas por *D. dendriticum*, tanto en infecciones naturales como experimentales, se centran en el hígado, en las vías biliares extrahepáticas y en la vesícula biliar, localizaciones habituales de este parásito en el hospedador definitivo. En la oveja, tras la infección natural con este trematodo, se han descrito hígados más endurecidos de lo normal, con cicatrices y con los conductos biliares extrahepáticos distendidos por la presencia de parásitos y moco en su interior (Mapes, 1951; Krull y Mapes, 1952a). Igualmente, Massoud (1981) describió diferentes hallazgos macroscópicos en la dicroceliosis ovina adquirida de forma natural, tales como induración y presencia de cicatrices hepáticas, engrosamiento y dilatación de los conductos biliares, que en algunas áreas incluso aparecían saculados, y distensión de la vesícula biliar.

Por lo que se refiere a las infecciones experimentales en el ganado ovino con *D. dendriticum*, se ha señalado únicamente la existencia de un hígado agrandado, de bordes redondeados, ligeramente marrón y una vesícula biliar distendida que contenía, frecuentemente, bilis translúcida (Aliev, 1968). Otros autores comprobaron un engrosamiento de los conductos biliares principales y aumento de secreción de aspecto mucoso en ovejas infectadas en condiciones naturales y experimentales con *D. dendriticum* (Wolff y cols., 1984). En los primeros días postinfección, cuando la vía de migración de los parásitos inmaduros es el sistema portal, pueden causar congestión y engrosamiento del hígado, con cambios en su color y consistencia, pudiendo aparecer pequeñas hemorragias subcapsulares (Steele, 1982)

En la fase crónica de la dicroceliosis, Dhar y Singh (1963b) observaron un progresivo endurecimiento del hígado, así como un engrosamiento, dilatación y aspecto tortuoso de las vías biliares y, finalmente, una considerable dilatación de la vesícula biliar, conteniendo gran número de parásitos y abundante bilis verdosa. En el hombre se han descrito nódulos necróticos en el hígado, relacionados con infecciones parasitarias, sobre todo subcapsulares pero

también localizados en el seno del parénquima, de 0,3 a 0,5 cm, delimitados por una cápsula blanquecina, los cuales contenían un material sólido amarillento (Tsui y cols., 1992; Nakashima y cols., 1994).

Lesiones microscópicas:

Fase aguda:

Durante la fase aguda de la dicroceliosis parecen ser las vías biliares las más afectadas (Poljakova-Krusteva y cols., 1974), pudiendo observarse la existencia de una inflamación catarral, así como de una discreta proliferación epitelial de estas estructuras (Cheng, 1978; Drabick y cols., 1988). No obstante, se han observado otras alteraciones, principalmente de los vasos sanguíneos (distensión de la luz, descamación y proliferación del endotelio) y de las células hepáticas (picnosis, aspecto reticulado del citoplasma, presencia de pigmento biliar) en infecciones experimentales con *D. dendriticum* (Aliev, 1968).

Atendiendo a la probable existencia de dos rutas migratorias seguidas por las metacercarias en el hospedador definitivo, Rosicky y Groschaft (1982) establecieron diferentes lesiones en la fase inicial de la dicroceliosis. Así, cuando la migración se efectúa a través del conducto colédoco, existe cierta ectasia, atrofia y degeneración de este conducto, que evolucionan a una inflamación catarral del mismo. Por vía portal, las alteraciones en el epitelio intestinal son mínimas. Asimismo, en relación con esta vía, se ha descrito la existencia de una migración de las formas juveniles del parásito desde los vasos de los espacios porta, primero al tejido conjuntivo y luego al parénquima, donde acuden gran número de histiocitos y eosinófilos (Breza y Svarc, 1968, citado por Rosicky y Groschaft, 1982).

Fase crónica:

En infecciones prolongadas por *D. Dendriticum* en el ganado ovino (dicroceliosis crónica) se produce una colangitis crónica en los conductos biliares de mayor calibre (Mapes, 1951; Marchand, 1966; Cheng, 1978; Borchert, 1981). Además de esta inflamación se han descrito otras alteraciones en estos conductos, tales como soluciones de continuidad en la pared (Pegrefffi, 1957), dilatación (Cheng, 1978; Borchert, 1981), fibrosis (Lapage, 1982) y proliferación papilar de su mucosa (Soulsby, 1965; Sinclair, 1967; Massoud, 1981; Wolff y cols., 1984).

En las células hepáticas se han observado cambios degenerativos y necrosis, con sustitución del área afectada por tejido fibroso (Marchand, 1966; Price y Child, 1971; Massoud, 1981). Por el contrario, hay autores que consideran que el parénquima hepático no está afectado (Borchert, 1981). En los primeros trabajos sobre esta parasitosis, se describieron alteraciones irreversibles de la arquitectura normal del hígado, concretamente cirrosis (Mapes, 1951; Krull y Mapes, 1952a; Soulsby, 1965; Sinclair, 1967). Con posterioridad, otros investigadores

coincidieron en señalar un incremento del tejido conectivo fibroso, el cual delimitaba áreas nodulares de hiperplasia o regeneración, típicas de una cirrosis biliar (Boch y Supperer, 1982). Sin embargo, Drabick y cols. (1988) consideran que en la dicroceliosis crónica se produce una fibrosis peribiliar, pero no una verdadera cirrosis.

Según el estudio realizado por Campo (1996), en corderos infectados experimentalmente, la localización del parásito en los conductos biliares septales y conducto hepático provoca hiperplasia, incremento de la actividad secretora así como atrofia y necrosis marcadas del epitelio, debidas a la irritación mecánica del propio parásito y efecto erosivo de su ventosa. En relación con estos conductos, se comprobó la presencia de leucocitos globulares y un infiltrado inflamatorio, fundamentalmente de acúmulos nodulares de linfocitos, relacionados con la respuesta inmune al parásito.

Cuando se utilizó el criceto como animal de experimentación, además de hiperplasia biliar y cirrosis portal, se observaron granulomas de cuerpo extraño que contenían células gigantes multinucleadas, organizadas alrededor de los huevos del parásito, en el parénquima hepático (Prunescu y cols., 1979). Asimismo, se ha descrito en los espacios porta la existencia de infiltrados de células inflamatorias, principalmente linfocitos y macrófagos, acompañados de fibrosis, así como una hiperplasia papiliforme del epitelio biliar en cricetos infectados con *D. dendriticum* (Sánchez-Campos y cols., 1996).

En el hombre, a pesar de su baja frecuencia, se ha descrito una moderada fibrosis portal (Roche, 1948), una colangitis crónica e incluso alteraciones nerviosas, debidas a la llegada del parásito o sus huevos por vía sanguínea al cerebro (Sigulier y cols., 1952, citado por Malek, 1980). Por último, señalar que, según Soulsby (1988), en la dicroceliosis crónica se produce una cirrosis generalizada, iniciándose la fibrosis en los espacios porta y extendiéndose más tarde de forma interlobulillar y perilobulillar, provocando por último un cuadro semejante a una cirrosis portal.

Respecto a los estudios histoquímicos realizados en hígados parasitados, se ha descrito la pérdida total de la reserva celular de glucógeno de los hepatocitos en las últimas etapas de la infección, aumentando la infiltración de grasas neutras y apareciendo depósitos de lipofucsina (Dhar y Singh, 1963a; Rahko, 1972). El incremento en el depósito lipídico en las células parenquimatosas también ha sido descrito en el criceto por Prunescu y cols. (1979).

2.5.4. PATOGENIA

En la patogenia de la dicroceliosis parecen estar involucrados diversos factores. Así, se ha sugerido la existencia de una acción mecánica ya que, aunque las formas adultas de *D. dendriticum* se localizan principalmente en los conductos biliares de mayor tamaño, su plasticidad y su reducido tamaño les permite acceder a ramificaciones biliares más finas situadas en el

interior del hígado, donde pueden ejercer una acción mecánica obstructiva (Dhar y Singh, 1963b; Poljakova-Krusteva y cols., 1974; Boch y Supperer, 1982; Wolf y cols., 1984; Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991). El acceso a partes más o menos internas del hígado depende de la especie de hospedador definitivo infectado, en función del tamaño de los conductos biliares respecto al parásito; si bien el efecto obstructivo se producirá en el punto hasta el cual puedan acceder los mismos. Como consecuencia de la misma, se produce estasis biliar y congestión pasiva del hígado.

Por otra parte, el parásito contacta con la mucosa de los conductos biliares principales, comprimiendo las vellosidades y produciendo la descamación de las células epiteliales. Esta acción irritativa en los conductos biliares conduce a una mayor formación de mucina y a la proliferación de las células secretoras, además de a colangitis y colangiectasia y, en estados avanzados de la infección, a cirrosis biliar y degeneración celular (Dhar y Singh, 1963b; Boch y Supperer, 1982; Wolf y cols., 1984; Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991). Se ha sugerido que la irritación de la mucosa de los conductos biliares se deriva de la acción erosiva de las ventosas del parásito (Dhar y Sing, 1963b; Rahko, 1972).

A diferencia de *F. hepatica*, las formas adultas de *D. dendriticum* no son hematófagas, sino que se alimentan de bilis, de células epiteliales de los conductos biliares descamadas y de mucus (Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991). El metabolismo del parásito en dicha localización es de tipo fermentativo, como un mecanismo de adaptación a su medio dada la baja tensión de oxígeno existente en la bilis (Von Brand, 1966; Moss, 1970). El parásito no es capaz de oxidar completamente los sustratos, dando lugar a productos finales parcialmente oxidados como el ácido láctico y ácidos grasos volátiles (Köhler y Stahel, 1972; Köhler y Hanselmann, 1973).

Se han observado en el curso de la dicroceliosis cambios patológicos en otros órganos además del hígado, que parecen derivarse de los efectos tóxicos de los productos metabólicos producidos por el parásito (Dhar y Sing, 1963b; Aliev, 1968). La acción tóxica de *D. dendriticum* ha sido muy discutida. En un principio se pensó que el parásito podría secretar una sustancia tóxica capaz de iniciar el proceso patológico (Mapes, 1951), como se indicó para *F. hepática*. Posteriormente, se consideró más probable que esta acción tóxica de *D. dendriticum* se debiera, sobre todo, a los efectos de sus productos metabólicos que, desde la bilis, alcanzarían el torrente sanguíneo, provocando una intoxicación (Krull y Mapes, 1952b; Dhar y Singh, 1963b; Aliev, 1968; Steele, 1982; Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991). Esta posibilidad se ha confirmado en el criceto dorado (Kajubiri, 1982).

Entre otros mecanismos patogénicos, el parásito parece ejercer en el hospedador definitivo una acción inoculadora, sobre todo de gérmenes anaerobios tipo *Clostridium* y poseer una cierta acción cancerígena, al promover la proliferación del epitelio de los conductos biliares (Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991).

La respuesta inmune en el hospedador definitivo a la infección experimental con *D. dendriticum* fue estudiada por primera vez por Renz (1972). Existe disparidad de opiniones a este respecto. Se ha descrito en el criceto dorado y en el conejo una respuesta humoral inmune frente al parásito (Schröder y Geyer, 1976; Bode y Geyer, 1981). Sin embargo, el hecho de que los animales se reinfecten continuamente y que la carga parasitaria sea mayor en animales de mayor edad parecen indicar la ausencia de protección frente a la parasitosis (Fromunda y cols., 1968). El parásito induciría la formación de anticuerpos fijadores de complemento en el hospedador definitivo, si bien no aportarían protección inmunitaria por lo que existiría una reinfección permanente (Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991). En ovejas infectadas con *F. hepatica* se ha indicado, asimismo, la limitada protección que aportan los anticuerpos frente al parásito (Haroun y Hillyer, 1986; Hughes, 1987)

En la actualidad se ha comprobado que la infección con este parásito induce en el hospedador definitivo una respuesta inmune local, en la bilis, mediante la formación de anticuerpos frente a proteínas somáticas solubles de las formas adultas del parásito. La respuesta inmunitaria comprende distintos isotipos de IgA o de IgA e IgG1 y es muy específica para *D. dendriticum* (Wedrychowicz y cols., 1995).

3. METODOLOGÍA

3.1. ANIMALES

Para la realización de este trabajo se han utilizado cricetos macho (*Mesocricetus auratus*) de raza "Syrian Golden" y pesos comprendidos entre 80 y 100 g, en el momento de realizar la infección experimental y entre 110-130 g, en el momento de la intervención quirúrgica (Animalario, Universidad de León). Los animales fueron alimentados con una mezcla de dietas estándares para ratas y conejos (Panlab, Barcelona).

Todos los experimentos se llevaron a cabo con animales que tenían libre acceso a la comida y al agua. Las condiciones del fotoperíodo (12h de oscuridad/12h de luz), temperatura (22°C) y humedad (45-55%) se mantuvieron constantes durante todo el tiempo que duró la infección experimental.

Los protocolos seguidos en los procedimientos experimentales con los animales se realizaron de acuerdo con las indicaciones de la *Guide to the Care and Use of Laboratory Animals* (Canadian Council on Animal Care, NIH Publicación nº 80-23, revisada en 1985), utilizada de forma rutinaria en nuestro laboratorio.

3.2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

La dicroceliosis se indujo en los cricetos mediante la administración intragástrica de 40 metacercarias de *Dicrocoelium dendriticum* vehiculadas en 500 µl de solución salina (NaCl 154 mM) facilitadas por la Estación Agrícola Experimental de León, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Las metacercarias fueron obtenidas de hormigas infectadas de la especie *Formica rufibarbis* Fabricius, 1794 (Formicidae, Formicinae) procedentes de una zona cercana a León en la que, con anterioridad, había sido detectada la infección por *D. dendriticum* en los moluscos, primeros hospedadores intermediarios, y en el ganado ovino, hospedador definitivo. La reco-

gida de las hormigas en fase de tetania se efectuó desde mayo a octubre, principalmente a primeras horas de la mañana y, algunas veces, por la tarde.

La extracción de las metacercarias de las hormigas recolectadas se efectuó mediante la disección de las mismas al estéreomicroscopio, en una placa de Petri con solución salina (NaCl 154 mM), abriendo el abdomen con la ayuda de dos agujas enmangadas muy finas y cortas, procediendo, una vez extraídas, a su recuento.

La recolección de las heces de los cricetos se inició a la sexta semana postinfección y se continuó semanalmente hasta su sacrificio, con el fin de seguir su cinética de eliminación. Las muestras de heces se procesaron por el método de sedimentación, y el recuento de huevos por gramo de heces (hpg) se realizó al microscopio óptico en cámaras McMaster.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los cricetos infectados se distribuyeron en dos grupos experimentales según el intervalo de tiempo transcurrido desde la infección hasta la intervención quirúrgica: el Grupo D₈₀ y el Grupo D₁₂₀ mantenidos durante 80 y 120 días, respectivamente. Asimismo, y en los mismos períodos, eran intervenidos animales control (Grupo C), grupo formado por cricetos que recibieron por vía intragástrica 500 µl de solución salina.

Se realizaron 4 tipos de experimentos:

1) Experimentos tipo A

Los animales recibieron una infusión de solución salina durante el experimento.

Se llevaron a cabo en los siguientes grupos de animales:

Grupo C: cricetos control.

Grupo D₈₀: cricetos infectados, 80 días postinfección (d.p.i.).

Grupo D₁₂₀: cricetos infectados, 120 días postinfección (d.p.i.).

2) Experimentos tipo B

Los animales recibieron durante el experimento una infusión de taurocolato.

Se llevaron a cabo en los siguientes grupos de animales:

Grupo C: cricetos control.

Grupo D₈₀: cricetos infectados, 80 d.p.i.

Grupo D₁₂₀: cricetos infectados, 120 d.p.i.

3) Experimentos tipo C

Los animales recibieron durante el experimento una infusión de manitol [^{14}C].

Se llevaron a cabo en los siguientes grupos de animales:

Grupo C: cricetos control.

Grupo D₁₂₀: cricetos infectados, 120 d.p.i.

4) Experimentos tipo D

Los animales recibieron previamente al experimento una administración intraperitoneal de colchicina y durante el mismo una infusión de solución salina.

Se llevaron a cabo en los siguientes grupos de animales:

Grupo C: cricetos control.

Grupo D₁₂₀: cricetos infectados, 120 d.p.i.

3.4. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS

Con objeto de evitar la posible influencia de las variaciones circadianas en los diferentes parámetros estudiados (Tuñón y cols., 1992), todos los experimentos se iniciaron a la misma hora del día (9-10 a.m.).

3.4.1. EXPERIMENTOS TIPO A (CONDICIONES BASALES)

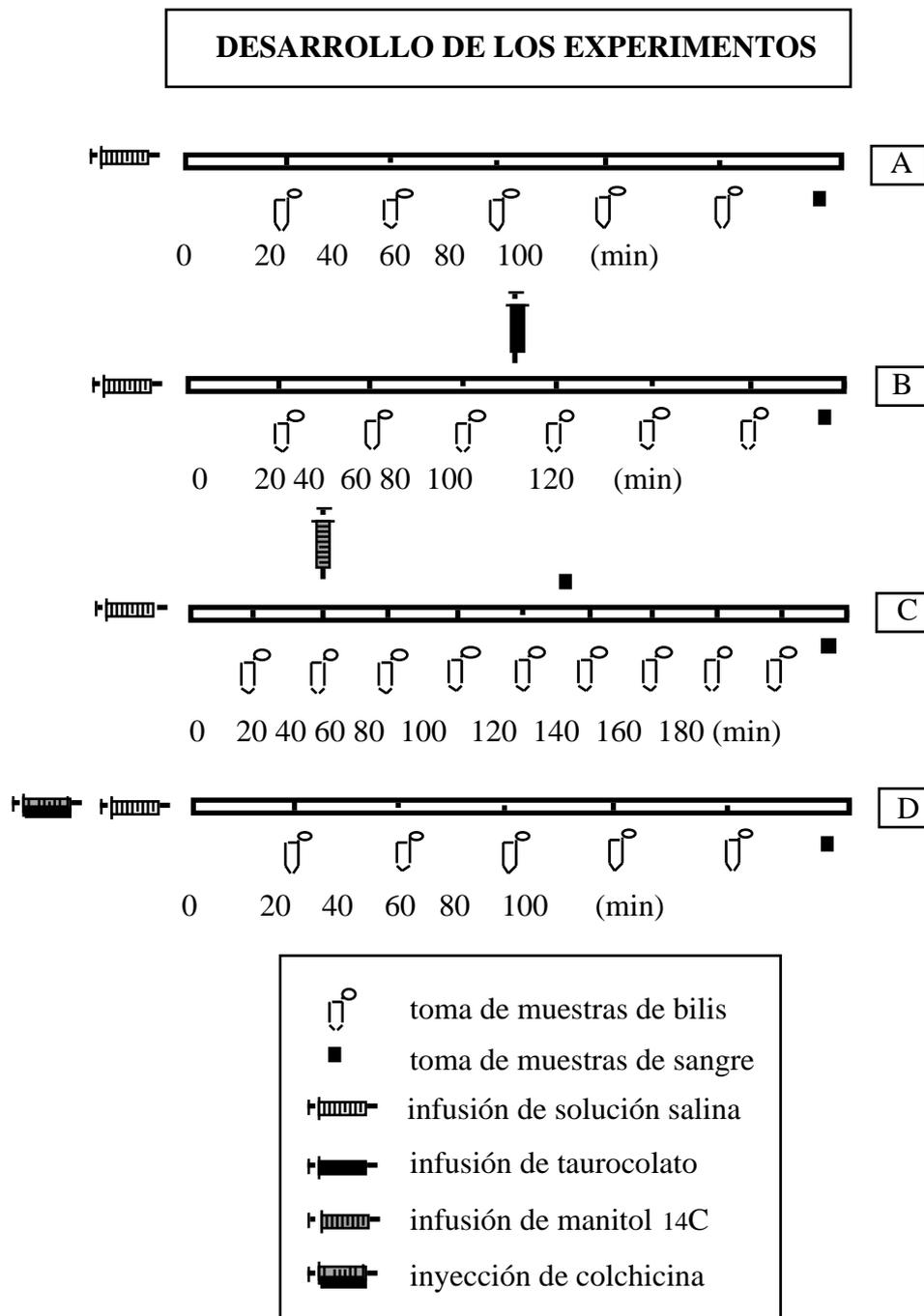
El proceso comenzaba con la anestesia del animal, previa pesada del mismo. El anestésico utilizado fue pentobarbital sódico (Nembutal N.R.), administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal, disuelto en solución salina. La profundidad de la anestesia se controló mediante los reflejos plantar y oculoparpebral.

Una vez pelado y afeitado el campo operatorio, el animal se fijaba a una placa quirúrfano, colocándole junto a una lámpara térmica con objeto de mantener constante la temperatura corporal entre 36,5-37°C, evitando así los efectos negativos de la hipotermia sobre la secreción biliar (Klaassen, 1974). La temperatura era monitorizada continuamente mediante una sonda digital colocada en el recto del animal.

Tras laparotomía ventral media, se disecaba el conducto colédoco por encima de la desembocadura de los conductos pancreáticos y, a través de una incisión en pico de flauta, se introducía una cánula de polietileno (PE-10, Biotrol Pharma, París, Francia).

Se procedía, asimismo, a la disección y canulación de la vena yugular derecha, introduciendo en ella un catéter (0,5 x 0,9 mm Braun, Melsungen AG, Alemania) provisto de solución anticoagulante (heparina al 0,05% en solución salina).

En todos los casos se esperaba un tiempo de 30 minutos, después de la interrupción de la circulación enterohepática al canular el colédoco, antes de la recogida de la primera muestra de bilis para evitar los posibles efectos del estrés quirúrgico sobre la secreción biliar. Pasado este período de recuperación se procedía a la recogida de muestras de bilis, de 20 minutos cada una, durante 100 minutos.



Para la recogida de las muestras de bilis se utilizaron viales previamente pesados y mantenidos en un baño de hielo, que tras la recogida de la bilis se pesaban de nuevo para determinar el flujo biliar por diferencia de pesada. Durante el desarrollo del experimento, la pérdida de agua y electrólitos por parte de los cricetos se compensaba mediante la infusión intravenosa (i.v.) de solución salina a razón de 2 ml/h.

Posteriormente, se procedía a la recogida de sangre mediante la disección y canulación de la arteria carótida derecha, introduciendo en ella un catéter (0,5 x 0,9 mm Braun, Melsungen AG, Alemania) provisto de solución anticoagulante (heparina al 0,05%). El plasma resultante de la centrifugación de las muestras de sangre durante 15 minutos (2.000 xg), se congelaba a -40°C, al igual que la bilis, hasta el momento de la realización de los análisis.

Finalizados los experimentos se procedía al sacrificio de los animales por exanguinación. Se perfundía rápidamente el hígado a través de las venas hepáticas con solución salina fría con el fin de eliminar la sangre existente en el mismo, se extraía, pesaba y congelaba a -80°C.

En los cricetos infectados en los que se llevó a cabo el recuento de las formas adultas de *D. dendriticum*, inmediatamente tras su sacrificio, y sin perfundir el hígado, se realizó la extracción del mismo y se diseccionó para la obtención y recuento de los vermes alojados en los conductos biliares.

Asimismo, se extrajeron los parásitos de la vesícula biliar y se observó la presencia de huevos en la bilis contenida en la misma.

3.4.2. EXPERIMENTOS TIPO B (INFUSIÓN DE TAUROCOLATO)

Se administró, por vía intravenosa, taurocolato a los cricetos control y a los cricetos infectados de 80 y 120 d.p.i. El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo de igual manera que en los experimentos tipo A. El muestreo de la bilis se realizó cada 20 minutos, y tras la recogida de tres muestras de bilis basales, se procedió a la sustitución de la infusión de solución salina por una infusión de taurocolato sódico vía i.v. (0,5 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de peso corporal.min) vehiculado en solución salina a 37°C y a una velocidad de infusión constante de 2 ml/h, durante una hora. Se recogieron durante la infusión 3 muestras de bilis, tras lo cual se procedió a la recogida de sangre arterial y del hígado tal y como se ha descrito para los experimentos tipo A.

3.4.3. EXPERIMENTOS TIPO C (INFUSIÓN DE MANITOL [¹⁴C])

El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo tal y como se ha descrito para los experimentos tipos A y B, realizándose, además, la ligadura de los pedículos renales. Tras la recogida de dos muestras basales de bilis de 20 minutos cada una, se procedió a la infusión de mani-

tol [^{14}C] vía i.v. (0,5 $\mu\text{Ci/h}$), vehiculado en solución salina a 37°C y a una velocidad de infusión constante de 1 ml/h, durante 140 minutos. Cuando el flujo biliar alcanzó el estado estacionario (a los 70 minutos desde el comienzo de la infusión) se procedió a la extracción de una muestra de sangre arterial, que se repitió al finalizar los experimentos. Los animales eran sacrificados al final de los mismos por exanguinación y los hígados eran extraídos, pesados y congelados a -80°C .

3.4.4. EXPERIMENTOS TIPO D (INYECCIÓN DE COLCHICINA)

Se procedió a la administración intraperitoneal de colchicina vehiculada en solución salina (0,2 mg/100 g de peso corporal) a los cricetos control y a los cricetos infectados, realizándose el procedimiento quirúrgico a las 3 horas de su administración de igual manera a lo descrito en los experimentos tipo A. Tras el período de recuperación, se procedió a la recogida de muestras de bilis de 20 minutos cada una durante 100 minutos. Durante el desarrollo del experimento, la pérdida de agua y electrolitos por parte de los cricetos se compensaba mediante la infusión intravenosa de solución salina a razón de 2 ml/h. Al finalizar los mismos se procedía a la recogida de sangre arterial, que se congelaba a -40°C para su conservación, y se sacrificaban los animales por exanguinación. Se perfundía rápidamente el hígado a través de la vena hepática con solución salina fría con el fin de eliminar la sangre existente en el mismo, se extraía, pesaba y congelaba a -80°C .

3.5. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Para los estudios de microscopía óptica (realizados en el Departamento de Patología Animal: Medicina Animal, de la Universidad de León) se recogieron muestras del hígado y de la vesícula biliar, fijándose inmediatamente en formol al 4%. Tras su deshidratación e inclusión en parafina Gurr se procedió a la obtención de cortes seriados de 4 μm de grosor, mediante la utilización de un microtomo de rotación 1512 (Leitz), con adaptador para cassetes y cuchillas recambiables. Las técnicas de coloración empleadas para el estudio histopatológico fueron las siguientes: hematoxilina-eosina (H-E), tricrómicos de Masson-Goldner y Gallego, ácido peryódico de Shiff (PAS) y plata metenamina de Gomori.

Para la observación del hígado en cortes semifinos y ultrafinos, se tallaron pequeños bloques del mismo. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato Sörensen 0,1 M de pH 7,4-7,6, durante media hora a 4°C , realizando posteriormente tres lavados de 30 minutos cada uno con solución tampón y una post-fijación en tetróxido de osmio al 1%, en tampón fosfato Sörensen durante una hora, a la misma temperatura. Para la realización de los cortes semifinos y ultrafinos se utilizó un ultramicrotomo LKB V. Las cuchillas de vidrio de 45° , fueron confeccionadas en un "Knifemarker" (LKB) y los bloques se tallaron en un aparato tallador (Reichert-Jung TM 60). Los cortes semifinos de 0,5-1 μm de espesor se depositaron sobre gotas de agua bidestilada, colocadas en un portaobjetos y se extendieron con

la ayuda de una platina caliente (90°C). Los cortes ultrafinos, de aproximadamente 70 nm de grosor (interferencia plateada-dorada), se montaron sobre rejillas de cobre de 150 mesh, o bien 100 mesh con película soporte de formvar al 0,025%. Los cortes semifinos fueron teñidos en caliente con una solución acuosa de azul de toluidina al 1%. Para los cortes ultrafinos se realizó una doble tinción positiva con acetato de uranilo y citrato de plomo.

En los estudios de microscopía óptica se utilizó un microscopio Leitz Diaplan con óptica PL Fluotar. Los estudios ultraestructurales se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión "JEOL, 100 CX", del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de León. Las fotografías macroscópicas fueron realizadas con una cámara Nikon AF 50 provista de un objetivo AF Micro Nikkor 60 mm y película para diapositivas Ektachrome 160 tungsteno. Las microfotografías se obtuvieron mediante películas Ektachrome 100 ASA de Kodak para diapositivas y 100 ASA Super G Plus Fujicolor, en un microscopio Olympus Provis AX70 equipado con óptica plana apocromática. Las ultramicrofotografías se realizaron con una película "Kodak Imagecapture AHU microfilm 5460".

3.6. SOLUCIONES UTILIZADAS

Colchicina

La colchicina (Sigma Chemical Co., San Luis, USA) se disolvía en solución salina.

Heparina

La heparina de 5.000 U al 5% (Leo, Madrid) se diluía 1:100 con solución salina para obtener una concentración final de 0,05%.

Manitol [¹⁴C]

El manitol [¹⁴C] (Dupont, Boston, USA) se disolvía en solución salina.

Pentobarbital sódico

El pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co, San Luis, USA) se disolvía en solución salina en una concentración de 5 mg/ml.

Solución salina

Fisiológica: al 0,9% preparada disolviendo NaCl (Panreac, Madrid) en agua destilada hasta una concentración final de 154 mM.

Taurocolato sódico

El taurocolato sódico (Sigma Chemical Co., San Luis, USA) se disolvía en solución salina.

3.7. APARATOS UTILIZADOS

Analizador de gases

Ciba-Corning, modelo 178.

Autoanalizador

Boehringer Mannheim, modelo Reflotrón II.

Balanzas de precisión

Sartorius, modelo 2842.

Sartorius, modelo R200D.

Baños termostáticos

Selecta, tipo 135925.

Selecta, tipo Unitronic 320 OR.

Bomba peristáltica

Bromma, modelo LKB 2132.

Centrífugas

Jouan, modelo BR 3.11.

Sorvall, modelo RC-5B.

Beckman, modelo L8-70M Ultracentrífuga.

Beckman, modelo XL-70 Ultracentrífuga.

Contador de centelleo

Beckman, modelo LS 6000TA.

Cromatógrafo de gases

Hewlet Packard, modelo HP 5890A serie II.

Cromatógrafo líquido (HPLC)

Spectra-Physics.

Compuesto de:

- Bomba ternaria de HPLC, modelo Sp 8800.
- Detector, modelo Spectra Chrom 200.
- Integrador, modelo Chronject.
- Inyector automático, modelo Sp 8780.

Desecador de nitrógeno

The Meyer, N-EVAP.

Espectrofluorímetro

Sim Aminco, modelo LH-700.

Espectrofotómetros

Milton Roy, modelo Spectronic 2001.

Hitachi, modelo U-2000.

Espectrómetro de masas

Hewlet Packard, modelo HP 5972A.

Granatario

Sartorius, modelo 1216 MP.

Homogeneizadores

B. Braun, tipo 853202.

Kinemática AG, modelo Polytron.

Material de cirugía

Agujas, bisturís, cánulas, catéteres, pinzas, suturas, tijeras, etc.

Material de laboratorio de carácter general

Agitadores de tubos, arcones congeladores, frigoríficos, micropipetas automáticas, y demás aparatos de uso normal en un laboratorio de fisiología.

pHmetro

Crison, modelo 2001.

3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.8.1. DETERMINACIONES EN PLASMA Y BILIS

3.8.1.1. FLUJO BILIAR

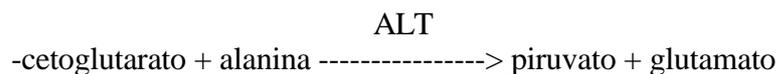
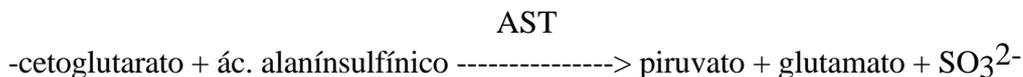
La determinación del flujo biliar se realizó gravimétricamente por diferencia de pesada de los viales de recogida de las muestras, previamente tarados, y su peso con la bilis correspondiente a un período de tiempo determinado. La densidad de la bilis se considera aproximadamente igual a la unidad (Klaassen, 1974). El flujo se expresó tanto por peso corporal ($\mu\text{l}/100\text{ g}\cdot\text{min}$) como por peso hepático ($\mu\text{l}/\text{gh}\cdot\text{min}$).

3.8.1.2. ACTIVIDADES TRANSAMINASAS (ALT Y AST) EN PLASMA

Fundamento:

Las actividades de las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST; ASAT; GOT; glutamato oxalacetato transaminasa; EC 2.6.1.1), y alanina aminotransferasa (ALT; ALAT; GPT; glutamato piruvato transaminasa; EC 2.6.1.2), se determinaron en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Alemania).

La AST cataliza la reacción de α -cetoglutarato y ácido alanínulfínico a piruvato y glutamato. La ALT cataliza la reacción de α -cetoglutarato y alanina a piruvato y glutamato.



El piruvato formado se hidroliza bajo la acción de la piruvato oxidasa (POD) a acetilfosfato, anhídrico carbónico y peróxido de hidrógeno. En presencia de POD, el H_2O_2 oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma que presenta color azul.



Método:

La determinación se realizó mediante tiras reactivas en las que se depositó la muestra. A través de una medición cinética a 567 nm en un autoanalizador, se siguió el desarrollo del color como medida de la actividad enzimática de la ALT o de la AST.

3.8.1.3. MANITOL [¹⁴C] EN PLASMA Y BILIS

La radioactividad derivada de la infusión de manitol [¹⁴C] existente en plasma y en bilis se midió en un contador de centelleo.

Se diluyeron 50 µl de plasma o bilis en 5 ml de líquido de centelleo (Fórmula-989 Universal High Flash. Point LSC Cocktail. Biotechnology Systems. Dupont), obteniendo los resultados en dpm (desintegraciones por minuto). La depuración biliar de manitol [¹⁴C] se calculó multiplicando el flujo biliar (expresado en µl/gh.min) por la relación bilis/plasma (B/P) de la radioactividad (dpm) obtenida.

3.8.1.4. ÁCIDOS BILIARES EN BILIS

Fundamento:

Se llevó a cabo por el método enzimático de Talalay (1960), utilizando la actividad 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa (E.C.1.1.1.50, grado III, Sigma Chemical Co). La concentración de ácidos biliares se detecta por la cantidad de NADH generado durante la oxidación del grupo hidroxilo de la posición tres de la molécula.

La reacción está catalizada por una 3- -hidroxiesteroide deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, procedente de *Pseudomonas testosteronii*.

Método:

La mezcla de incubación contenía:

- 650 µl de tampón pirofosfato sódico (0,1 M); pH 9,4.
- 50 µl de NAD⁺ (5 mM).
- 100 µl de hidrato de hidrazina (1 M).
- 0,5 U de 3- -hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- 10 µl de bilis.

Tras incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 340 nm. El cálculo de las concentraciones de ácidos biliares se realizó mediante una recta patrón elaborada con cantidades crecientes de ácido taurocólico (de 5 a 80 mM).

3.8.1.5. BICARBONATO EN BILIS

Se determinó mediante lectura directa en un analizador de gases de una muestra de bilis recogida en un tubo de microhematócrito en ausencia de oxígeno.

3.8.1.6. GLUTATIÓN EN BILIS

Fundamento:

Para la determinación de la concentración de glutatión en bilis se siguió el procedimiento descrito por Tietze (1969), según la modificación de Griffith (1980). La suma de las formas reducida y oxidada de glutatión puede ser determinada usando el ensayo de cinética, en el cual, cantidades catalíticas de GSH o de GSSG y glutatión reductasa producen la continua reducción del 5-5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) o DTNB, gracias al NADPH. La formación de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) se midió espectrofotométricamente a 412 nm.

Método:

Se incubó, a 30°C y durante 3 minutos, la siguiente mezcla:

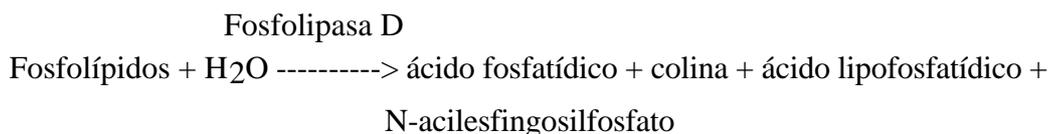
- 700 µl de NADPH (0,3 mM en tampón fosfato sódico 0,1 M/EDTA 6 mM; pH 7,5).
- 100 µl de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (6 mM en el mismo tampón).
- 200 µl de la muestra diluida (dilución 1:1.000 de la bilis en tampón).

Tras la adición de 50 U/ml de glutatión reductasa se monitorizó el incremento de la absorbancia a 412 nm durante 5 minutos a 30°C. Como blanco reactivo se utilizó la mezcla de incubación sustituyendo la muestra por tampón fosfato/EDTA. Se realizó una recta patrón con concentraciones crecientes de GSH (de 0,65 a 6,5 mM).

3.8.1.7. FOSFOLÍPIDOS EN BILIS

Fundamento:

La determinación de fosfolípidos (lecitina, esfingomiélna y lisolecitina) en bilis se realizó mediante un método enzimático comercial PAP 150 (BioMérieux, Marci-l'Etoile, Francia), basado en la hidrólisis de los mismos por la acción de la enzima fosfolipasa D, liberándose colina que es estimada mediante la reacción de Trinder.



Método:

La solución reactiva contenía:

- Tampón Tris (20 mM); pH 7,8.

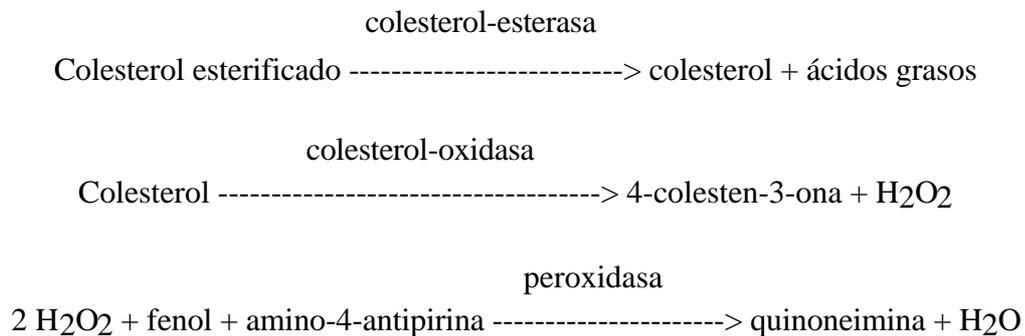
- Fenol (10 mM).
- Colinoxidasa (2.000 U/l).
- Fosfolipasa D (600 U/l).
- Peroxidasa (1.000 U/l).
- Amino-4-antipirina (0,5 mM).

Se incubó durante 10 minutos a 37°C una solución que contenía 20 µl de bilis o de patrón y 1 ml de la solución reactiva. La absorbancia de la mezcla se leyó a 505 nm de longitud de onda frente a un blanco de solución reactiva. Las concentraciones de fosfolípidos en bilis se calcularon mediante una recta patrón con soluciones crecientes de fosfolípidos (de 1 a 4 mM).

3.8.1.8. COLESTEROL EN BILIS

Fundamento:

La concentración de colesterol en bilis se determinó mediante el método enzimático comercial CHOD-PAP (Merck, Darmstadt, Alemania) que se basa en la transformación del colesterol esterificado en colesterol libre y la formación posterior de un cromógeno.



Método:

La solución reactiva, con un volumen final de 1 ml, contenía:

- Tampón PIPES (ácido piperazina dietano sulfónico) (0,1 M).
- Fenol (12 mM).
- Amino-4-antipirina (2 mM).
- Colesterol esterasa (120 U/l).
- Colesterol oxidasa (100 U/l).
- Peroxidasa (1.000 U/l).

A la solución reactiva se le añadieron 10 µl de bilis o de patrón, incubándose la mezcla durante 5 minutos a 37°C. Se realizó un blanco problema de cada muestra conteniendo 1 ml de agua destilada y 10 µl de muestra, y un blanco reactivo con 1 ml de muestra reactiva.

Se leyó la absorbancia de las muestras a 500 nm de longitud de onda frente al blanco de solución reactiva. Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta patrón con soluciones crecientes de colesterol (de 0,32 a 3,88 mM).

3.8.1.9. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE LITOGÉNICO

Fundamento:

El índice de litogenicidad de la bilis está determinado por la relación molar de las concentraciones de colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares, así como la concentración biliar de lípidos totales. Aunque el índice litogénico se calcula habitualmente mediante las tablas de Carey (1978), en el presente estudio, dado que la concentración biliar de colesterol fue inferior a la menor de las recogidas en las citadas tablas, se calculó por el método de Thomas y Hoffman (1973).

Método:

El valor del índice de litogenicidad viene expresado por el cociente entre el porcentaje molar de colesterol de la muestra y el porcentaje molar de colesterol a saturación; este último se obtiene matemáticamente con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ molar de colesterol a saturación} = 3,082 - 0,0804x + 117,05x^2 - 204,94x^3$$

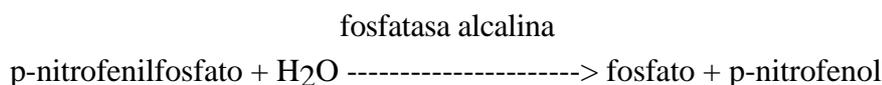
Donde: x = lecitinas/(ácidos biliares + lecitinas), expresado en mM.

3.8.1.10. ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA EN BILIS

Fundamento:

La actividad fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1.) se determinó mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Alemania). En la reacción se emplea como sustrato para-nitrofenilfosfato que, por acción enzimática, pierde el grupo fosfato, aceptándolo el agua y produciéndose para-nitrofenol, compuesto intensamente amarillo, con un máximo de absorción a 400 nm.

La reacción es la siguiente:



Método:

Se mezclan 10 µl de bilis con 600 µl de solución reactiva, vertiéndose inmediatamente en una cubeta. Se lee la absorbancia, medida frente al aire, repitiéndose las lecturas 1, 2 y 3

minutos después. Tras obtener el valor medio de los incrementos de absorbancia por minuto (E/min), los valores de la actividad de la fosfatasa alcalina en la muestra se calculan según la siguiente fórmula:

$$\text{Fosfatasa alcalina (U/l)} = 3.300 \times E_{405\text{nm}/\text{min}}$$

3.8.1.11. DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ÁCIDOS BILIARES POR CROMATOGRFÍA DE GASES - ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

El método GC-MS para la determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos biliares en la bilis se realizó en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca. Dicha determinación se llevó a cabo según una adaptación descrita por Luengo (1995) de los diferentes métodos descritos por otros autores (Axelson y Sjövall, 1974; Mingrone y cols., 1983; Sjövall y cols., 1985; Batta y cols., 1989; Malavolti y cols., 1993).

Se procedió a separar un grupo de ácidos biliares mayoritarios según sus tiempos de retención por cromatografía de gases antes de ser tratados con espectrometría de masas. Los ácidos biliares elegidos para el método de separación, identificación y cuantificación de ácidos biliares en muestras de bilis fueron: ácido cólico (AC), ácido quenodesoxicólico (AQDC), ácido desoxicólico (ADC) y ácido litocólico (ALC), entre otros.

3.8.1.11.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

3.8.1.11.1.1. DESAMIDACIÓN ENZIMÁTICA

Fundamento:

Los ácidos biliares deben desconjugarse para obtener ácidos biliares libres que puedan derivatizarse, para posteriormente ser inyectados en el equipo de GC-MS.

La desamidación enzimática se basa en la desconjugación de la molécula del ácido biliar de su aminoácido conjugante (taurina o glicina) mediante hidrólisis enzimática con la enzima colil-glicil-hidrolasa (CGH; EC 3.5.1.24) (Setchell y Matsin, 1983).

Reactivos:

- Tampón fosfato sódico (100 mM); pH 5,6.
- Colil-glicil-hidrolasa, 3 U para cada muestra/500 μl del mismo tampón.
- Etanol.
- Metanol.
- Acetona al 10%.
- NaOH (0,1 N).

Método:

A 30 µl de bilis se le añadieron 100 µl de etanol, 4,5 ml de tampón fosfato y 500 µl de la enzima, agitándose e incubándose la mezcla 16 horas a 37°C. Se añadieron posteriormente 15 ml de NaOH y se agitó. La muestra se pasaba por un cartucho C18 (SepPak, Water-Millipore), para extraer los ácidos biliares libres por cromatografía. Dicho cartucho era previamente activado con 5 ml de metanol seguidos de 5 ml de agua, lavándose posteriormente con 10 ml de agua seguidos de 3 ml de acetona al 10% y, finalmente, otros 10 ml de agua. Los ácidos biliares se extraían añadiendo 4 ml de metanol.

3.8.1.11.1.2. DERIVATIZACIÓN

Tras la desconjugación, y antes de proceder a la derivatización de los ácidos biliares libres, se añadía a la muestra una cantidad conocida de un patrón interno (10-100 pmoles) con el fin de corregir los posibles errores cometidos en la manipulación posterior de las muestras (derivatización, inyección en GC-MS, etc).

El patrón interno elegido fue el 5- colestano (Crosignani y cols., 1991) debido a la similitud de su estructura química con la de las diferentes familias de ácidos biliares, al menos en cuanto al anillo esteroideo se refiere. El 5- colestano se disolvió primero en hexano y de esta solución se escogió el volumen necesario para añadirlo a cada muestra.

Con la derivatización se pretende conseguir una reducción de la polaridad de las moléculas de los ácidos biliares para que éstas se volatilicen con mayor facilidad a las temperaturas empleadas en el método de GC-MS. Además, con este proceso aumentamos la masa de la molécula del ácido biliar, de manera que la fragmentación de la misma por bombardeo electrónico dará lugar a iones característicos, diferenciados y fáciles de identificar. Para lograr este fin se llevaron a cabo dos procedimientos sucesivos: metilación y sililación.

3.8.1.11.1.3. METILACIÓN*Fundamento:*

La metilación es una reacción química que consiste en la conversión del grupo carboxilo (-COOH) de la cadena lateral del ácido biliar en un grupo metil éster (-COOCH₃), en presencia de diazometano (Howard-Black, 1983; Setchell y cols., 1983).

Reactivos:

- Diazometano (C₂N₂), que se genera por destilación: reacción química gota a gota entre una solución concentrada de N-metil-N-nitroso-p-toluen sulfonamida (Diazald) en éter

etélico, y otra alcohólica concentrada de KOH, a una temperatura de 60-63°C. La solución etérea de diazometano, obtenida por condensación, se recoge sobre hielo.

- Reactivo de Folk: cloroformo y metanol, 2:1.

Método:

La muestra que contiene los ácidos biliares se deseca después de haber añadido el patrón interno y se redisuelve en 2 ml de reactivo de Folk. A continuación se le añaden 4 ml de solución etérea de diazometano (preparado en fresco), se mezcla suavemente y se deja 15 minutos a temperatura ambiente. El exceso de reactivo se elimina con una corriente de nitrógeno.

3.8.1.11.1.4. SILILACIÓN

Fundamento:

La sililación es una reacción química que consiste en la conversión de el/los grupo/s -OH que contenga el anillo esteroideo del ácido biliar, en derivados trimetil silil éter [-OSi(CH₃)₃] (Almé y cols., 1977).

Reactivos:

- Piridina.
- 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano.
- Clorotrimetilsilano.
- Hexano.

Método:

La sililación se realiza mediante la adición de 300 µl de una mezcla de reacción que contiene piridina, hexametildisilazano y clorotrimetilsilano (3:2:1) preparada en fresco y sobre hielo. Esta reacción se lleva a cabo durante 1 h, a 48°C y en atmósfera de nitrógeno. Al término de la sililación el exceso de reactivo se elimina por una corriente de nitrógeno.

Los derivados metilados y sililados de los ácidos biliares contenidos en las muestras se extrajeron con 0,2-2 ml de hexano; de este modo quedan listos para su posterior inyección en el GC-MS.

3.8.1.11.2. MÉTODO DE GC-MS

Las muestras de ácidos biliares (derivatizados) se disuelven en hexano (0,2-1 ml), inyectándose 3 µl en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

3.8.1.11.2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Inyector:

Se utilizó un inyector capilar. El modo de inyección utilizado fue "sin división" (splitless) realizada de forma manual. El método splitless se emplea para el estudio de componentes traza, como en nuestro caso son los ácidos biliares. El tiempo en el que la válvula permanece abierta para que la muestra pase a la columna (o el tiempo de splitless) es de 2 minutos. La temperatura del inyector se mantuvo constante a 290°C y se realizaron las siguientes rampas de presión:

- De 12,1 psi a 25 psi (velocidad: 70 psi/min) y mantenida durante 2 minutos.
- De 25 psi a 12,1 psi (velocidad: 70 psi/min).
- Constante a 12,1 psi hasta el final del proceso (60 min y 30 sg).

Horno:

Se programaron las siguientes rampas de temperatura:

- Inicialmente, a 55°C durante 4 min.
- De 55°C a 225°C a 40°C/min. Se mantuvo así durante 5 minutos.
- De 225°C a 295°C a 2 °C/min. Se mantuvo así durante 12 minutos.

Columna:

La columna utilizada fue de sílica gel funcida, modelo HP-5 M.S. (Crosslinked 5% pH Mesilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Hewlett Packard). La presión del gas conductor en la cabeza de columna fue de 12,1 psi. Como la columna está ubicada dentro del horno (sin tocar nunca sus paredes), la programación de la temperatura del horno es la misma que la de la columna, de manera que una adecuada programación de temperatura multirrama permite separar satisfactoriamente los diferentes componentes de la muestra: de mayor a menor volatilidad y según su coeficiente de reparto.

Gas conductor:

Se utilizó helio. Su flujo a través de la columna fue de 1 ml/min.

3.8.1.11.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El espectrómetro de masas está acoplado al cromatógrafo de gases descrito anteriormente. Las moléculas, separadas por cromatografía de gases en la columna, cuando llegan al espectrómetro de masas se ionizan mediante impacto electrónico. La energía del bombardeo

electrónica utilizada fue de 70 eV, y la temperatura de la fuente iónica se fijó en 280°C. Las diferentes masas obtenidas como consecuencia del impacto electrónico son características de cada tipo de ácido biliar porque su formación depende, sobre todo, de la estructura química de estos compuestos. En el cromatograma aparecen, en función del tiempo de retención, diferentes picos que corresponden a la suma de todos los impactos de las partículas de diferente valor de m/z (masa/carga) que se han generado a partir de las distintas moléculas de los ácidos biliares. La altura de estos picos en el cromatograma depende, a su vez, de la concentración de la molécula en el volumen inyectado.

La cuantificación de los ácidos biliares se realizó mediante el uso de estándares externos de calibración, usando como patrones los ácidos biliares cólico, quenodesoxicólico, desoxicólico, ursodesoxicólico y litocólico. Los demás ácidos biliares, identificados por comparación de sus espectros de masas con los recogidos en la bibliografía (Thoma y cols., 1985; Lawson y Setchell, 1988; Kimura, y cols., 1989; 1994; Dumaswala y cols., 1993), se cuantificaron utilizando la recta de calibración del ácido cólico.

3.8.2. DETERMINACIONES EN HÍGADO

3.8.2.1. OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADO FRESCO

Se homogeneizó 1 g de hígado en 4 ml de tampón fosfato potásico (0,1 M; pH 7,4).

3.8.2.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA

Para la obtención de la fracción citosólica hepática, se procedió a la homogeneización del hígado en tampón fosfato potásico (0,2 M); pH 7,4 (1 g + 4 ml) y posterior centrifugación a 105.000 xg durante una hora y a 4°C, recogiendo el sobrenadante que constituye dicha fracción.

3.8.2.3. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSÓMICA

Se homogeneizó 1 g de hígado con 3 ml de tampón sacarosa (0,25 M)/Tris-ClH (0,05 M); pH 7,4 y se centrifugó durante 20 minutos a 48.000 xg y a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a tubos de ultracentrífuga, volviendo a centrifugar durante 60 minutos a 105.000 xg y 4°C. Se descartó el sobrenadante y se limpió la pared del tubo para eliminar los restos de lípidos. El precipitado, donde se encuentra dicha fracción, se resuspendió en 1,5 ml del mismo tampón, homogeneizando de nuevo.

3.8.2.4. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL

Para la obtención de la fracción mitocondrial hepática se homogeneizó 1 g de hígado con 10 ml de tampón: manitol (0,25 M), sacarosa (70 mM) y EDTA (2 mM); pH 7,4 y se

centrifugó durante 10 minutos a 754 xg y a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se repitió la operación resuspendiendo el precipitado obtenido con el fin de recuperar la fracción mitocondrial que pudiera no haber sido extraída en el primer paso. Tras unir ambos sobrenadantes, se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 xg y a 4°C, desechando tras este paso el sobrenadante obtenido y resuspendiendo el precipitado, donde se encuentra la fracción mitocondrial, en 4 ml de tampón: manitol (0,25 M), sacarosa (70 mM) y hepes (3 mM); pH 7,4. Se centrifugó de nuevo 10 minutos a 12.000 xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado mitocondrial en 1,5 ml de tampón de sacarosa (0,25 mM) y EDTA (2 mM); pH 7,4, homogeneizando de nuevo y conservándolo a -80°C hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas correspondientes.

3.8.2.5. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Fundamento:

Se utilizó una modificación del método de Lowry y cols. (1951) realizada por Markwell y cols. (1978) basada en la reducción de la proteína con el cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con la proteína tratada.

Método:

Los reactivos a utilizar en este método son:

Reactivo A: carbonato sódico 2%, hidróxido sódico 0,4%, tartrato sódico 0,16% y dodecil sulfato sódico 1%.

Reactivo B: sulfato de cobre 4%.

Reactivo C: Folin Ciocalteu 50%.

Se incubó durante 15 minutos a la temperatura del laboratorio y en ausencia de luz, la siguiente mezcla:

- 5 µl de muestra.
- 495 µl de agua destilada.
- 1,5 µl de reactivo D (100 ml de reactivo A + 1 ml de reactivo B).

Posteriormente se adicionó 150 µl de reactivo C y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad.

La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 650 nm. Para el cálculo de las concentraciones se elaboró una recta patrón utilizando albúmina bovina (fracción V, Sigma) con concentraciones entre 0,125 y 1,0 mg de proteína por ml de agua destilada.

3.8.2.6. CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)

Fundamento:

Se siguió el procedimiento descrito por Hissin y Hilf (1976), basado en la reacción específica del GSH con el optaldehído (OPT) a pH 8,0 formándose un producto altamente fluorescente que se activa a 350 nm con un pico de emisión a 420 nm. Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de homogeneizados hepáticos preparados en tampón fosfato sódico/EDTA (0,1 M); pH 8,0 y H₃PO₄ al 25% y centrifugando a 105.000 xg durante 30 minutos a 4°C.

Método:

Incubación, a temperatura ambiente y durante 15 minutos, de la siguiente mezcla:

- 1,8 ml de tampón fosfato/EDTA (0,1 M); pH 8,0.
- 0,1 ml del homogeneizado diluido (0,5 ml en 4,5 ml del mismo tampón).
- 0,1 ml de optaldehído (7,5 µM).

Se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. Como blanco reactivo se utilizó la mezcla de incubación sustituyendo los 100 µl de muestra diluida por tampón fosfato/EDTA.

Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta patrón con soluciones crecientes de GSH (de 0,81 a 32,52 mM), expresándose los resultados como µmol de glutatión reducido/g de hígado.

3.8.2.7. CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN OXIDADO (GSSG)

Fundamento:

Se determinó según el método de Hissin y Hilf (1976), con algunas modificaciones. Está basado en la reacción del glutatión oxidado con el reactivo fluorescente OPT a pH 12. A este elevado pH del medio, la conversión de glutatión reducido a glutatión oxidado es prácticamente nula. Para la realización de la técnica, se utilizaron los mismos sobrenadantes de homogeneizados hepáticos descritos en el apartado anterior, usándose inmediatamente tras su obtención.

Método:

Añadir a tubos de rosca una cantidad de vinilpiridina, equivalente a 0,5 ml, con la ayuda de una espátula y 1 ml del sobrenadante de homogeneizados hepáticos. Agitar vigorosamente durante 30 minutos. Añadir posteriormente 9 ml de NaOH (0,1 N) y volver a agitar.

Incubar, a T^a ambiente y durante 15 minutos en oscuridad, la siguiente mezcla:

- 0,1 ml de la mezcla anterior.
- 1,8 ml de NaOH (0,1 N).
- 0,1 ml de OPT (7,5 μ M).

Medir la fluorescencia en un espectrofluorímetro a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. Como blanco reactivo se utilizó la mezcla de incubación sustituyendo los 0,1 ml de la mezcla con la muestra por NaOH (0,1 N). Se realizó, además, otro blanco sustituyendo en la mezcla de incubación el OPT por NaOH (0,1 N), con el fin de estimar la fluorescencia debida a la vinilpiridina. Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta patrón con soluciones crecientes de GSSG (de 0,33 a 1,63 mM en NaOH 0,1 N), expresándose los resultados en μ mol de glutatión oxidado/g de hígado.

3.8.2.8. ACTIVIDAD γ -GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA (GCS)

Fundamento:

Se siguió el procedimiento descrito por Sekura y Meister (1977). Está basado en la utilización de los sobrenadantes de homogeneizados hepáticos obtenidos tras la centrifugación a 5.000 xg durante 10 minutos de una muestra constituida por 1 gramo de hígado y 9 ml de tampón: NaOH (0,1 M), ClK (150 mM), 2-mercaptoetanol (5 mM) y Cl₂Mg (1 mM); pH 7,0.

Método:

Se añadieron 50 μ l de sobrenadante a 500 μ l de mezcla constituida por los siguientes reactivos disueltos en tampón Tris-ClH (0,1 M); pH 8,2:

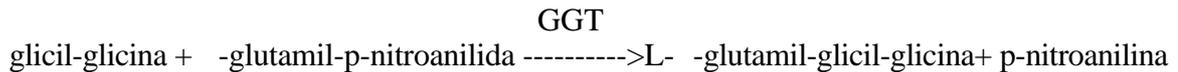
- L-glutamato sódico (10 mM).
- L- -amino butirato (10 mM).
- MgCl₂ (20 mM).
- ATP-Na₂ (5 mM).
- EDTA-Na₂ (2 mM).
- Albúmina bovina (10 μ g/500 μ l).

Tras incubar la mezcla con agitación durante 15 minutos a 37°C se le añadían 500 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y seguidamente se centrifugaba a 2.000 xg durante 10 minutos, midiendo el fósforo inorgánico liberado en el sobrenadante. Los resultados se expresaron como nmol de fósforo inorgánico liberados/mg de proteína.min.

3.8.2.9. ACTIVIDAD γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASA (GGT)

Fundamento:

Se realizó por el método de Meister y cols. (1981). La GGT cataliza la transferencia del grupo γ -glutamilo del glutatión, de derivados S-sustituidos del glutatión y otros compuestos γ -glutamilo, a numerosos aceptores. Muchos γ -glutamilo derivados pueden actuar como donadores del mismo, en las reacciones catalizadas por esta enzima.



Método:

Preparar el reactivo GGT, consistente en:

- Tampón Tris-HCl (0,1 M); pH 8,2.
- γ -glutamilo-3-carboxi-4-nitroanilida (2,9 mM).
- glicil-glicina (100 mM).

Mezclar en un tubo 900 μ l de reactivo GGT con 100 μ l del homogeneizado fresco. Incubar a 37°C durante 15 minutos en un baño de agitación, y detener posteriormente la reacción añadiendo 1 ml de ácido acético (4 N), momento en el cual se produjo un cambio de color.

A continuación los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 2.000 xg. La p-nitroanilina producida en la reacción es directamente proporcional a la cantidad de p-nitroanilida liberada por unidad de tiempo y presenta un máximo de absorbancia a 410 nm, con un coeficiente de extinción molar, a esta longitud de onda, de 8,8 mM⁻¹cm⁻¹. La actividad γ -glutamilo transpeptidasa se expresa en nmol de p-nitroanilina liberada/mg de proteína.min.

3.8.2.10. ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)

Fundamento:

Se determinó utilizando la reacción del glutatión con 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) (Habig y cols., 1974), un sustrato de amplio espectro para la actividad catalítica de todas las isoformas de GST.

Método:

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml, los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato sódico (0,2 M); pH 6,5.
- CDMB (20 mM).
- GSH (20 mM).

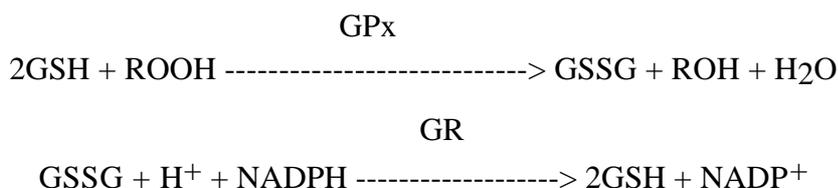
Dicha mezcla se incubó a 25°C durante 3 minutos y posteriormente se añadió la muestra (fracción citosólica), y se monitorizó el incremento de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos.

La actividad glutatión S-transferasa se calculó considerando el coeficiente de extinción molar del CDNB de $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores se expresaron en nmol de CDNB formados/mg de proteína.min.

3.8.2.11. ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA SELENIO DEPENDIENTE (GPX SE DEP.)

Fundamento:

Se determinó mediante el método de Guntzler y Flohé (1985). La determinación espectrofotométrica de la actividad glutatión peroxidasa conlleva la medida de la oxidación de NADPH por la glutatión reductasa. Dicha oxidación se registra espectrofotométricamente a 340 nm.



Método:

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 800 μl los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato potásico (0,1 M); pH 7,0.
- Muestra enzimática (fracción citosólica).
- Glutatión reductasa (2U).
- GSH (40 mM).
- NaN_3 (20 mM)
- NADPH (2,4 mM).

Se determinó el descenso de la absorbancia a 340 nm, provocada por el consumo de NADPH no dependiente del hidroperóxido, incubando la muestra durante 5 minutos a 25°C. Posteriormente, se añadieron 100 μl de la solución de peróxido de hidrógeno 2 mM y se registró nuevamente la disminución de la absorbancia a la misma longitud de onda.

Para determinar la actividad glutatión peroxidasa se utilizó un coeficiente de extinción molar del NADP^+ de $6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad glutatión peroxidasa selenio dependiente se expresó en nmol de NADP^+ formados/mg de proteína.min.

3.8.2.12. ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA SELENIO INDEPENDIENTE (GPX SE INDEP.)

El procedimiento a seguir es el mismo que para la actividad glutatión peroxidasa selenio dependiente descrita en el apartado anterior, salvo que se utilizó hidroperóxido de cumeno como sustrato del enzima en lugar de peróxido de hidrógeno. Se determinó la disminución de la absorbancia a 340 nm provocada por el consumo de NADPH no dependiente del hidroperóxido.

Se incubó la mezcla durante 5 minutos a 25°C y posteriormente se añadieron 100 µl de la solución de hidroperóxido de cumeno (15 mM) registrando el descenso de la absorbancia a la misma longitud de onda que para la actividad anterior.

Para el cálculo de la actividad glutatión peroxidasa se utilizó un coeficiente de extinción molar del NADP⁺ de 6,2 mM⁻¹cm⁻¹. Los valores se expresaron en nmol de NADP⁺ formados/mg de proteína.min.

Por este procedimiento se calculó la actividad glutatión peroxidasa total y mediante la diferencia con la actividad selenio dependiente, medida con anterioridad, obtuvimos el valor de la forma selenio independiente.

3.8.2.13. CONCENTRACIÓN DE PRODUCTOS DE REACCIÓN DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Fundamento:

Se realizó una determinación de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) según el método descrito por Wills (1987), con ligeras modificaciones. Se determinó la magnitud de peroxidación lipídica mediante la cuantificación de los aldehídos formados por degradación de los hidroperóxidos, incluyendo el malondialdehído que se utilizó como estándar.

Método:

Se incubó, durante 30 minutos a 90°C, la siguiente mezcla reactiva:

- 1 ml de homogeneizado fresco (1g de hígado + 5 ml de tampón fosfato potásico 0,1M; pH 7,4).

- 2 ml de una solución de: ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido clorhídrico (0,25 N).

Se enfrió en hielo, y se centrifugó a 2.000 xg durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm. Para la reali-

zación del blanco se sustituyó la muestra por tampón fosfato (0,1 M; pH 7,4). Para el cálculo de la concentración de malondialdehído se utilizó un coeficiente de extinción molar de $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en nmol de aldehído formados/mg de proteína.

3.8.2.14. DETERMINACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS (DCF)

Fundamento:

Se realizó una determinación de hidroperóxidos según el método de la diclorofluoresceína descrito por Cathcart y cols. (1983). Se basa en la oxidación de la diclorofluorescina a su forma fluorescente, diclorofluoresceína (DCF), en presencia de H_2O_2 y de hematina.

Método:

Partimos de una mezcla de 200 μl de muestra (homogeneizado fresco) y 2,9 ml de un reactivo que contiene:

- Hematina (1 mg/100 ml de tampón fosfato sódico 25 mM; pH 7,2).
- NaOH (0,01 N).
- DCF (1 mM) en etanol.

Se incubó a 50°C durante 50 minutos bajo atmósfera de argón. Tras la incubación se enfriaron los tubos en agua con hielo y se determinó la fluorescencia a 470 nm de excitación y 550 nm de emisión. Para el cálculo de los resultados se realizó una recta patrón con distintas concentraciones de una solución de hidroperóxido de cumeno (de 0,4 a 4 μM), expresándose los resultados como pmol de DCF formados/mg de proteína.

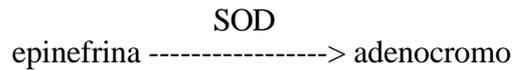
3.8.2.15. ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Fundamento:

Se determinó por el método de Mirsa y Fridovich (1972) que se basa en la inhibición por la superóxido dismutasa (SOD) de la formación de adenocromo en la autooxidación de la epinefrina. La formación de adenocromo está mediada por radicales superóxido, catalizando la superóxido dismutasa la disminución de este radical de acuerdo a la siguiente reacción:



La epinefrina permanece estable en soluciones ácidas, pero espontáneamente se oxida en soluciones básicas, favoreciendo la formación de adenocromo. Basándose en este fenómeno, la SOD se puede medir espectrofotométricamente siguiendo el cambio de absorbancia de la epinefrina a 480 nm, donde presenta un pico de absorción.

*Método:*

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml los siguientes reactivos:

- Tampón bicarbonato sódico (0,05 M); pH 10,2.
- Muestra (fracción citosólica).
- Epinefrina (4 mM).

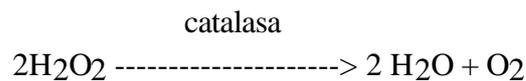
Se midió la absorbancia a 480 nm y a 30°C.

Se elaboró una recta patrón con concentraciones crecientes de SOD (20 a 100 nM) para determinar a qué concentración de la misma se producía la inhibición de la autooxidación de la epinefrina en un 50%. Los resultados se expresaron en U de SOD/mg de proteína. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que es capaz de inhibir el 50% de la autooxidación de la epinefrina.

3.8.2.16. ACTIVIDAD CATALASA (CAT)*Fundamento:*

La actividad catalasa se determinó por el método de Chance y Machley (1955).

La catalasa cataliza la ruptura del peróxido de hidrógeno de acuerdo con la siguiente reacción:



La velocidad de descomposición del H₂O₂ se mide espectrofotométricamente a 230 nm, ya que el H₂O₂ tiene el máximo de absorbancia a esta longitud de onda.

Método:

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 980 µl los siguientes reactivos:

- Tampón Tris/HCl (1M), EDTA (5 mM); pH 8,0.
- H₂O₂ (10 mM).

Esta mezcla se agitó e incubó a 37°C durante 10 minutos; transcurrido este período de tiempo se le añadió etanol absoluto y muestra (fracción citosólica). A continuación se midió la absorbancia a 230 nm durante 4 minutos a 37 °C.

Para el cálculo de la actividad catalasa se utilizó un coeficiente de extinción molar del H_2O_2 de $0,071 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ de proteína.min.

3.8.2.17. ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

Fundamento:

Se determinó por el método de Pinto y cols. (1984). La glutatión reductasa es una flavoproteína que cataliza la reducción del disulfuro de glutatión (GSSG) en presencia de NADPH. La oxidación de NADPH es seguida espectrofotométricamente a 340 nm.



Método:

La mezcla reactiva contiene:

- Tampón fosfato potásico (0,2 M), EDTA (2mM); pH 7,0.
- GSSG (20 mM).
- NADPH (2mM) en tampón Tris-HCl (10 mM); pH 7,0.
- H_2O destilada.
- Muestra enzimática (fracción citosólica).

Se determinó el descenso de la absorbancia del NADPH a 340 nm, a una temperatura de 30°C , durante 5 minutos. La actividad glutatión reductasa se calculó considerando un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $7,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores se expresaron en nmol de NADP^+ formados/ mg de proteína.min.

3.8.2.18. CITOCROMO P-450

Fundamento:

Se siguió el procedimiento descrito por Omura y Sato (1964). El principio de la determinación espectrofotométrica del citocromo P-450 microsómico se basa en que la hemoproteína reducida, combinada con monóxido de carbono, presenta un espectro de absorción característico con un máximo a los 450 nm.

Método:

Se diluyó la fracción microsómica en tampón fosfato potásico (0,2 M; pH 7,4), repartiéndola en dos cubetas de espectrofotómetro, añadiendo seguidamente trazas de

ditionita sódica y mezclando por inversión. Posteriormente se realizó un barrido de espectro entre 400 y 500 nm para establecer la línea base del aparato.

En una de las cubetas se burbujearon, en campana de extracción, de 30 a 40 burbujas de monóxido de carbono (1 burbuja/sg), procediendo inmediatamente a realizar un barrido de espectro entre 450 y 490 nm en un espectrofotómetro de doble haz, tomando como valor el resultado de restar el máximo de absorbancia a 450 nm y el mínimo de absorbancia a 490 nm. La concentración de citocromo P-450 de la muestra se calculó considerando el coeficiente de extinción del citocromo P-450 de $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y se expresó en nmol de citocromo P-450/mg de proteína.

3.8.2.19. ACTIVIDAD NADPH-CITOCROMO C (P-450) REDUCTASA

Fundamento:

Se determinó por el método de Peterson y cols. (1978). El citocromo c (P-450) oxidado (férrico) pasa a su forma reducida (ferroso) como consecuencia de la actividad enzimática de la NADPH-citocromo c reductasa (EC 1.6.2.4.). El citocromo c reducido resultante presenta un máximo característico de absorbancia a 550 nm que, sin embargo, no se observa en su forma oxidada.

Método:

Añadir inicialmente a dos cubetas de espectrofotómetro (una de referencia y otra para la prueba):

- 1 ml de citocromo c (0,125 mM).
- 0,2 ml de KCN (15 mM).
- 0,1 ml de fracción microsómica.
- Tampón fosfato sódico (0,1 M); pH 7,6. (Completando a un volumen final de 2,5 ml para la cubeta de referencia y de 2,4 ml para la cubeta prueba).

La reacción se inició cuando, tras 3 minutos de incubación a 37°C , se añadió 0,1 ml de NADPH (10 mM) a la cubeta prueba, procediendo inmediatamente a determinar el incremento de la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de doble haz, a una temperatura de 37°C .

La actividad NADPH-citocromo c reductasa de la muestra se calcula considerando el coeficiente de extinción del citocromo c reducido de $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores se expresan en nmol de citocromo c (P-450) reducido formados/mg de proteína.min.

3.8.2.20. ACTIVIDAD 7-ETOXICUMARINA O-DESETILASA

Fundamento:

La determinación está basada en el método de Ullrich y Weber (1972), modificado por Lake y cols. (1982). La O-desetilación de la 7-etoxicumarina da como resultado la formación de 7-hidroxycumarina, que se puede estimar por espectrofluorimetría.

Método:

La mezcla reactiva contenía:

- 150 μ l de NADP⁺ (1,5 μ moles).
- 150 μ l de ácido isocítrico (15 μ moles).
- 150 μ l de isocitrato deshidrogenasa (1U).
- 150 μ l de sulfato de magnesio (10 μ moles).
- 800 μ l de Tris/HCl (50 mM; pH 7,4) en la prueba y el blanco y 600 μ l en el estándar.
- 50 μ l de fracción microsómica.

Mezclar e incubar en un baño con agitación a 37°C, durante 5 minutos. Añadir 500 μ l de solución sustrato [7-etoxicumarina (2 mM) en Tris/HCl] sólo a los tubos prueba. Agitar e incubar otros 10 minutos. Adicionar 1 ml de sulfato de zinc (5%) y 1 ml de hidróxido de bario saturado a todos los tubos para detener la reacción. Añadir seguidamente 500 μ l de solución sustrato al blanco y a los estándares.

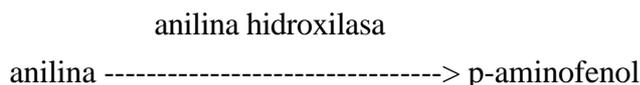
Mediante la adición de 0,1 ml de 7-hidroxycumarina (0,1 mM) a la mezcla reactiva anterior obtuvimos el estándar de la determinación.

Tras centrifugar a 2.000 xg, durante 15 minutos y a 4°C, se recogió 1 ml del sobrenadante desproteinizado y se añadieron 2 ml de tampón glicina NaOH (0,5 M; pH 10,5). Se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro a 380 nm de excitación y 452 nm de emisión. La actividad 7-etoxicumarina O-desetilasa de la muestra se expresó en nmol de 7-hidroxycumarina formados/mg de proteína.min.

3.8.2.21. ACTIVIDAD ANILINA HIDROXILASA

Fundamento:

Según el procedimiento descrito por Imai y cols. (1966), modificado por O'Brien y Rahimtula (1978). Está basado en la capacidad del p-aminofenol para acoplarse al fenol en un medio alcalino y dar un compuesto azul que presenta un máximo de absorbancia a 630 nm.



Método:

La mezcla reactiva contenía en un volumen final de 950 µl los siguientes reactivos:

- Tampón Tris-CIH (0,1 M); pH 7,5.
- Fracción microsómica (3 mg de proteína).
- Solución de hidrocloreuro de anilina (5 mM).

Después de incubar un minuto a 37°C, añadir 50 µl de hidroperóxido de cumeno (1,5 mM), para comenzar la reacción. Agitar durante 2 minutos y añadir 150 µl de ácido tricloroacético (70%) para detener la reacción.

Se centrifugó la mezcla para eliminar la proteína desnaturalizada (2.000 xg durante 10 minutos), recogiendo 1 ml de sobrenadante, que añadimos a 1 ml de solución de carbonato sódico (1 M). Se añadió, tras agitar, 1 ml de solución de fenol (2% en hidróxido sódico 0,5 M). Tras incubar 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 630 nm.

La actividad anilina hidroxilasa se calculó mediante la realización de una recta patrón con concentraciones crecientes de p-aminofenol (de 0,025 a 0,2 mM), expresando los resultados en nanomoles de p-aminofenol formados/mg de proteína.min.

3.8.2.22. ACTIVIDAD AMINOPIRINA N-DESMETILASA

Fundamento:

La actividad aminopirina N-desmetilasa se determinó por el método descrito por Nash (1953), que consiste en la estimación de la producción de formaldehído usando el reactivo de Nash.

Método:

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml, los siguientes reactivos:

- Glucosa-6-fosfato (50 mM).
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (4U/muestra).
- MgCl₂ (5 mM).
- Nicotinamida (25 mM).
- Semicarbazida (50 mM).
- Aminopirina (10 mM).

- Fracción microsómica.
- Tampón Tris-ClH (50 mM); pH 7,5.
- NADPH (0,5 mM).

La reacción comenzó al añadir el NADPH a la mezcla reactiva, procediendo a incubar durante 45 minutos, a 37°C. La reacción se detuvo por adición de 0,25 ml de ZnSO₄ (25%) y 0,25 ml de Ba(OH)₂ saturado. La mezcla se centrifugó a 2.000 xg durante 5 minutos, recogiendo 0,75 ml de sobrenadante y añadiéndolos a 0,75 ml de reactivo de Nash (0,16 ml de acetilacetona en 20 ml de acetato amónico 4 M). Se incubó a 60°C durante 30 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 415 nm.

El cálculo de la actividad aminopirina N-desmetilasa se realizó mediante una recta patrón determinada con soluciones crecientes de formaldehído desde 0,05 a 1 mM. Los resultados se expresaron en pmol de formaldehído formados/mg de proteína.min.

3.8.2.23. ACTIVIDAD ERITROMICINA N-DESMETILASA

Fundamento:

La actividad eritromicina N-desmetilasa se determinó por el método descrito por Nash (1953), que consiste en la estimación de la producción de formaldehído utilizando el reactivo de Nash.

Método:

La mezcla reactiva contenía los siguientes reactivos:

- 300 µl de tampón fosfato potásico (0,1 M); pH 7,4.
- 100 µl de EDTA (0,05 mM).
- 100 µl de fracción microsómica.
- 100 µl de eritromicina (0,6 mM).

Tras incubar la mezcla a 37°C durante 5 minutos, se añadieron los siguientes reactivos:

- 100 µl de MgCl₂ (0,5 mM).
- 100 µl de NADP⁺ (0,5 mM).
- 100 µl de Glucosa 6-fosfato (5 mM).
- 100 µl de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (1U/ muestra).

Tras incubar la mezcla a 37°C durante 15 minutos, la reacción se detuvo adicionando 0,1 ml de ácido tricloroacético al 10 %, centrifugando posteriormente durante 5 minutos a

2.000 xg y a 4°C. A 0,5 ml del sobrenadante obtenido se le añadieron 0,5 ml del reactivo de Nash (0,16 ml de acetilacetona en 20 ml de acetato amónico 4 M), agitando e incubando la mezcla a 60°C durante 30 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia del cromóforo a 415 nm.

El cálculo de la actividad eritromicina N-desmetilasa se realizó mediante una recta patrón determinada con soluciones crecientes de formaldehído desde 0,05 a 1 mM. Los resultados se expresaron en nmol de formaldehído formados/ mg de proteína.min.

3.8.2.24. ACTIVIDAD COLESTEROL 7 α -HIDROXILASA

Fundamento:

Se determinó según el método de Hylemon y cols. (1989), con algunas modificaciones. Se utilizó un método espectrofotométrico por HPLC en fase reversa, valorando la cantidad de 7 -hidroxicolesterol formado después de la conversión enzimática del 7 - hidroxil-4-colesten-3-ona por la actividad de la colesterol oxidasa. Como estándar interno se usó 7 - hidroxicolesterol.

Método:

Se procedió a añadir 1 mg de proteína microsómica a 0,75 ml de la siguiente mezcla de reacción:

- Tampón fosfato potásico (0,1 M; pH 7,4) conteniendo:
- NaF (50 mM).
- DTT (5 mM).
- EDTA (1 mM).
- Glicerol al 20%.
- CHAPS al 0,015%.

Se incubó durante 5 minutos a 37°C, añadiéndose posteriormente 0,25 ml de un sistema regenerante que contenía:

- NADPH (0,5 mM).
- MgCl₂ (5 mM).
- Isocitrato sódico (5 mM).
- Isocitrato deshidrogenasa (0,075 U).

La mezcla de reacción, con un volumen final de 1 ml, se incubó durante 20 minutos a 37°C en un baño con agitación fuerte. Pasado ese tiempo, se adicionó 15 μ l de colato sódico al

20% y 1 µl de 7 α -hidroxicolesterol, que se utilizó como estándar interno. La reacción se inició al adicionar 5 µl de colesterol oxidasa al 1%. La mezcla de reacción se incubó 15 minutos a 37°C, deteniéndose la reacción transcurrido este tiempo al añadirse 2 ml de etanol al 95%.

La extracción de los metabolitos del colesterol (7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona y 4-colesten-3-ona) de la mezcla de reacción se realizó adicionando 5 ml de éter de petróleo. Se incubó durante 10 minutos a 37°C y, finalmente, se centrifugó la mezcla a 2.000 xg durante 3 minutos. Esta operación de extracción se repitió tres veces.

Recogida la fase etérea, se desecó bajo atmósfera de nitrógeno a 40 °C. El extracto se resuspendió en 0,1 ml de cloroformo-metanol (1:1) y se analizó mediante HPLC. Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

- *Columna:* de fase reversa C-18 (Merck, Lichrosorb, RP-18), con un diámetro de poro de 10 µm.

- *Fase móvil:* constituida por una solución de acetonitrilo, metanol y agua (75:15:10).

- *El flujo:* se estableció inicialmente en 0,80 ml/min, incrementándose a los 30 minutos a 2 ml/min durante 20 minutos.

- *Longitud de onda:* La cantidad de producto formado se cuantificó por su absorbancia a 240 nm, operando el detector de ultravioleta a 0,10 AUFS (unidades de absorbancia).

Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta de regresión de las recuperaciones de 5 muestras con 5 concentraciones diferentes de 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, y colesterol, previamente transformados en sus correspondientes 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona, 7 β -hidroxi-4-colesten-3-ona y 4-colesten-3-ona.

Los resultados obtenidos en las muestras problema se extrapolaron a esta recta patrón, obteniéndose directamente sus concentraciones, que se expresaron en nmol de 7 α -hidroxicolesterol formados/mg de proteína.min.

3.8.2.25. FLUIDEZ DE LA MEMBRANA MICROSÓMICA

Fundamento:

Se determinó por el método de Shinitzky y Barenholz (1978), consistente en la estimación de la polarización de la fluorescencia del 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) incluido en el núcleo hidrofóbico de la membrana microsómica, mediante un espectrofluorímetro a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 432 nm. La fluidez de la membrana

microsómica se expresó como polaridad, que es el valor inverso de la misma y se calcula según la razón:

$$P=(I_p-I_t)/(I_p+I_t)$$

Siendo I_p e I_t las intensidades de fluorescencia paralela y perpendicular a la luz de excitación, respectivamente.

Método:

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 2 ml los siguientes reactivos:

- Fracción microsómica previamente diluida en el tampón de dicha fracción.
- DPH (50 μ M).

La mezcla se agitó durante dos horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se midió la polaridad con agitación y a 25°C.

3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la expresión de los resultados se calculó la media y el error estándar de la media (EEM). La significación de la diferencia entre las medias de los diferentes grupos se calculó por aplicación del test ANOVA y seguidamente por el test de Newman-Keuls. Los estudios de regresión se llevaron a cabo por el método de los mínimos cuadrados.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa Statistica 4.5 para Windows (Statsoft, Tula, USA).

4. RESULTADOS

4.1. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE DIVERSOS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

La presencia de dicroceliosis subclínica se confirmó por el descubrimiento de huevos del parásito en las heces de los animales a partir de la octava semana postinfección (49-57 d.p.i.), los resultados de las actividades enzimáticas plasmáticas y los hallazgos macroscópicos e histopatológicos. Se observó un incremento progresivo del número de huevos por gramo de heces al avanzar el período postinfección (80 d.p.i.: 282 ± 44 hpg; 120 d.p.i.: 545 ± 46 hpg). La recuperación media de formas adultas del parásito, del hígado, los conductos biliares y la vesícula biliar fue de 17 ± 2 vermes/criceto.

En la Tabla I se muestran los efectos de la dicroceliosis sobre el incremento de peso corporal diario, el peso hepático y la relación hepatosomática. Los pesos corporales se determinaron antes de la anestesia y los pesos hepáticos después del sacrificio de los animales al finalizar el experimento.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Incremento de peso (g/día)	$0,29 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01^*$
Peso hepático (g)	$4,20 \pm 0,09$	$3,20 \pm 0,13^*$	$4,12 \pm 0,23$
Rel. hepatosomática (%)	$3,50 \pm 0,07$	$2,70 \pm 0,08^*$	$3,60 \pm 0,10$

Tabla I. Incremento diario de peso corporal, peso hepático y relación hepatosomática en animales control y en animales infectados a los 80 y 120 d.p.i. Valores medios \pm EEM de 30-40 cricetos. * $P < 0,05$.

Como puede observarse, la ganancia de peso corporal diaria, expresada en gramos/día, fue significativamente inferior en el grupo de animales afectados de dicroceliosis a los 120 d.p.i. respecto al grupo control (-45%), siendo especialmente manifiesta la disminución en la evolución del peso corporal a medida que avanza el período desde la infección (Figura 1).

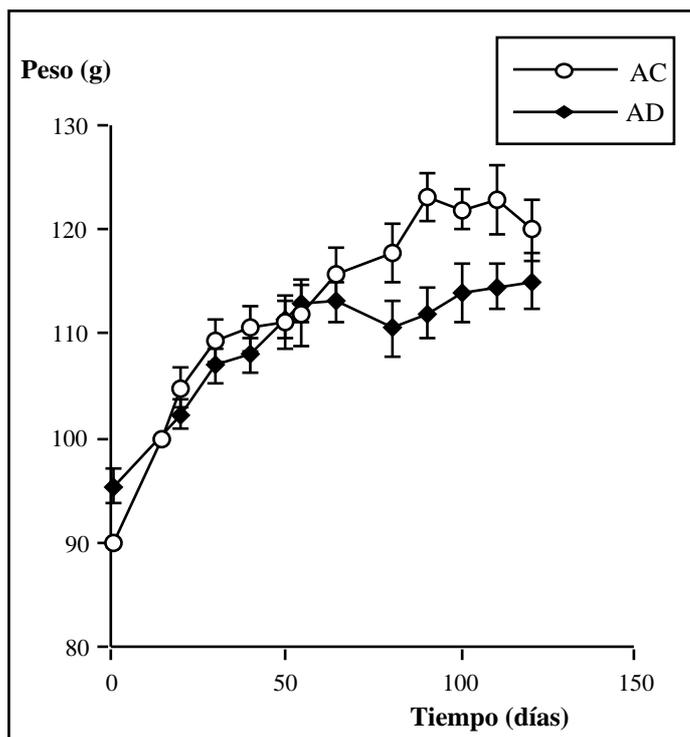


Figura 1. Evolución del peso corporal en el tiempo en animales control (AC) y en animales infectados (AD), desde el momento de la infección hasta los 120 d.p.i. Valores medios \pm EEM de 30-40 cricetos.

El peso hepático y la relación hepatosomática disminuyeron significativamente en los cricetos infectados a los 80 d.p.i. respecto a los cricetos control (-24% y -23%, respectivamente), recuperando a los 120 d.p.i. los valores mostrados por los cricetos control.

Respecto a los hallazgos observados tras el estudio macroscópico, las alteraciones observadas en el hígado y en la vesícula biliar fueron similares en los animales infectados a los 80 y 120 d.p.i., si bien se comprobó la existencia de cierta relación entre la cronicidad del proceso y una mayor intensidad de las mismas. Los conductos biliares extrahepáticos, hepático, cístico y colédoco aparecían engrosados y ectásicos. Concretamente, el conducto hepático, a diferencia de lo observado en los cricetos control, destacaba sobre la superficie visceral del lóbulo izquierdo lateral (Foto. 1). En todos los animales infectados se comprobó la repleción de la vesícula biliar, al contener abundante secreción y, en ocasiones, parásitos adultos (Foto. 1). El hígado, en general, aparecía aumentado de tamaño, observándose en numerosos animales áreas amarillentas, a veces difusas, pero más frecuentemente circunscritas a la superficie visceral de determinados lóbulos hepáticos (caudado, izquierdo lateral e izquierdo medial), a diferencia de los animales control (Foto. 2 y 3).

El estudio estructural llevado a cabo en los cricetos infectados a los 80 d.p.i. indica, como lesiones generales y más características, la existencia de colangitis y colangiectasia en los conductos biliares septales e interlobulillares, así como una hepatitis portal asociada a fibrosis. Los conductos biliares septales aparecían ectásicos con hiperplasia de su epitelio (Foto. 4 y 5). Entre dicho epitelio, cilíndrico alto, se identificaron células caliciformes aisladas, positivas con tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) y plata metenamina. En ocasiones, en la luz de

estos conductos se observaron secciones del parásito adulto (Foto. 4). Los infiltrados inflamatorios, de carácter difuso, estaban constituidos por células mononucleadas (linfocitos, macrófagos y algunas células plasmáticas) y eosinófilos. A veces, los linfocitos se disponían formando agregados (Foto. 5). Se observó, asimismo, una fibrosis periductal asociada a dichos conductos, de mayor intensidad en dos de los cricetos en los que se llevó a cabo el estudio histopatológico, como pudo comprobarse mediante el empleo de técnicas especiales (tinción tricrómico de Masson y plata metenamina) (Foto. 5).

En varios cricetos infectados a los 80 d.p.i. se comprobó la existencia de una intensa hepatitis portal, caracterizada por la presencia de abundantes linfocitos, macrófagos, algunos de ellos cargados con un pigmento pardo, positivo al PAS, y eosinófilos (Foto. 6 y 7). Asimismo, en dichos cricetos la fibrosis portal fue más acusada que en el resto de animales (Foto. 6), extendiéndose a los septos en uno de ellos (fibrosis septal). En el resto de los animales pertenecientes a este grupo la hepatitis fue leve, observándose solamente células inflamatorias dispersas. Se observó, asimismo, en aproximadamente la mitad de los animales examinados, una proliferación de los conductos biliares, destacando la presencia de numerosos conductos biliares tapizados por un epitelio cúbico bajo, localizados generalmente en las áreas porta, con la excepción de uno de los cricetos en el que se extendieron a los septos (Foto. 6 y 7). Por otra parte, en dos de los cricetos infectados a los 80 d.p.i. los sinusoides aparecieron ectásicos, conteniendo, además, en uno de ellos pequeños acúmulos focales de linfocitos y eosinófilos. En el otro animal, y en las proximidades de los espacios porta, se identificaron fibras colágenas (fibrosis perisinusoidal).

Finalmente, debemos destacar la presencia de un huevo del parásito en un espacio porta rodeado por macrófagos, formando un granuloma, hallazgo observado en un único animal, así como la existencia de una degeneración vacuolar/hidrópica multifocal en los hepatocitos de otro criceto.

Las alteraciones histopatológicas más características puestas de manifiesto en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. fueron, como en el grupo anterior, las observadas en los conductos biliares (colangitis y colangiectasia) y en los espacios porta (hepatitis y fibrosis portal), si bien fueron, en general, más intensas que a los 80 d.p.i.

En los conductos biliares septales se observaron frecuentemente parásitos adultos en su luz, así como una hiperplasia intensa del epitelio de los conductos, con zonas de pseudoestratificación e, incluso, de hiperplasia papilar, a diferencia de los animales control (Foto. 8, 9 y 10). Se observó, además, en uno de los cricetos estudiados una necrosis focal de dicho epitelio. Se identificaron también linfocitos y eosinófilos intraepiteliales, demostrándose solamente la actividad secretora en células caliciformes aisladas en el seno de dicho epitelio de los conductos biliares, mediante técnicas de PAS y plata metenamina (Foto. 10). En todos los animales infectados a los 120 d.p.i. los infiltrados inflamatorios asociados a dichos conductos fueron

intensos, observándose la existencia de agregados linfoides en muchos de ellos. Igualmente, se comprobó una intensa reacción fibrosa, no sólo alrededor de los conductos de mayor calibre, sino también relacionada con los conductos biliares interlobulillares de las áreas porta (Foto. 9).

Se comprobó la existencia de una proliferación de los conductos en los espacios porta y en los septos en dos de los cricetos estudiados.

En uno de ellos, se identificaron, además de los conductos biliares neoformados con luz angosta y tapizados por un epitelio simple cúbico, otros conductos dilatados y tapizados por un epitelio simple cúbico bajo o plano, localizados en el seno de abundante estroma conjuntivo (Foto. 11).

En tres de los cricetos infectados a los 120 d.p.i., considerados en el estudio estructural, se identificó un escaso número de granulomas, localizados en los septos (próximos a los conductos biliares septales) o en los espacios porta, organizados alrededor de huevos del parásito (Foto. 12). Dichos granulomas estaban constituidos fundamentalmente por macrófagos, los cuales se disponían alrededor de dichos huevos formando, en ocasiones, células gigantes y eosinófilos. Externamente contenían linfocitos dispersos y escasas fibras colágenas de disposición concéntrica (Foto. 13).

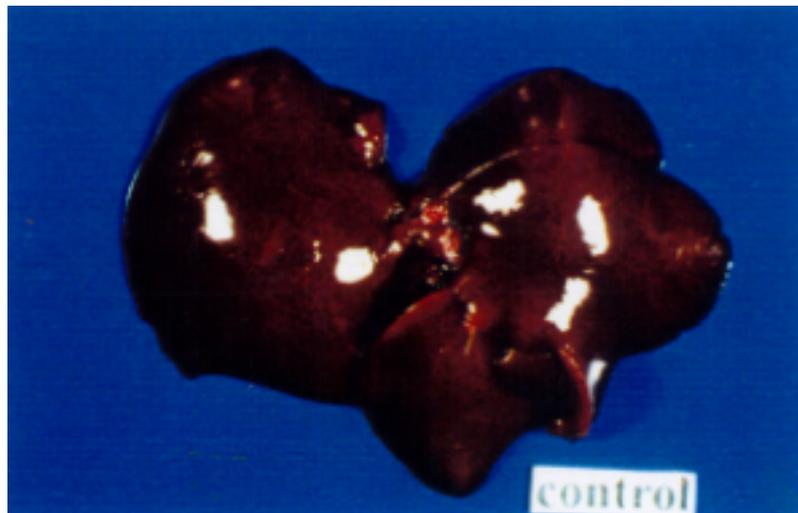
Al comparar con los cricetos control, únicamente en un animal perteneciente a dicho grupo (120 d.p.i.) se observó una degeneración vacuolar/hidrópica multifocal de los hepatocitos (Foto. 14 y 15), siendo dicho proceso degenerativo más leve en el resto de los cricetos, afectando a determinadas áreas del parénquima hepático y acompañándose, en un animal, de una infiltración grasa multifocal.

Respecto al estudio ultraestructural, en el citoplasma de los animales infectados a los 120 d.p.i. se observaron grandes acúmulos de glucógeno, formando gránulos electrodensos a modo de rosetas (partículas) que ocupaban la mayor parte de la célula a diferencia de los animales control, en los cuales dichos acúmulos eran más pequeños y con menor densidad de gránulos (Foto. 16 y 17).

Asimismo, en los hepatocitos de los animales infectados se comprobó una mayor presencia de peroxisomas con inclusiones cristalinas en su interior así como de lisosomas en forma de cuerpos homogéneos, densos (lisosomas primarios) o bien con material en digestión en su interior (lisosoma secundario) (Foto. 18 y 19). Igualmente, se observaron mitocondrias dilatadas con matriz menos densa y con crestas disminuidas en número o desintegradas (tumefacción mitocondrial) (Foto. 19). Los canalículos biliares, localizados entre hepatocitos vecinos, aparecían dilatados y carecían de microvellosidades, a diferencia de los animales control (Foto. 20 y 21).



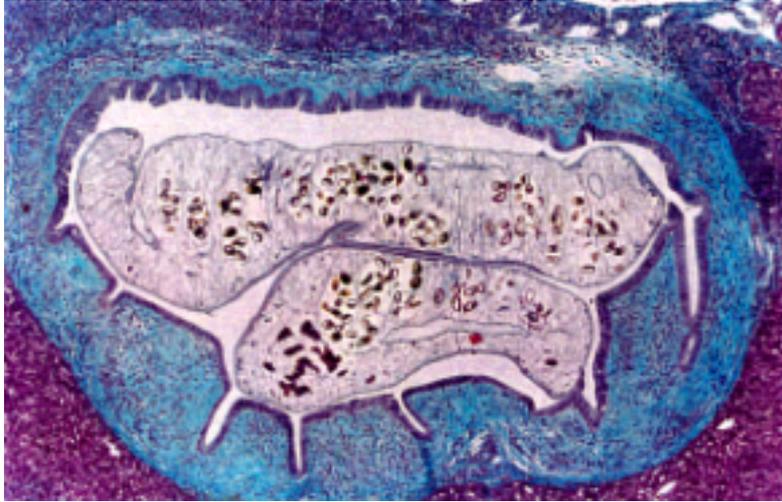
Fotografía 1.- Conductos biliares extrahepáticos dilatados en la cara visceral del hígado. Parásito adulto en el interior de la vesícula biliar. 120 d.p.i.



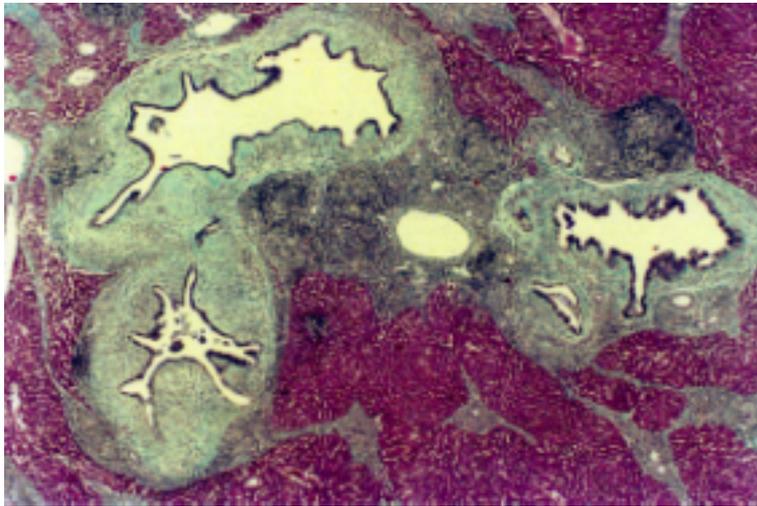
Fotografía 2.- Hígado correspondiente a un criceto control.



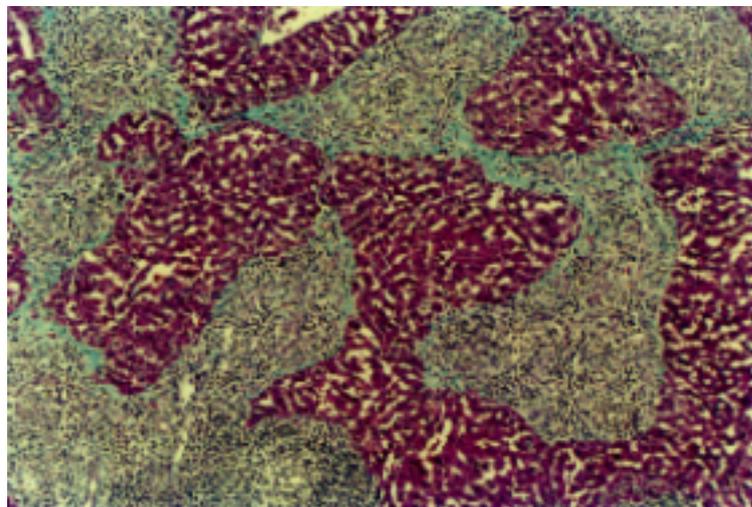
Fotografía 3.- Hígado. Áreas amarillentas en la cara visceral, preferentemente en el lóbulo izquierdo lateral. 120 d.p.i.



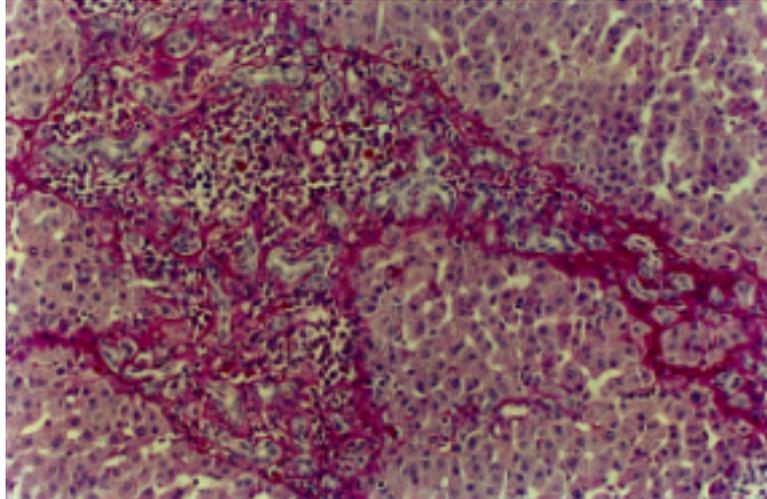
Fotografía 4.- Conducto biliar septal ectásico con parásitos en su luz. 80 d.p.i. Tricrómico de Masson-Goldner. 87x.



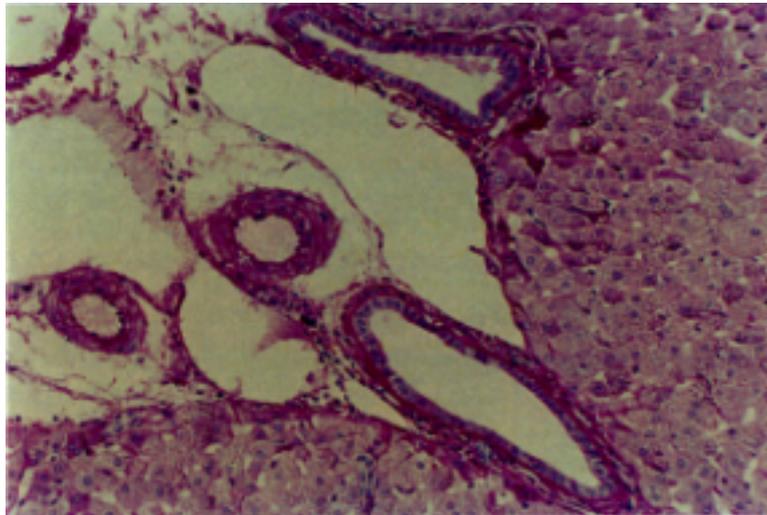
Fotografía 5.- Conductos biliares septales. Intensa reacción fibrosa y acúmulos linfoides subepiteliales. 80 d.p.i. Tricrómico de Masson-Goldner. 44x.



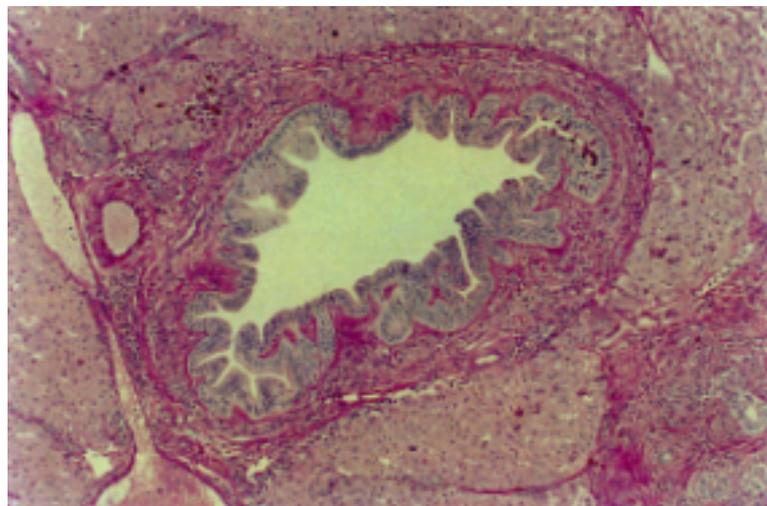
Fotografía 6.- Espacios porta. Abundantes células inflamatorias, neof ormación de conductos biliares y marcada fibrosis. 80 d.p.i. Tricrómico de Masson-Goldner. 110x.



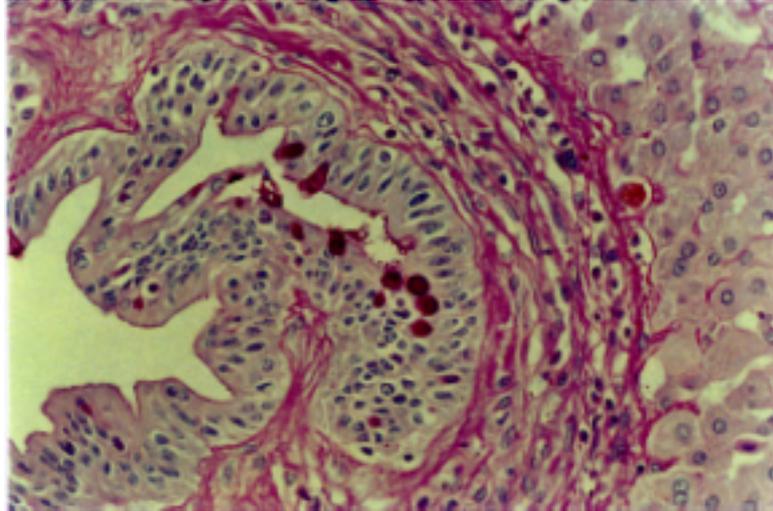
Fotografía 7.- Espacios porta. Proliferación de estructuras de los conductos biliares y macrófagos cargados con pigmento PAS positivo. 80 d.p.i. PAS. 220x.



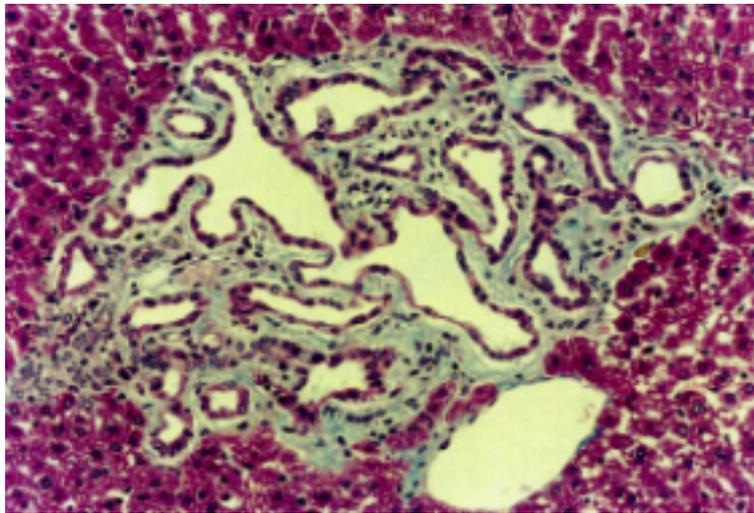
Fotografía 8.- Conductos biliares septales tapizados por un epitelio simple cúbico y rodeados por escasas fibras conjuntivas. Criceto control. PAS. 220x.



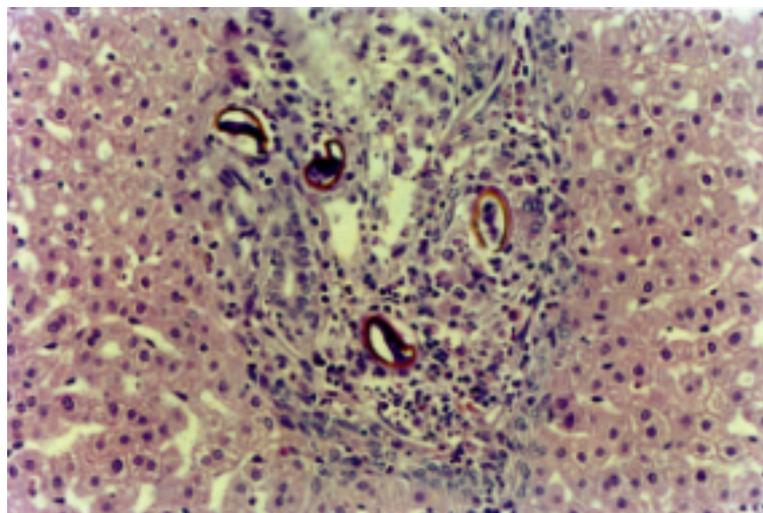
Fotografía 9.- Conducto biliar septal hiperplásico con numerosos pliegues. Fibrosis alrededor del mismo y de conductos biliares interlobulillares en el espacio porta. 120 d.p.i. PAS. 110x.



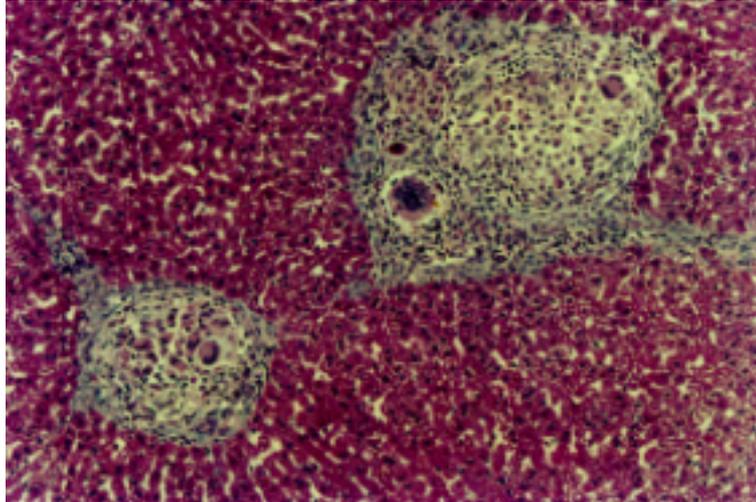
Fotografía 10.- Detalle del conducto biliar septal de la figura 9. Pseudoestratificación del epitelio de los conductos biliares y diferenciación de células caliciformes. 120 d.p.i. PAS. 440x.



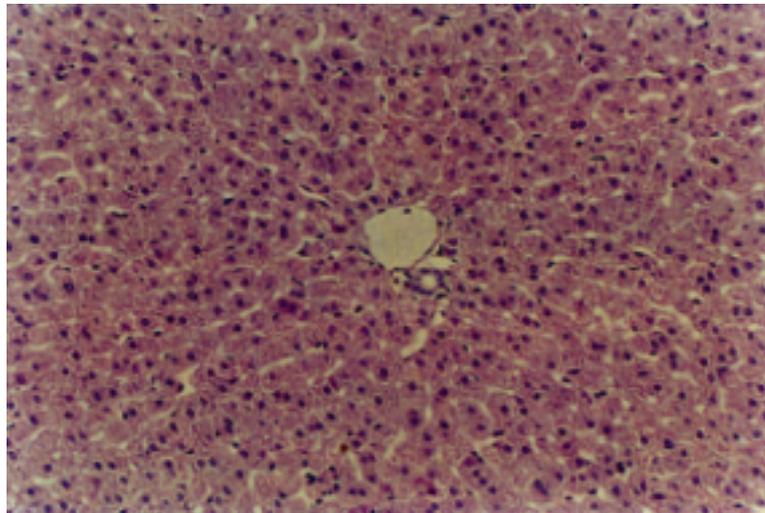
Fotografía 11.- Espacio porta. Conductos biliares neoformados ectásicos en el seno de abundante tejido conjuntivo. 120 d.p.i. Tricrómico de Masson-Goldner. 220x.



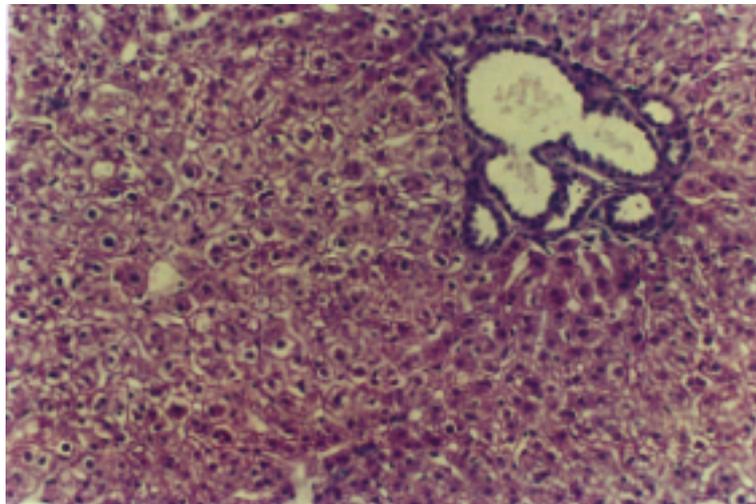
Fotografía 12.- Espacio porta. Huevos del parásito rodeados por macrófagos y eosinófilos. 120 d.p.i. H-E. 220x.



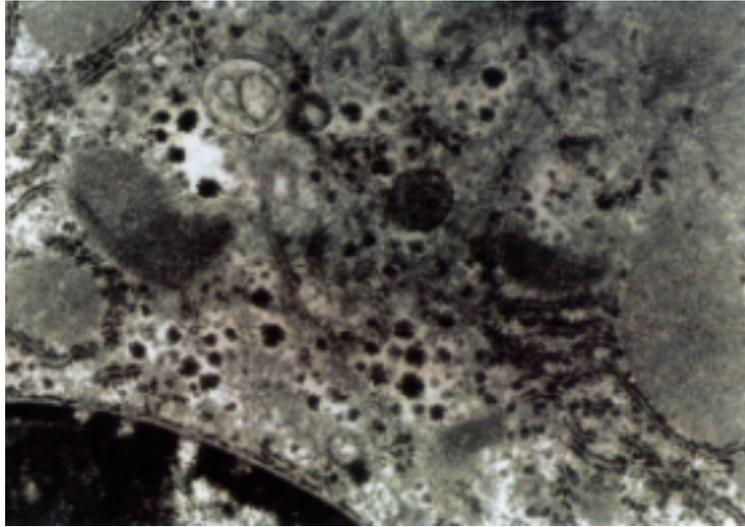
Fotografía 13.- Granulomas en espacios porta. Restos del huevo (*), macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfocitos y fibras conjuntivas. 120 d.p.i. Tricrómico de Masson-Goldner. 160x.



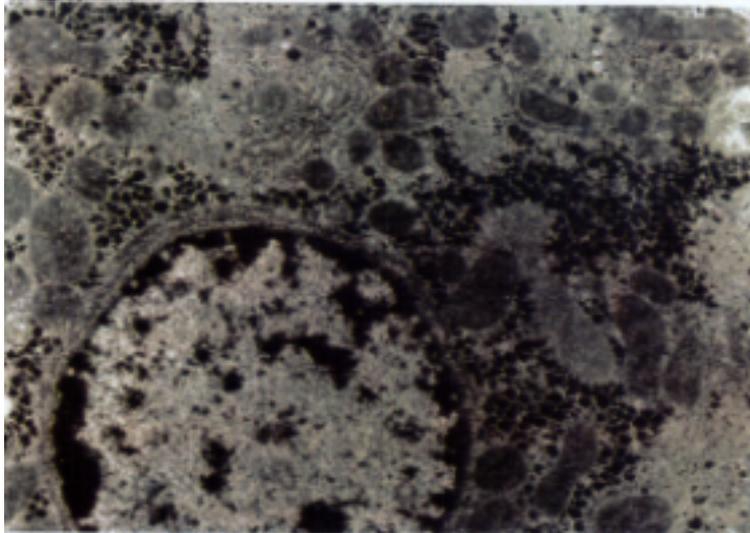
Fotografía 14.- Parénquima hepático normal. Hepatocitos, células de Kupffer y espacio porta con vena porta y conducto biliar interlobulillar. Criceto control. H-E. 220x.



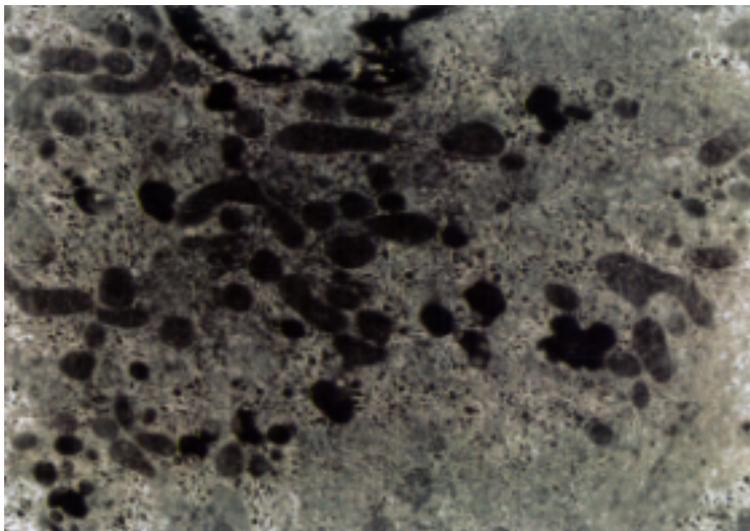
Fotografía 15.- Hepatocitos globosos con citoplasma claro (degeneración hidrópica) y espacio porta con hiperplasia y dilatación de los conductos biliares. 120 d.p.i. H-E. 220 x.



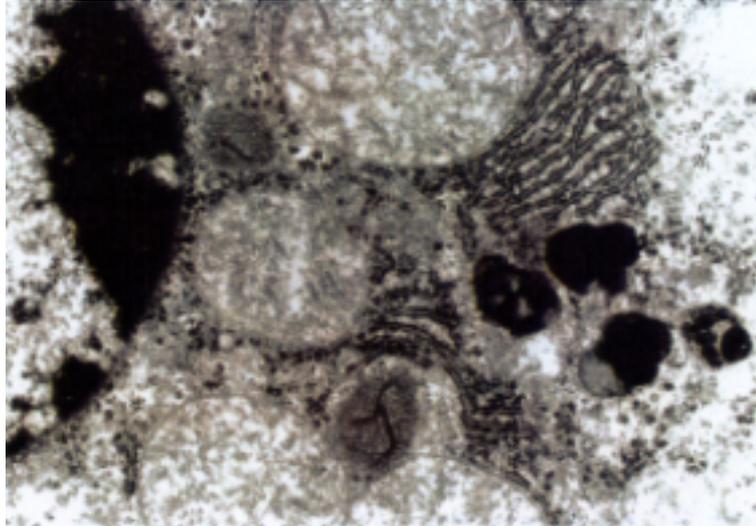
Fotografía 16.- Hepatocito. Se observan mitocondrias entre cisternas de retículo endoplásmico granular y partículas de glucógeno en forma de gránulos . Criceto control. 24.000x.



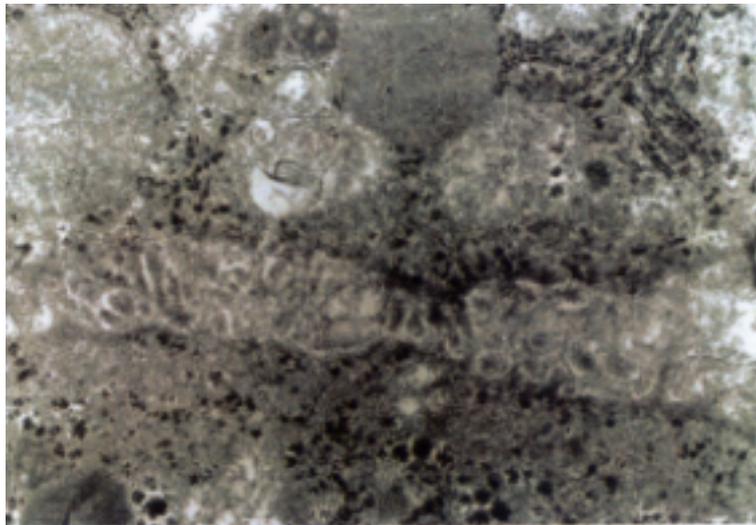
Fotografía 17.- Hepatocito. Abundantes acúmulos de partículas de glucógeno. 120 d.p.i. 12.000x.



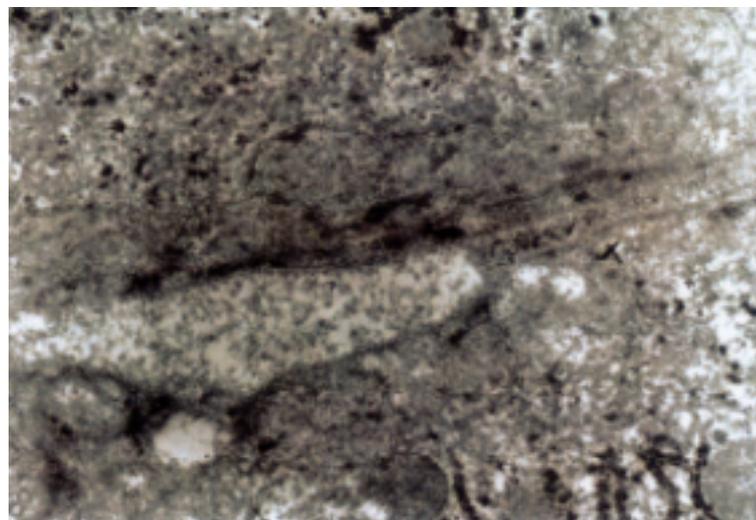
Fotografía 18 .- Hepatocito. Citoplasma ocupado por numerosos cuerpos electrodensos (lisosomas). 120 d.p.i. 8.000x.



Fotografía 19.- Detalle de un hepatocito con lisosomas secundarios, peroxisomas y tumefacción mitocondrial. 120 d.p.i. 20.000x.



Fotografía 20.- Canaliculo biliar con numerosas microvellosidades. Criceto control. 20.000x.



Fotografía 21.- Canaliculo biliar dilatado con pérdida de microvellosidades. 120 d.p.i. 20.000x.

Como se muestra en la Tabla II, las actividades de las transaminasas plasmáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) aumentaron significativamente en los animales infectados respecto a los animales control, siendo este incremento más manifiesto a los 120 d.p.i. (+500% y +250%, respectivamente) que a los 80 d.p.i. (+80% y +171%, respectivamente).

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
AST (U/l)	21,8±2,3	39,3±4,6*	130±44*
ALT (U/l)	43,9±6,7	119±25*	153±43*

Tabla II. Actividades enzimáticas plasmáticas AST y ALT en animales control y en animales infectados a los 80 y 120 d.p.i. Valores medios ± EEM de 15 cricetos. *P<0,05.

4.2. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE LOS MECANISMOS DE FORMACIÓN DE LA BILIS

En el presente apartado se recogen los datos indicativos del funcionamiento biliar en los cricetos infectados, considerando el flujo biliar así como la concentración y secreción de los solutos generadores del mismo, tanto de la fracción dependiente como de la fracción independiente de los ácidos biliares.

La Tabla III y Figura 2 muestran el flujo biliar en condiciones basales correspondiente a los grupos de cricetos infectados y a los cricetos control (experimento tipo A). El flujo biliar, que aparece expresado en relación al peso corporal y al peso hepático, fue significativamente mayor en los animales infectados a los 120 d.p.i. respecto a los animales control (+20%), sin que se modificara significativamente a los 80 d.p.i.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Flujo biliar (μ l/100g.min)	4,58±0,16	4,54±0,23	5,41±0,22*
(μ l/gh.min)	1,39±0,06	1,48±0,07	1,67±0,06*

Tabla III. Flujo biliar basal en animales control y en animales infectados a los 80 y 120 d.p.i. Valores medios ± EEM de 20-30 cricetos. *P<0,05.

Con el fin de establecer si la coleresis observada en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. tenía su origen en el canalículo y/o en los conductos biliares, se procedió al estudio comparado de la secreción biliar en dicho grupo de cricetos infectados y en los cricetos control tras la administración de manitol [14 C] (experimento tipo C).

En la tabla IV aparecen indicados los valores de la relación bilis/plasma (B/P) de manitol y de la depuración de dicho soluto, así como el flujo biliar procedente de los conductos biliares en ambos grupos.

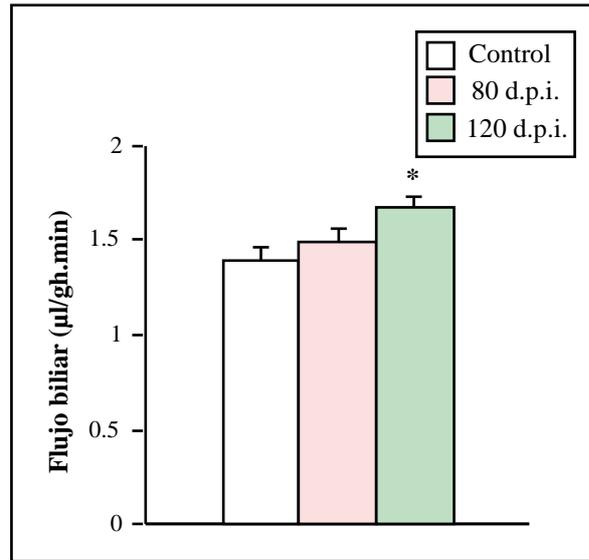


Figura 2. Flujo biliar basal en los cricetos control y en los cricetos infectados a los 80 y 120 d.p.i. (experimento tipo A). Valores medios \pm EEM de 20-30 cricetos. *P<0,05.

	Control	120 d.p.i.
B/P manitol	0,72 \pm 0,06	1,07 \pm 0,14*
Depuración manitol (µl/gh.min)	1,01 \pm 0,14	1,33 \pm 0,13*
Flujo de los conductos (µl/gh.min)	0,43 \pm 0,10	0,32 \pm 0,07

Tabla IV. Relación bilis/plasma (B/P), depuración de manitol [¹⁴C] y flujo biliar de los conductos biliares en animales control y en animales infectados a los 120 d.p.i. (experimento tipo C). Valores medios \pm EEM de 10 cricetos. *P<0,05.

La relación bilis/plasma y la depuración de manitol [¹⁴C] fueron significativamente superiores en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. (+49% y +32%, respectivamente) respecto a los cricetos control (Tabla IV, Figura 3).

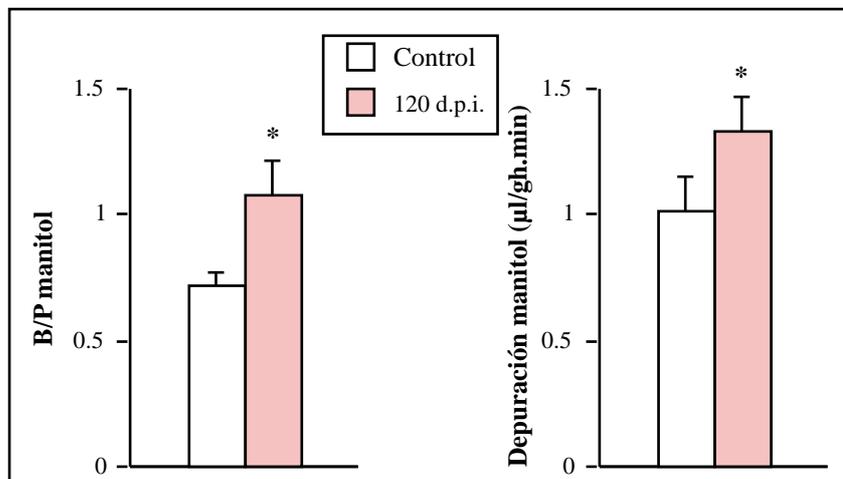


Figura 3. Relación bilis/plasma (B/P) y depuración de manitol [¹⁴C] en animales control y en animales infectados a los 120 d.p.i. (experimento tipo C). Valores medios \pm EEM de 10 cricetos. *P<0,05.

La depuración biliar de manitol representa el flujo biliar canalicular, por lo que al restar su valor del flujo biliar total obtenemos el flujo biliar originado en los conductos biliares. La contribución del flujo biliar de los conductos biliares al flujo biliar total, expresado como porcentaje, fue del 20% en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. frente al 30% observado en los cricetos control.

Descartado como origen de la coleresis la contribución del flujo biliar formado en los conductos biliares y con el fin de establecer la contribución relativa de la fracción biliar independiente de los ácidos biliares (FIAB) a la coleresis canalicular observada en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. en condiciones basales (experimento tipo A), se determinaron la concentración y la secreción biliar de glutatión total (oxidado y reducido) y de bicarbonato, solutos responsables de la formación de dicha fracción.

La Tabla V muestra los valores de dichos parámetros en la bilis de los cricetos infectados y de los cricetos control, así como la concentración y la secreción biliar de la enzima hepática γ -glutamyltranspeptidasa (GGT).

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i
Glutatión			
(mmol/l)	2,18±0,25	1,86±0,16	2,39±0,16
(nmol/100g.min)	10,4±1,1	9,65±1,22	13,6±1,4*
(nmol/gh.min)	3,07±0,31	3,41±0,42	4,11±0,46*
HCO₃⁻			
(meq/l)	45,5±4,6	34,2±2,7*	43,6±1,7
(μ eq/100g.min)	222±31	176±20	263±15
(μ eq/gh.min)	74,2±9,7	49,9±6,0*	72,1±5,0
GGT			
(mmol/l)	1,11±0,14	1,13±0,12	0,98±0,07
(nmol/100g.min)	4,13±0,41	5,30±0,72*	4,91±0,51
(nmol/gh.min)	1,23±0,14	1,99±0,32*	1,42±0,15

Tabla V. Concentración y secreción biliar de glutatión total, bicarbonato y γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) en animales control y en animales infectados (experimento tipo A). Valores medios \pm EEM de 20 cricetos. *P<0,05.

La secreción biliar basal de glutatión fue significativamente superior en los animales infectados a los 120 d.p.i. (+34%), respecto a los animales control, sin que se estimulara significativamente dicha secreción a los 80 d.p.i. (Figura 4).

Como se indica en la Tabla V, tanto la concentración como la secreción biliar basal de bicarbonato disminuyeron de forma significativa en los animales infectados a los 80 d.p.i. (-25% y -33%, respectivamente) respecto a los animales control, sin que se modificara a los 120 d.p.i. La secreción biliar de GGT aumentó significativamente en los cricetos infectados a los

80 d.p.i. (+62%) respecto a los cricetos control, no mostrando diferencias significativas a los 120 d.p.i.

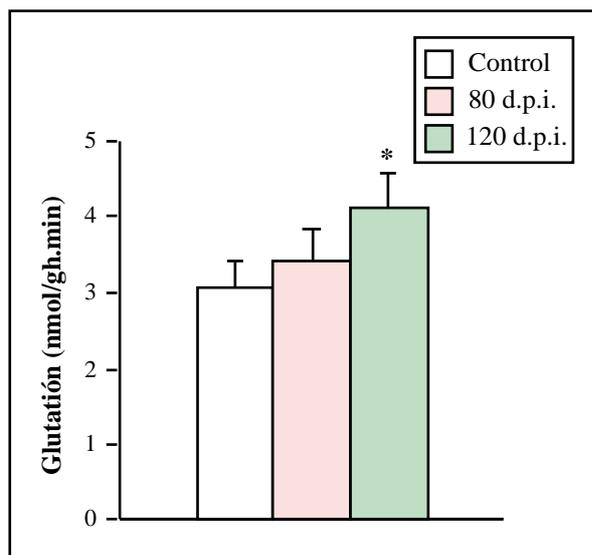


Figura 4. Secreción biliar de glutatión total en animales control y en animales infectados (experimento tipo A). Valores medios \pm EEM de 20 cricetos. * $P < 0,05$.

Respecto a la contribución de la fracción dependiente de los ácidos biliares (FDAB) al flujo biliar basal en los cricetos infectados y en los cricetos control (experimento tipo A), se determinaron la concentración y la secreción biliar de los ácidos biliares en dichos grupos (Tabla VI).

Se observó un significativo incremento en la secreción biliar basal de ácidos biliares (+59%) en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. respecto a los cricetos control, sin que se modificara significativamente a los 80 d.p.i. (Tabla VI, Figura 5).

Con el fin de establecer si el origen del incremento en la secreción de los ácidos biliares observado en los animales a los 120 d.p.i. se debía a un estímulo de su síntesis, se determinó la actividad colesterol 7 α -hidroxilasa microsómica hepática (enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis), que no resultó modificada en los cricetos parasitados ni a los 80 ni a los 120 d.p.i. ($15,2 \pm 1,3$ y $15,3 \pm 0,9$ nmol/mgp.min, respectivamente) con relación a los valores observados en los cricetos control ($14,8 \pm 1,0$ nmol/mgp.min).

En la Tabla VI y en la Figura 5 se indican, además, la concentración y la secreción biliar basal de fosfolípidos y de colesterol en los cricetos control y en los cricetos infectados a los 80 y 120 d.p.i.

La secreción biliar de fosfolípidos y de colesterol aumentó significativamente en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. (+99% y +108%, respectivamente) respecto a los cricetos control, mientras que en los animales infectados a los 80 d.p.i. dicha secreción de lípidos biliares permaneció prácticamente sin modificación respecto a controles (Tabla VI y Figura 5).

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i
Ácidos biliares			
(mmol/l)	18,8±1,6	21,9±3,2	22,6±1,6
(nmol/100g.min)	83,9±7,0	75,1±8,1	115±11*
(nmol/gh.min)	22,1±2,2	27,7±3,5	35,1±3,5*
Fosfolípidos			
(mmol/l)	1,03±0,19	1,22±0,44	1,73±0,39*
(nmol/100g.min)	5,11±0,67	3,96±0,89	9,74±1,55*
(nmol/gh.min)	1,44±0,20	1,50±0,32	2,87±0,44*
Colesterol			
(mmol/l)	0,55±0,05	0,59±0,06	0,75±0,07*
(nmol/100g.min)	2,96±0,19	2,93±0,38	5,57±,60*
(nmol/gh.min)	0,79±0,07	0,99±0,15	1,64±0,19*

Tabla VI. Concentración y secreción biliar basal de ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol en animales control y en animales infectados (experimento tipo A). Valores medios ± EEM de 15-20 cricetos. *P<0,05.

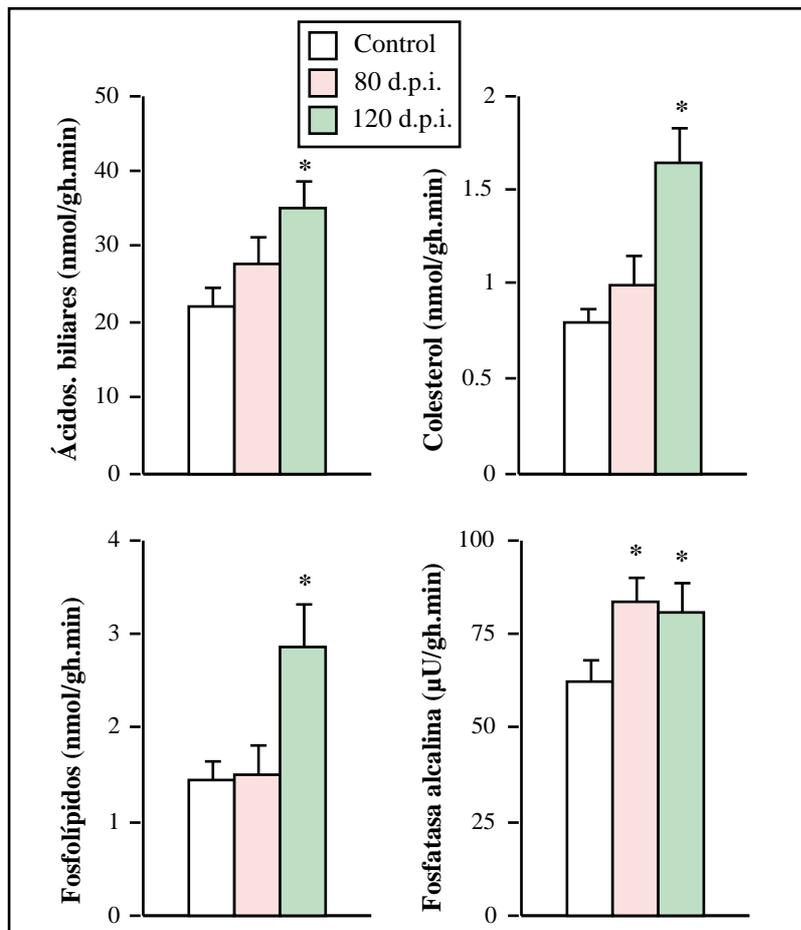


Figura 5. Secreción biliar basal de ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol y fosfatasa alcalina en animales control y en animales infectados (experimento tipo A). Valores medios ± EEM de 15-20 cricetos. *P<0,05.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Fosfatasa alcalina			
(U/l)	38,2±3,7	41,3±2,2	41,4±3,4
(μU/100g.min)	198±29	225±19	267±26*
(μU/gh.min)	62,3±5,5	83,3±6,2*	80,7±7,4*

Tabla VII. Concentración y secreción biliar basal de fosfatasa alcalina en cricetos infectados y en cricetos control. Valores medios ± EEM de 15-20 cricetos. *P<0,05.

Como se indica en la Tabla VII y en la Figura 5, la secreción biliar basal de la enzima fosfatasa alcalina se incrementó de forma significativa en los animales afectados de dicroceliosis a los 80 y 120 d.p.i. (+34% y +30%, respectivamente) en comparación con los animales control.

Mediante los resultados recogidos en las Tablas VI y VII, podemos establecer la capacidad solubilizante de los ácidos biliares sobre la secreción de los lípidos biliares y de la fosfatasa alcalina en condiciones basales. En los animales infectados a los 120 d.p.i., se observó un aumento en la secreción de fosfolípidos y de colesterol por nmol de ácidos biliares secretados (82 pmol de fosfolípidos/nmol de ácidos biliares y 47 pmol de colesterol/nmol de ácidos biliares, respectivamente) respecto a los cricetos control (65 pmol de fosfolípidos/nmol de ácidos biliares y 36 pmol de colesterol/nmol de ácidos biliares, respectivamente), sin que se modificara esta capacidad secretora de los ácidos biliares a los 80 d.p.i. (54 pmol de fosfolípidos/nmol de ácidos biliares y 36 pmol de colesterol/nmol de ácidos biliares). La secreción basal de fosfatasa alcalina respecto a la secreción de los ácidos biliares no aumentó como consecuencia de la dicroceliosis (3 μU de fosfatasa alcalina/nmol de ácidos biliares y 2,3 μU de fosfatasa alcalina/nmol de ácidos biliares en los cricetos a los 80 y 120 d.p.i., respectivamente, frente a 2,8 μU de fosfatasa alcalina/nmol de ácidos biliares en los cricetos control).

El índice litogénico de la bilis, indicativo de la saturación en colesterol de la misma, no resultó modificado como consecuencia de la dicroceliosis (80 d.p.i.: 0,80±0,11; 120 d.p.i.: 0,92±0,11), respecto a los cricetos control (0,88±0,08).

Con el fin de establecer la existencia de posibles cambios cuantitativos o cualitativos en los ácidos biliares individuales secretados en condiciones basales en los animales parasitados respecto a los animales control (experimento tipo A), se estudió el perfil biliar de dichos solutos mediante la técnica analítica de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS).

Dicha técnica permitió identificar y cuantificar en la bilis las formas libres de los ácidos biliares principales: cólico (AC), quenodesoxicólico (AQDC), desoxicólico (ADC) y litocólico (ALC), y de otros ácidos biliares menos abundantes, como aquéllos que contienen grupos ceto en su molécula.

La Tabla VIII muestra la proporción de los ácidos biliares principales en la bilis de los cricetos infectados y de los cricetos control, expresada como % respecto al total de ácidos biliares detectados mediante la técnica de GC-MS.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
AC (%)	75,2±3,7	66,1±5,5	68,5±4,0
AQDC (%)	17,1±3,4	23,7±5,4	21,3±4,4
ADC (%)	5,4±0,5	7,4±1,3*	7,2±1,0*
ALC (%)	0,59±0,09	0,44±0,06	0,52±0,10
AC+ADC/AQDC+ALC	5,31±1,38	3,71±1,11	4,10±1,01
AC+AQDC/ADC+ALC	15,8±1,7	12,7±2,4	12,2±1,6*

Tabla VIII. Perfil biliar de los ácidos biliares principales en la bilis (%) y relaciones entre la secreción biliar de los ácidos biliares pertenecientes a la familia del ácido cólico y del ácido quenodesoxicólico y entre los ácidos biliares primarios y secundarios en cricetos infectados y cricetos control. Valores medios ± EEM de 10 cricetos. *P<0,05.

Los resultados de estas determinaciones muestran que el ácido biliar mayoritario en los cricetos control y en los cricetos infectados fue el ácido cólico, seguido del ácido quenodesoxicólico, ambos ácidos biliares primarios en esta especie.

Como se indica en la Tabla VIII, se observó un aumento significativo en la proporción del ácido desoxicólico (ADC) en la bilis de los cricetos infectados a los 80 y 120 d.p.i. (+37% y +33%, respectivamente). La relación entre los ácidos biliares primarios y secundarios (AC+AQDC/ADC+ALC) disminuyó de forma significativa a los 120 d.p.i. (-23%) respecto a los cricetos control, sin que se modificaran significativamente a los 80 d.p.i. (Figura 6).

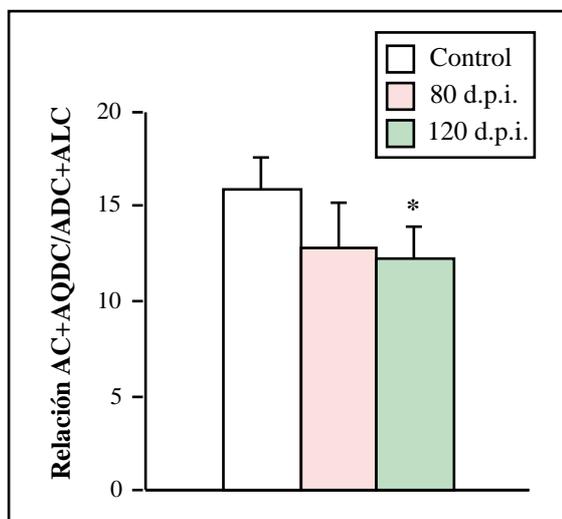


Figura 6. Relación entre la secreción biliar de los ácidos biliares primarios (AC+AQDC) y secundarios (ADC+ALC) en cricetos infectados y en cricetos control. Valores medios ± EEM de 10 cricetos. *P<0,05.

La relación entre los derivados del ácido cólico y los derivados del ácido quenodesoxicólico (AC+ADC/AQDC+ALC) no se modificó significativamente como consecuencia de la dicroceliosis.

En la Tabla IX aparece indicada la proporción de diversos ácidos biliares minoritarios presentes en la bilis de los animales infectados y de los animales control, expresada como % respecto al total de los ácidos biliares detectados por la técnica de GC-MS.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
3 , 12 - dihidroxi-5 -colanoico (%)	0,29±0,04	0,31±0,04	0,40±0,08
3 , 7 , 12 -trihidroxi-5 -colanoico (%)	0,19±0,04	0,24±0,03	0,32±0,03*
12 -hidroxi-3ceto-5 -colanoico (%)	0,22±0,06	0,64±0,30*	0,11±0,04*
3 , 12 -dihidroxi-7ceto-5 colanoico (%)	0,91±0,28	0,88±0,10	1,29±0,41
3 , 7 -dihidroxi-12ceto-5 colanoico (%)	0,03±0,02	0,16±0,06*	0,29±0,11*

Tabla IX. Perfil biliar de diversos ácidos biliares minoritarios en la bilis expresado como % del total de los ácidos biliares presentes en la misma, en los cricetos infectados y en los cricetos control. Valores medios ± EEM de 10 cricetos. *P<0,05.

La proporción del ácido biliar 3 , 7 , 12 -trihidroxi-5 -colanoico fue significativamente superior en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. respecto de los cricetos control (+68%), sin que resultara significativamente modificada a los 80 d.p.i.

La proporción del ácido biliar minoritario 3 , 12 -dihidroxi-5 -colanoico en la bilis no varió significativamente como consecuencia de la dicroceliosis.

El estudio de la secreción biliar de los ácidos biliares con un grupo ceto en el anillo esteroideo (cetoácidos biliares) en los cricetos infectados y en los cricetos control (Tabla IX, Figura 7), puso de manifiesto la existencia de un aumento significativo en la proporción del ácido 3 , 7 -dihidroxi-12-ceto-5 -colanoico en los cricetos infectados a los 80 d.p.i. (+433%) y a los 120 d.p.i. (+867%) y del ácido 12 -hidroxi-3-ceto-5 -colanoico en los cricetos infectados a los 80 d.p.i. (+191%) respecto a los cricetos control.

Si bien la proporción del cetoácido 3 , 12 -dihidroxi-7ceto-5 -colanoico se mostró aumentada en el grupo de cricetos infectados a los 120 d.p.i. respecto a los cricetos control (+42%), este incremento no fue significativo.

La proporción de cetoácidos totales se mostró aumentada, aunque no significativamente, en los animales infectados a los 80 d.p.i. (1,68±0,34%) y a los 120 d.p.i. (1,70±0,48%) respecto a los animales control (1,16±0,29%) (Figura 7).

Cuando se utilizó la técnica analítica de GC-MS, la recuperación media calculada con respecto a la determinación enzimática de los ácidos biliares totales descrita en el apartado "Metodología" fue superior en al menos un 50%, lo que podría deberse a la existencia de ácidos biliares con conjugaciones en posición C3 y a la presencia de grupos ceto en dicha posición, como se indica anteriormente, que harían indetectables dichos ácidos biliares para la técnica enzimática.

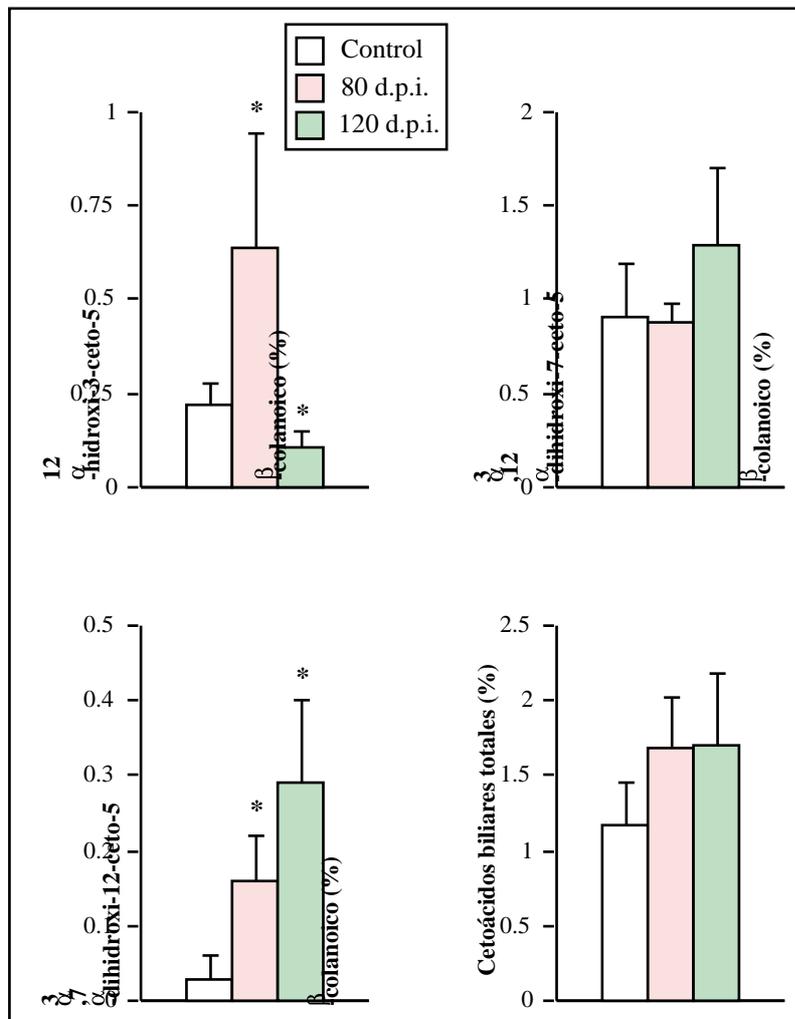


Figura 7. Perfil biliar de las especies de cetoácidos biliares detectadas en la bilis de los cricetos control y de los cricetos infectados a los 80 y 120 d.p.i. (%) y proporción de cetoácidos totales en la bilis en dichos grupos. Valores medios \pm EEM de 10 cricetos. * $P < 0,05$.

En el experimento tipo A se estableció, asimismo, la relación entre el flujo biliar y la secreción biliar de los ácidos biliares en los animales control y en los animales infectados a los 120 d.p.i. (Figura 8), grupo en el que ambos parámetros se encontraban aumentados.

Al establecer dicha relación, en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. y en los cricetos control, se obtuvieron las correspondientes rectas de regresión (control: $y = 0,0468x + 0,216$; $r^2 = 0,57$; 120 d.p.i.: $y = 0,0336x + 0,554$; $r^2 = 0,67$) (Figura 8), cuya pendiente se corresponde con la FIAB (expresada en $\mu\text{l/gh.min}$).

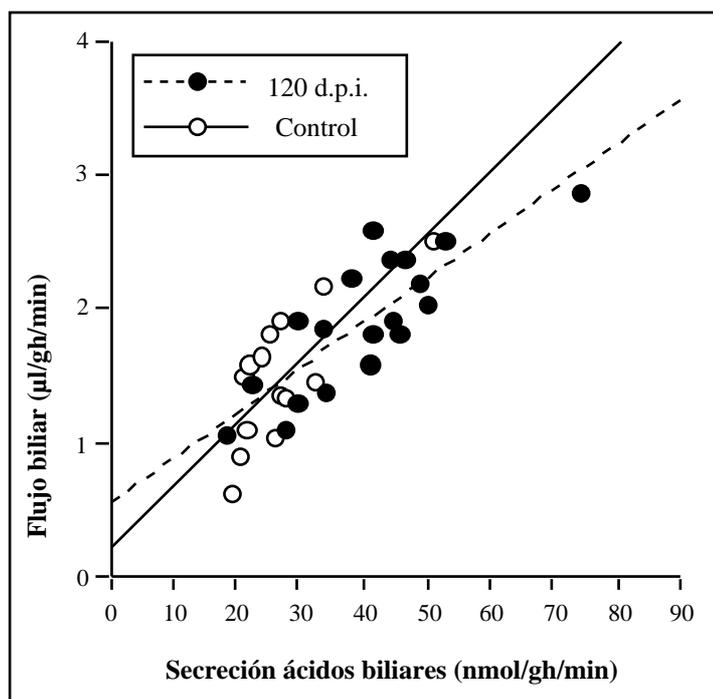


Figura 8. Relación entre el flujo biliar basal y la secreción biliar de ácidos biliares en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. y en los cricetos control (experimento tipo A).

Al restar el valor de dicha pendiente del flujo biliar total (Tabla III) se obtiene la FDAB, pudiendo establecer la contribución relativa de ambas fracciones al flujo biliar total.

La contribución de la FIAB al flujo biliar total, expresada como %, fue superior en los animales infectados (30%) respecto a los cricetos control (14%), resultando, por tanto, disminuida la contribución relativa de la FDAB al flujo biliar total en el grupo de animales infectados a los 120 d.p.i.

La coleresis de origen canalicular observada en dicho grupo tiene su origen, no obstante, tanto en un aumento de la FDAB como de la FIAB, al encontrarse estimuladas, como hemos indicado, tanto la secreción de los ácidos biliares como del glutatión, si bien parece ser mayor la contribución de éste último al aumento del flujo biliar basal observado a los 120 d.p.i.

Los resultados obtenidos en el experimento tipo B, consistente en el estudio de la función biliar tras la administración de taurocolato sódico, que estimula una coleresis de origen canalicular, a los animales control e infectados, quedan recogidos en las Tablas X y XI.

Tras la administración de taurocolato se observó un incremento del flujo biliar respecto al flujo biliar existente en condiciones basales, si bien dicho incremento fue mucho más manifiesto en los animales control (+109%) que en los animales infectados a los 80 y 120 d.p.i. (+74% y +49%, respectivamente), encontrándose el flujo biliar reducido en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. (-20%) respecto a los cricetos control (Tablas III y X) (Figura 9).

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i
Flujo biliar			
($\mu\text{l}/100\text{g}\cdot\text{min}$)	9,91 \pm 0,79	8,26 \pm 0,51*	8,12 \pm 0,33*
($\mu\text{l}/\text{gh}\cdot\text{min}$)	2,91 \pm 0,23	2,62 \pm 0,17	2,34 \pm 0,13*
Ácidos biliares			
(mmol/l)	18,8 \pm 1,6	21,9 \pm 3,2	22,6 \pm 1,6*
(nmol/100g.min)	599 \pm 22	499 \pm 19*	484 \pm 34*
(nmol/gh.min)	178 \pm 13	177 \pm 9	141 \pm 11*
Fosfolípidos			
(mmol/l)	2,10 \pm 0,20	2,21 \pm 0,45	2,50 \pm 0,09*
(nmol/100g.min)	20,6 \pm 3,7	17,3 \pm 2,4	22,0 \pm 1,0
(nmol/gh.min)	5,99 \pm 1,3	6,71 \pm 1,08	6,54 \pm 0,40
Colesterol			
(mmol/l)	0,64 \pm 0,11	0,57 \pm 0,10	0,89 \pm 0,07*
(nmol/100g.min)	6,60 \pm 1,11	6,71 \pm 1,08	7,70 \pm 0,27
(nmol/gh.min)	1,83 \pm 0,34	1,81 \pm 0,35	2,29 \pm 0,27

Tabla X. Flujo biliar, concentración y secreción biliar de ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol en animales control e infectados a los 80 y 120 d.p.i., tras la administración de taurocolato sódico (experimento tipo B). Valores medios \pm EEM de 15 cricetos. *P<0,05.

La secreción biliar de ácidos biliares fue significativamente inferior en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. (-21%) respecto a los cricetos control, sin que se modificara significativamente la secreción biliar de lípidos biliares como consecuencia de la dicroceliosis (Tabla X, Figura 10).

En los cricetos infectados a los 80 d.p.i. no se observaron diferencias significativas ni en el flujo biliar ni en la secreción biliar de los ácidos y lípidos biliares (Figuras 9 y 10).

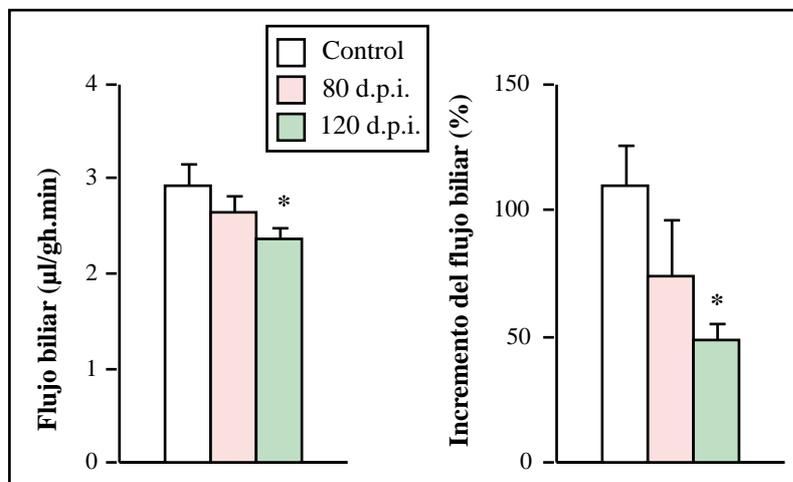


Figura 9. Flujo biliar tras la administración de taurocolato en cricetos infectados y en cricetos control (experimento tipo B) e incremento del flujo biliar respecto al flujo biliar basal (%) (experimento tipo A). Valores medios \pm EEM de 15 cricetos. *P<0,05.

La secreción biliar de fosfatasa alcalina tras la administración de taurocolato no mostró diferencias significativas entre los cricetos infectados y los cricetos control (Tabla XI y Figura 10).

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Fosfatasa alcalina			
(U/l)	36,9±2,0	42,4±3,5	51,2±4,1*
(μ U/100g.min)	426±48	363±41	474±40
(μ U/gh.min)	118±14	135±13	141±10

Tabla XI. Concentración y secreción biliar de fosfatasa alcalina tras la administración de taurocolato (experimento tipo B) en cricetos infectados y en cricetos control. Valores medios \pm EEM de 15 cricetos. *P<0,05.

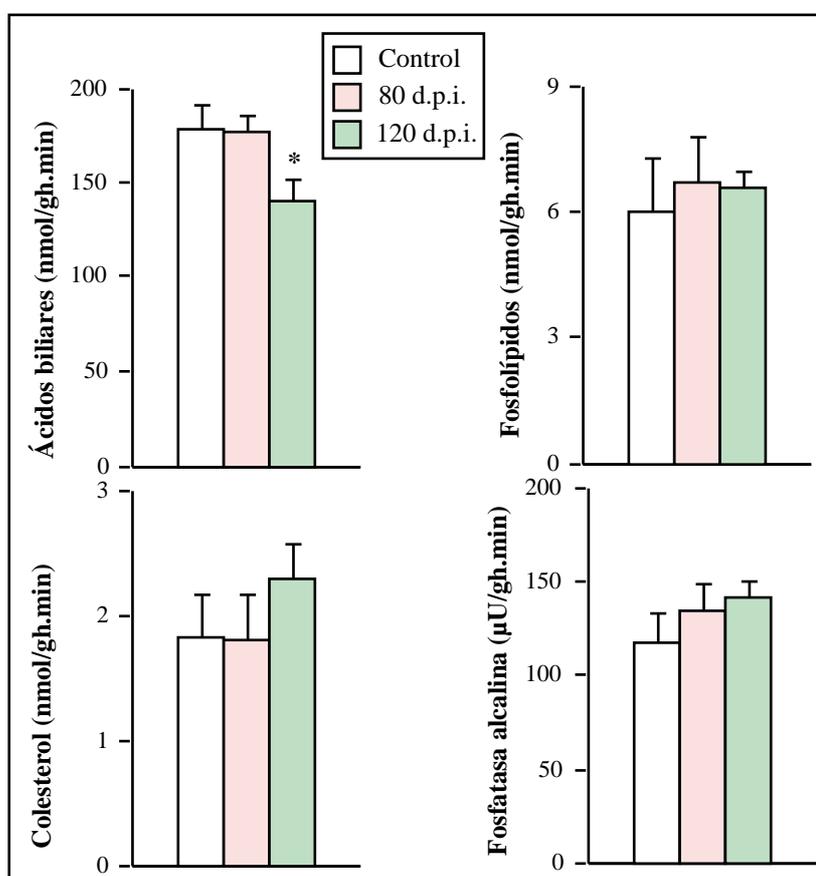


Figura 10. Secreción biliar de ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol y fosfatasa alcalina en animales control e infectados a los 80 y 120 d.p.i., tras la administración de taurocolato sódico (experimento tipo B). Valores medios \pm EEM de 15 cricetos. *P<0,05.

Como puede desprenderse de los resultados indicados en la Tabla X, tras la administración de taurocolato aumentó la capacidad solubilizante de fosfolípidos y de colesterol por los ácidos biliares en los animales infectados a los 120 d.p.i., tal como indicamos en condiciones basales (experimento tipo A).

Se observó un aumento en la secreción de los fosfolípidos y del colesterol por nmol de ácidos biliares secretados a los 120 d.p.i. (46 pmol de fosfolípidos/nmol de ácidos biliares y 16

pmol de colesterol/nmol de ácidos biliares) respecto a los cricetos control (34 pmol de fosfolípidos/nmol de ácidos biliares y 10 pmol de colesterol/nmol de ácidos biliares).

Se incrementó, asimismo, la capacidad de secretar fosfatasa alcalina por acción de los ácidos biliares a los 120 d.p.i. (1 μ U de fosfatasa alcalina/nmol de ácidos biliares) respecto a los controles (0,66 μ U de fosfatasa alcalina/ nmol de ácidos biliares), sin que dicha capacidad de secretar lípidos biliares y fosfatasa alcalina a la bilis se modificara significativamente a los 80 d.p.i. (38 pmol de fosfolípidos/nmol de ácidos biliares, 10 pmol de colesterol/nmol de ácidos biliares y 0,76 μ U de fosfatasa alcalina/nmol de ácidos biliares).

Con el fin de esclarecer el mecanismo colerético derivado del incremento de la secreción de los ácidos biliares, que se acompaña a su vez de un aumento en la secreción de lípidos biliares en los cricetos infectados a los 120 d.p.i., se administró colchicina, fármaco inhibidor de los microtúbulos, a dichos cricetos y a cricetos control (experimento tipo D). Simultáneamente se llevó a cabo el experimento tipo A con un nuevo grupo de cricetos control y cricetos infectados a los 120 d.p.i. (grupos Control N y 120 d.p.i. N).

Como aparece indicado en la Tabla XII, el incremento del flujo biliar y de la secreción biliar de ácidos y lípidos biliares en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. sin tratar (N), respecto a los cricetos control, fueron similares a lo indicado previamente en el experimento tipo A (Tablas III y VI).

	Control N	120 d.p.i. N	Control C	120 d.p.i. C
Flujo biliar				
(μ l/100g.min)	5,38 \pm 0,55	6,19 \pm 0,41	4,59 \pm 0,33	4,93 \pm 0,24 [#]
(μ l/gh.min)	1,72 \pm 0,19	1,96 \pm 0,08	1,55 \pm 0,11	1,65 \pm 0,14 [#]
Ácidos biliares				
(mmol/l)	19,8 \pm 2,0	19,6 \pm 1,7	17,2 \pm 1,5	18,7 \pm 1,6
(nmol/100g.min)	103 \pm 11	136 \pm 15*	85,1 \pm 7,0	86,9 \pm 8,2 [#]
(nmol/gh.min)	33,5 \pm 3,9	42,1 \pm 4,5*	27,4 \pm 2,4	28,5 \pm 2,5 [#]
Fosfolípidos				
(mmol/l)	1,81 \pm 0,19	1,77 \pm 0,15	1,86 \pm 0,15	1,94 \pm 0,19
(nmol/100g.min)	9,35 \pm 0,98	12,9 \pm 1,4*	8,73 \pm 0,62	9,52 \pm 0,99 [#]
(nmol/gh.min)	2,93 \pm 0,36	3,90 \pm 0,34*	2,95 \pm 0,21	3,17 \pm 0,35 [#]
Colesterol				
(mmol/l)	0,66 \pm 0,04	0,65 \pm 0,03	0,57 \pm 0,05	0,50 \pm 0,06 [#]
(nmol/100g.min)	3,21 \pm 0,39	4,65 \pm 0,39*	2,63 \pm 0,19	2,99 \pm 0,28 [#]
(nmol/gh.min)	0,99 \pm 0,11	1,44 \pm 0,12*	0,89 \pm 0,07	1,00 \pm 0,11 [#]

Tabla XII. Flujo biliar, concentración y secreción biliar de ácidos biliares y de lípidos biliares en cricetos control y en cricetos infectados a los 120 d.p.i. sin tratar (N) y tras la administración de colchicina (C). Valores medios \pm EEM de 10 cricetos. *P<0,05 respecto a controles no tratados. [#]P<0,05 respecto a infectados no tratados.

Tras la administración de colchicina no se observaron diferencias significativas en dichos parámetros en los cricetos infectados respecto a los controles tratados ni a los controles no tratados. El flujo biliar y la secreción biliar de ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol en los cricetos infectados tratados fue significativamente inferior respecto a los cricetos infectados no tratados (-16%, -32%, -19% y -31%, respectivamente) (Figura 11).

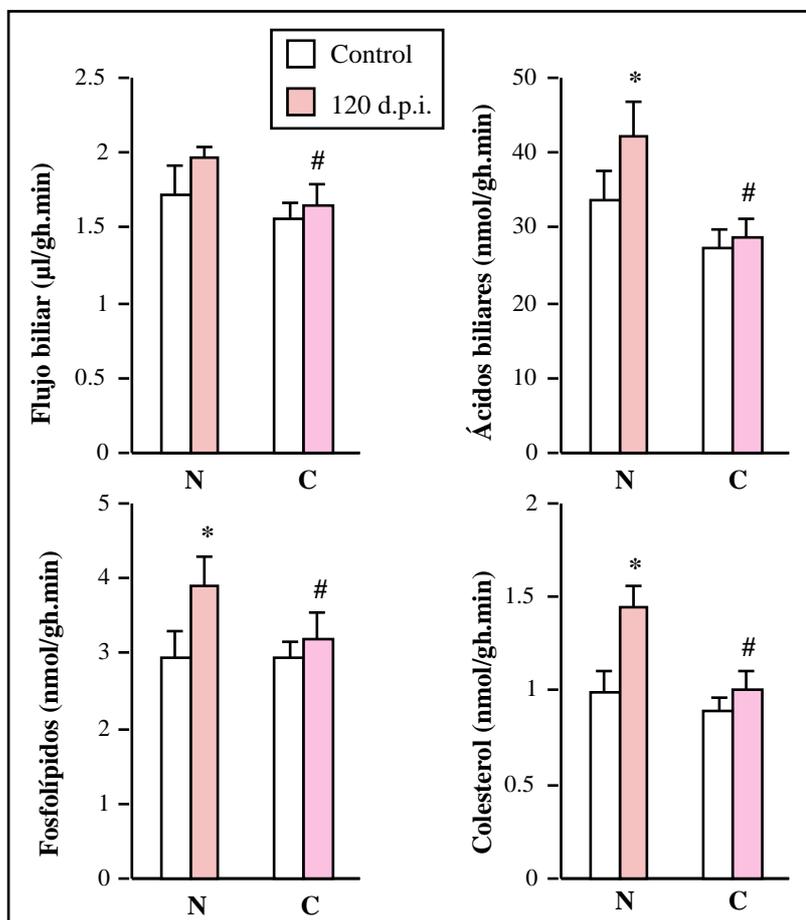


Figura 11. Flujo biliar y secreción biliar de ácidos biliares y de lípidos biliares en cricetos control y en cricetos infectados a los 120 d.p.i. sin tratar (N) y tras la administración de colchicina (C). Valores medios \pm EEM de 10 cricetos. * $P < 0,05$ respecto a controles no tratados. # $P < 0,05$ respecto a infectados no tratados.

4.3. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE EL SISTEMA GLUTATIÓN Y LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES HEPÁTICAS

El glutatión es una de las moléculas de mayor importancia que intervienen en las reacciones de destoxificación siendo, además, junto con sus actividades enzimáticas relacionadas, uno de los sistemas antioxidantes hepáticos de mayor relevancia. Por ello, el paso siguiente en nuestro estudio fue evaluar la influencia de la dicroceliosis sobre el sistema glutatión y las principales actividades enzimáticas antioxidantes hepáticas en los períodos de la infección considerados (experimento tipo A).

Los datos de los parámetros considerados en este apartado, en conjunto, permiten comparar la capacidad antioxidante del glutatión, así como la situación de algunos mecanismos antioxidantes en ambos grupos, control e infectados.

La Tabla XIII y la Figura 12 recogen los valores de las concentraciones de proteínas hepáticas totales y de la fracción citosólica del hígado, así como la concentración citosólica hepática de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en los animales infectados con *D. dendriticum* a los 80 y 120 d.p.i. y en los animales control.

Asimismo, se incluyen los valores medios de las actividades γ -glutamylcisteína sintetasa (GCS) y γ -glutamyltranspeptidasa (GGT), enzimas que participan en la síntesis y en la degradación del glutatión, respectivamente, correspondientes a cada grupo

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Proteínas totales (mg/gh)	232±9	231±13	235±10
Prot. citosólicas (mg/gh)	91,2±8,0	105±7	126±6*
GSH (μmol/gh)	7,12±0,24	7,15±0,28	7,07±0,19
GSSG (μmol/gh)	0,08±0,03	0,25±0,06*	0,19±0,01*
GCS (nmol/mgp.min)	135±8	171±6*	162±8*
GGT (nmol/mgp.min)	4,23±0,28	3,43±0,24*	3,62±0,22*

Tabla XIII. Concentraciones de proteínas hepáticas totales y de la fracción citosólica hepática, glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y actividades enzimáticas de diversas enzimas relacionadas con el sistema glutatión. Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. *P<0,05.

Como puede observarse en la Tabla XIII, la concentración citosólica de GSSG fue significativamente superior en los cricetos infectados a los 80 d.p.i. (+213%) y a los 120 d.p.i. (+138%), respecto a los cricetos control, sin que se modificara la concentración hepática de GSH como consecuencia de la dicroceliosis.

Por otra parte, la dicroceliosis indujo un incremento significativo de la actividad enzimática GCS (80 d.p.i.: +27%; 120 d.p.i.: +20%) y un descenso significativo de la actividad GGT (80 d.p.i.: -19%; 120 d.p.i.: -14%) respecto a los animales control (Figura 12).

En la Tabla XIV se recogen los valores de la relación entre las concentraciones hepáticas de glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH) y de la concentración de hidroperóxidos, determinada mediante la técnica de la diclorofluoresceína (DFC), ambas indicativas de estrés oxidativo. Aparecen indicados, asimismo, los valores de la concentración hepática de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS), parámetro marcador de peroxidación lipídica.

La concentración de TBARS y la relación GSSG/GSH hepáticas aumentaron significativamente como consecuencia de la dicroceliosis, tanto a los 80 d.p.i. (+40% y +300%, respec-

tivamente), como a los 120 d.p.i. (+84% y +200%, respectivamente) (Figura 13), sin que se modificara significativamente la concentración hepática de hidropéroxidos en los animales infectados respecto a los animales control.

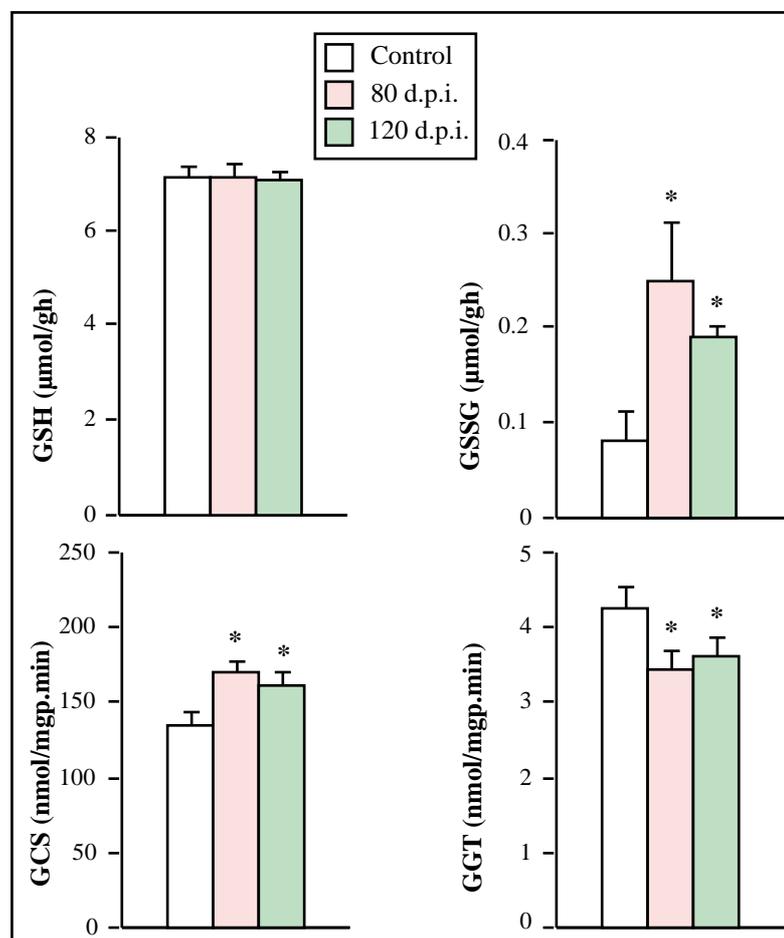


Figura 12. Concentraciones hepáticas de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) y actividades enzimáticas hepáticas -glutamilsteína sintetasa (GCS) y -glutamiltranspeptidasa (GGT) en animales infectados y en animales control. Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. *P<0,05.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Relación GSSG/GSH	0,01 \pm 0,004	0,04 \pm 0,01*	0,03 \pm 0,002*
TBARS (nmol/mgp)	9,02 \pm 0,47	12,6 \pm 0,8*	16,6 \pm 2,3*
DCF (pmol/mgp)	126 \pm 19	158 \pm 17	131 \pm 12

Tabla XIV. Relación entre las concentraciones hepáticas de glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH), concentración hepática de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS), y determinación de la concentración de hidropéroxidos (DCF). Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. *P<0,05.

La Tabla XV muestra las actividades enzimáticas antioxidantes glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) total, selenio dependiente y selenio independiente, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa en el citosol hepático de los animales control y de los animales infectados.

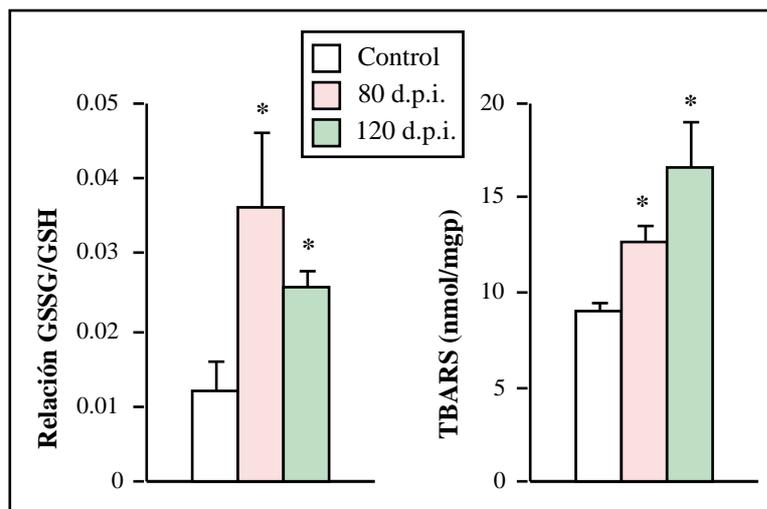


Figura 13. Relación entre las concentraciones hepáticas de glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH) y concentración hepática de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en cricetos infectados y cricetos control. Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. * $P < 0,05$.

La dicroceliosis cursó con un incremento de la actividad glutatión peroxidasa total citosólica, tanto a los 80 d.p.i. (+18%) como a los 120 d.p.i. (+35%), aumentando la actividad glutatión peroxidasa selenio dependiente de forma significativa a los 120 d.p.i. (+46%) respecto a los animales control (Figura 14), sin que se modificara la actividad glutatión peroxidasa selenio independiente como consecuencia de la dicroceliosis.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
GPx total (nmol/mgp.min)	570 \pm 63	674 \pm 41*	769 \pm 81*
GPx Se dep. (nmol/mgp.min)	416 \pm 64	516 \pm 51	608 \pm 85*
GPx Se ind. (nmol/mgp.min)	154 \pm 7	158 \pm 32	161 \pm 15
GR (nmol/mgp.min)	199 \pm 14	173 \pm 12	156 \pm 8*
GST (μ mol/mgp.min)	4,77 \pm 0,21	5,10 \pm 0,35	5,60 \pm 0,22*
SOD (U/mgp)	16,0 \pm 1,0	13,0 \pm 1,3*	10,0 \pm 0,8*
Catalasa (μ mol/mgp.min)	297 \pm 14	327 \pm 30	324 \pm 17

Tabla XV. Actividades enzimáticas citosólicas glutatión peroxidasa (GPx) total, selenio dependiente y selenio independiente, glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa en cricetos control e infectados. Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. * $P < 0,05$.

Como se indica en la Tabla XV, las actividades enzimáticas citosólicas superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la eliminación de radicales superóxido, y glutatión reductasa (GR), enzima responsable de la reducción de GSSG a GSH, resultaron significativamente disminuidas en los animales parasitados respecto a controles, descendiendo la actividad enzimática SOD en ambos períodos de la infección (80 d.p.i.: -19%; 120 d.p.i.: -38%) (Figura 15); la actividad GR sólo disminuyó de forma significativa a los 120 d.p.i. (-22%) (Figura 16).

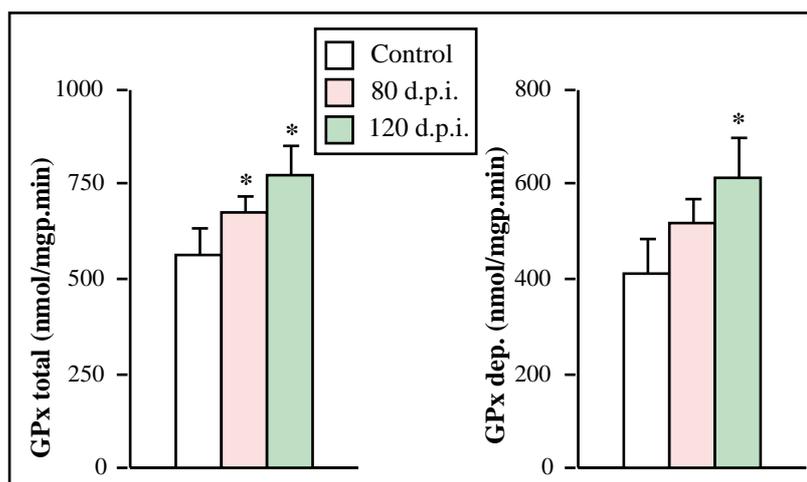


Figura 14. Actividades enzimáticas citosólicas glutatión peroxidasa (GPx) total y glutatión peroxidasa selenio dependiente (GPx Se dep.). Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. * $P < 0,05$.

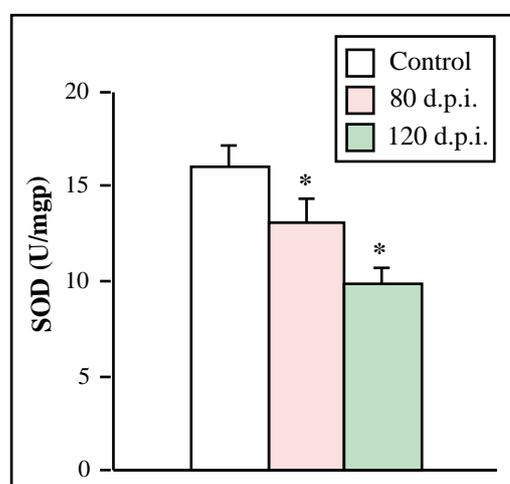


Figura 15. Actividad enzimática citosólica superóxido dismutasa (SOD) en cricetos infectados y en cricetos control. Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. * $P < 0,05$.

La actividad citosólica glutatión S-transferasa (GST), que cataliza la conjugación de metabolitos tóxicos con el GSH, aumentó significativamente en los animales infectados a los 120 d.p.i. (+17%) respecto a los animales control, sin que se modificara significativamente a los 80 d.p.i. (Figura 16). La actividad enzimática citosólica catalasa no se alteró significativamente como consecuencia de la dicroceliosis (Tabla XV).

En la Tabla XVI se incluyen los valores de concentración de proteína mitocondrial hepática y de las actividades enzimáticas antioxidantes mitocondriales glutatión peroxidasa total, selenio dependiente e independiente y superóxido dismutasa.

Como se indica en la Tabla XVI, la actividad mitocondrial GPx total aumentó significativamente como consecuencia de la dicroceliosis (80 d.p.i.: +44%; 120 d.p.i.: +42%), aumentando la actividad GPx selenio dependiente (80 d.p.i.: +73%; 120 d.p.i.: +41%) (Figura 17) sin que existieran diferencias significativas en la actividad selenio independiente entre los cricetos infectados y los cricetos control, de forma similar a lo indicado para dicha actividad enzimática en el citosol (Figura 14).

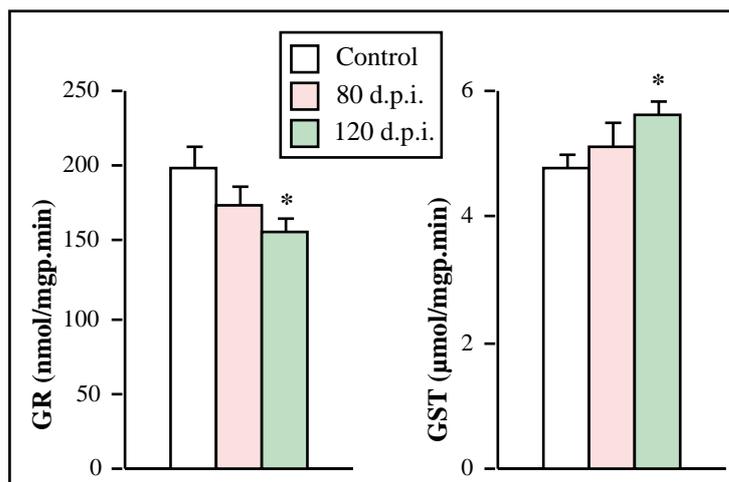


Figura 16. Actividades enzimáticas citosólicas glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) en animales infectados y en animales control. Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. * $P < 0,05$.

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Prot. mitocondrial (mg/gh)	29,5 \pm 2,4	27,0 \pm 2,0	29,4 \pm 1,2
GPx total (nmol/mgp.min)	243 \pm 21	349 \pm 14*	345 \pm 21*
GPx Se dep. (nmol/mgp.min)	135 \pm 17	234 \pm 16*	190 \pm 14*
GPx Se ind. (nmol/mgp.min)	120 \pm 10	116 \pm 22	140 \pm 12
SOD (U/mgp)	2,97 \pm 0,16	2,38 \pm 0,24*	1,82 \pm 0,19*

Tabla XVI. Concentración mitocondrial de proteínas (Prot. mitocondrial) y actividades mitocondriales glutatión peroxidasa (GPx) total, selenio dependiente e independiente y superóxido dismutasa (SOD), en cricetos parasitados y en cricetos control. Valores medios \pm EEM de 10 cricetos. * $P < 0,05$.

La actividad mitocondrial SOD disminuyó como consecuencia de la microceliosis tanto a los 80 (-20%) como a los 120 d.p.i. (-39%) respecto a controles, de forma paralela a su alteración citosólica (Figuras 15 y 18).

En el presente estudio, se han considerado las relaciones entre diversas enzimas antioxidantes como parámetros orientativos del estado del sistema antioxidante y de su adaptación a una situación de daño oxidativo (Tabla XVII, Figura 19).

Como se indica en la Tabla XVII, la relación entre las actividades citosólicas GPx total/GR, así como la relación entre las actividades catalasa/SOD resultaron significativamente aumentadas en los cricetos infectados, tanto a los 80 d.p.i. (+25% y +19%, respectivamente) como a los 120 d.p.i. (+63% y +85%, respectivamente) respecto a los cricetos control (Figura 19).

Asimismo, la relación entre las actividades GPx total/SOD citosólicas fue significativamente superior en los animales afectados de dicroceliosis a los 120 d.p.i. (+95%), pero no a los 80 d.p.i., respecto a los cricetos control (Figura 19).

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
GPx total/GR	3,22±0,35	4,03±0,30*	5,24±0,41*
Catalasa/SOD	19,7±1,1	23,5±2,2*	36,5±4,2*
GPx total/SOD	41,6±6,0	50,1±4,7	80,9±12,7*

Tabla XVII. Relación entre diversas actividades enzimáticas antioxidantes citosólicas en cricetos infectados y cricetos control. Valores medios ± EEM de 10-15 cricetos. *P<0,05.

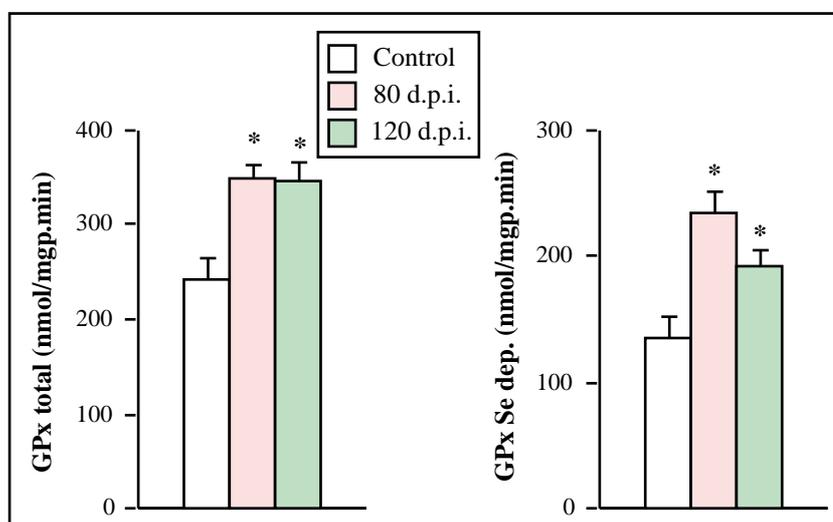


Figura 17. Actividades enzimáticas mitocondriales glutatión peroxidasa (GPx) total y glutatión peroxidasa selenio dependiente (GPx Se dep.). Valores medios ± EEM de 10 cricetos. *P<0,05.

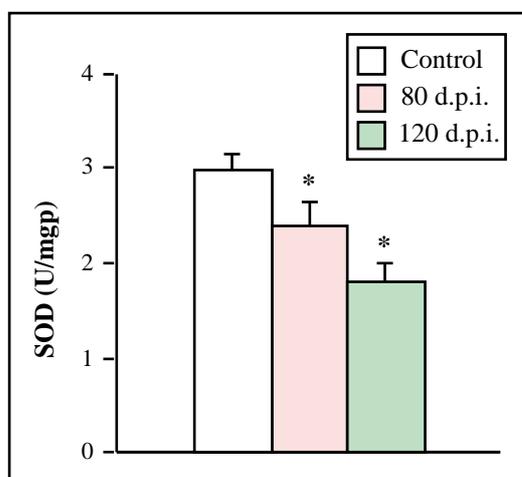


Figura 18. Actividad mitocondrial superóxido dismutasa (SOD) en cricetos parasitados y en cricetos control. Valores medios ± EEM de 10 cricetos. *P<0,05.

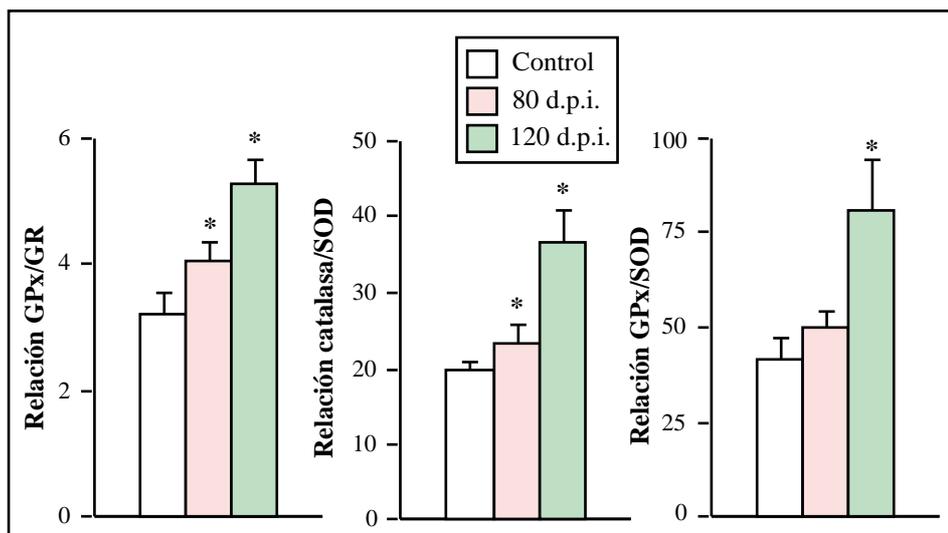


Figura 19. Relación entre diversas actividades enzimáticas antioxidantes citosólicas en cricetos infectados y cricetos control. Valores medios \pm EEM de 10-15 cricetos. * $P < 0,05$.

4.4. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE EL SISTEMA DE MONOOXIGENASAS DEPENDIENTES DEL CITOCROMO P-450

En los experimentos tipo A, asimismo, se estudió el efecto de la dicroceliosis experimental sobre el sistema de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, que es el más representativo de todas las reacciones de fase I.

En la Tabla XVIII se muestran los valores de las concentraciones de proteínas y citocromo P-450 microsómicas hepáticas y de la actividad NADPH citocromo c-reductasa, así como las actividades enzimáticas de varias monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 en los grupos de cricetos control e infectados. Estos parámetros permiten valorar los efectos de la dicroceliosis sobre el funcionamiento del sistema oxidativo microsómico hepático.

La concentración microsómica de citocromo P-450 disminuyó significativamente en los animales infectados a los 80 y 120 d.p.i (-31% y -28%, respectivamente) en comparación con los animales control (Tabla XVIII, Figura 20).

Como puede observarse en la Tabla XVIII, la dicroceliosis cursó con un descenso selectivo en las actividades de las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450. Así, las actividades enzimáticas anilina hidroxilasa y etoxicumarina O-desetilasa microsómicas hepáticas disminuyeron de forma significativa en los animales afectados por la dicroceliosis, tanto a los 80 d.p.i. (-55% y -33%, respectivamente) como a los 120 d.p.i. (-43% y -41%, respectivamente) en comparación con los cricetos control.

Asimismo, las actividades aminopirina N-desmetilasa y eritromicina N-desmetilasa también resultaron significativamente disminuidas en la etapa más avanzada considerada de la infección (-45% y -72%, respectivamente), pero sin que se modificaran significativamente a los 80 d.p.i. respecto a los cricetos control (Figura 21).

	Control	80 d.p.i.	120 d.p.i.
Proteínas microsómicas (mg/gh)	27,4±1,2	26,6±1,8	22,2±1,2*
Citocromo P-450 (nmol/mgp)	0,29±0,02	0,20±0,03*	0,21±0,03*
NADPH cit. c-reductasa (nmol/mgp.min)	45,3±2,9	45,6±2,9	158±11*
Aminopirina N-desmetilasa (pmol/mgp.min)	1,10±0,05	1,12±0,08	0,61±0,16*
Etoxicumarina O-desetilasa (nmol/mgp.min)	1,55±0,25	1,04±0,17*	0,91±0,07*
Eritromicina N-desmetilasa (nmol/mgp.min)	7,14±1,02	7,69±0,44	2,00±0,35*
Anilina hidroxilasa (nmol/mgp.min)	4,86±0,45	2,20±0,38*	2,78±0,35*
Fluidez de membrana (P)	0,21±0,002	0,21±0,005	0,21±0,008

Tabla XVIII. Concentración microsómica hepática de proteínas, citocromo P-450, actividad NADPH citocromo c-reductasa y diversas actividades de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450. Valores medios ± EEM de 15 cricetos. *P<0,05.

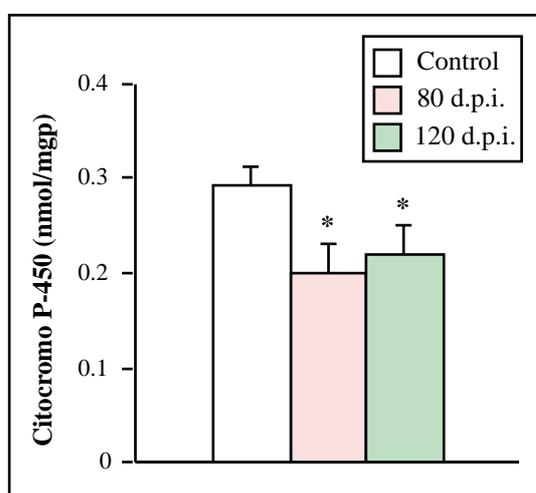


Figura 20. Concentración hepática de citocromo P-450 en animales control y en animales infectados. Valores medios ± EEM de 15 cricetos. *P<0,05.

La fluidez de la membrana microsómica, expresada como su valor inverso (polaridad), no presentó diferencias significativas entre los cricetos control y los cricetos infectados, ni a los 80 ni a los 120 d.p.i. (Tabla XVIII). La actividad NADPH citocromo c-reductasa aumentó significativamente a los 120 d.p.i. respecto a los cricetos control (+249%), sin que resultara modificada significativamente a los 80 d.p.i. (Figura 22).

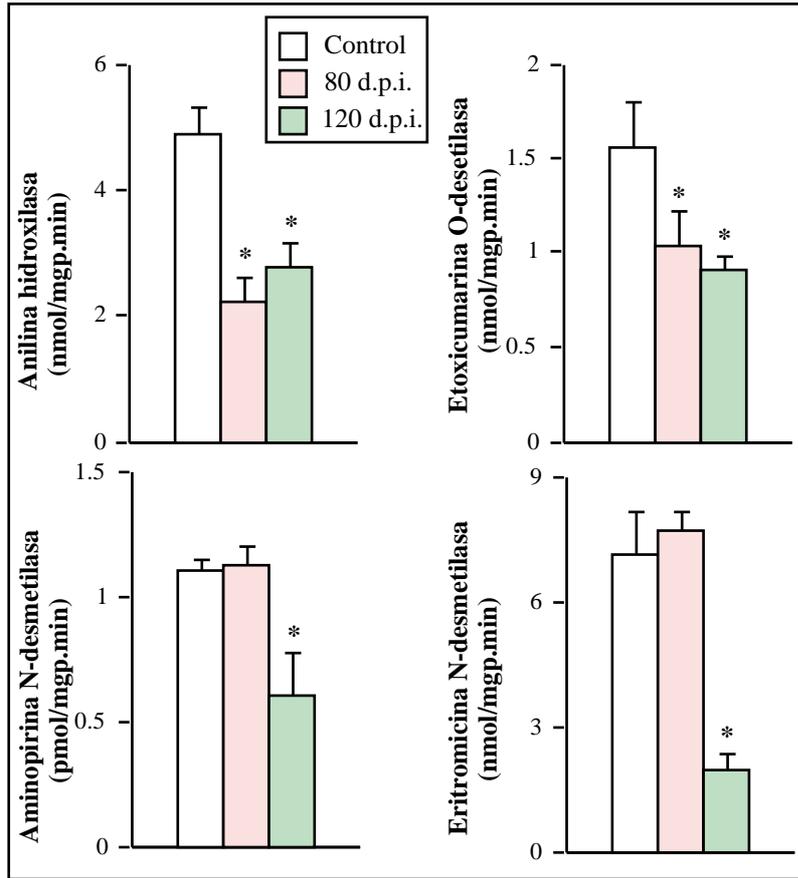


Figura 21. Actividades enzimáticas microsómicas hepáticas anilina hidroxilasa, etoxicumarina O-desetilasa, aminopirina N-desmetilasa y eritromicina N-desmetilasa en cricetos infectados y en cricetos control. Valores medios \pm EEM de 15 cricetos. * $P < 0,05$.

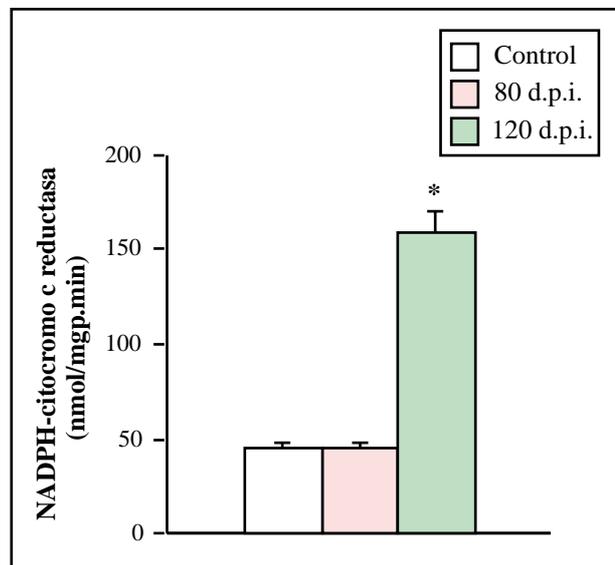


Figura 22. Actividad NADPH citocromo c-reductasa hepática en cricetos control y en cricetos infectados. Valores medios \pm EEM de 15 cricetos. * $P < 0,05$.

5. DISCUSIÓN

5.1. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE DIVERSOS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

El criceto sirio dorado es el mamífero de elección en trabajos experimentales con *Dicrocoelium dendriticum* debido al reducido tamaño de su hígado, a la adecuada disposición de los parásitos en los conductos biliares, al alto porcentaje de metacercarias que se desarrollan y al tamaño relativamente elevado que alcanzan los parásitos en el mismo (Krull, 1956).

Efectivamente, en nuestro estudio, la detección de huevos del parásito en las heces de los animales infectados a partir de la octava semana postinfección, el aumento en las actividades ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa), así como los hallazgos macroscópicos e histopatológicos, indican la existencia de un daño hepático derivado de la dicroceliosis que confirma, por tanto, la fiabilidad del modelo animal elegido para el estudio del funcionamiento hepático.

Las actividades enzimáticas séricas AST y ALT, enzimas procedentes del parénquima hepático, no específicas del suero, aumentaron en los animales infectados con *D. dendriticum* respecto a los controles, de forma más manifiesta cuanto más avanzada se encuentra la parasitación. Este aumento en las actividades de dichas enzimas séricas coincide con lo descrito por otros autores en el curso de la dicroceliosis en la oveja (Dementev y cols., 1978; Ranucci y Grol-Ranucci, 1978; Reinhardt, 1978; Campo, 1996).

La elevación de las actividades séricas de las enzimas comentadas está asociada a estados patológicos que cursan con daño celular y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática o bien a necrosis de las células.

Resultados similares se han descrito en el curso de la fasciolosis en la rata y en el ganado ovino y bovino (Pullan y cols., 1970; Sykes y cols., 1980; Galtier y cols., 1983; 1985; 1987; 1991; 1994; Bulgin y cols., 1984; González y cols., 1991; Elsheikh y cols., 1992; Ferre y cols., 1994; 1995; López y cols., 1994), mostrándose elevadas dichas actividades en plasma

fundamentalmente en las primeras etapas de la infección, cuando los parásitos inmaduros migran por el parénquima hepático, con una tendencia a su normalización en la fase crónica, coincidiendo con la localización del parásito en los conductos biliares y con la regeneración hepática. Por tanto, ambas actividades son, junto con la actividad GGT plasmática, indicadoras del estadio de la infección (Rowlands y Clampitt, 1979; Sykes y cols., 1980; Bulgin y cols., 1984; Galtier y cols., 1986; Ferre y cols., 1994). Asimismo, se ha descrito un incremento en la actividad sérica ALT en el transcurso de la hepatitis crónica en el criceto (Brunnert y Altman, 1991).

Los resultados obtenidos en dichas actividades enzimáticas plasmáticas señalan la existencia de daño hepatocelular en el curso de la dicroceliosis subclínica en el criceto, siendo dicho efecto lesivo de mayor entidad cuanto mayor es el tiempo transcurrido desde la infección, a diferencia de lo descrito en el curso de la fasciolosis.

Las alteraciones macroscópicas que se observaron en la dicroceliosis experimental en el criceto coinciden con lo indicado en estudios previos realizados en óvidos y bóvidos (Mapes, 1951; Dhar y Singh, 1963b; Massoud, 1981; Wolf y cols., 1984; Somvanshi y cols., 1992) y se resumen en un endurecimiento del hígado, engrosamiento, dilatación y aspecto tortuoso de las vías biliares y dilatación de la vesícula biliar, que contiene un gran número de parásitos. Como lesiones histopatológicas, coincidiendo con nuestros resultados, se ha descrito en distintas especies la existencia de infiltración leucocitaria, colangitis y fibrosis biliar, representativas de la infección por el trematodo (Borchert, 1981; Massoud, 1981; Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991), así como la hiperplasia del epitelio de los conductos biliares septales y del conducto hepático derivada de la localización del parásito (Dhar y Singh, 1963b; Rahko, 1972; Campo, 1996) y cambios degenerativos en las células hepáticas (Marchand, 1966; Price y Child, 1971; Rahko, 1972; Massoud, 1981; Steele, 1982), con la existencia de infiltración lipídica, como se ha descrito en el criceto (Prunescu y cols., 1979). Dichos autores indican, en la misma especie, el desarrollo de granulomas de cuerpo extraño, conteniendo células gigantes multinucleadas, organizadas alrededor de los huevos del parásito en el parénquima hepático, de forma similar a lo indicado en el presente trabajo.

En nuestro estudio, los animales infectados experimentalmente con *D. dendriticum* mostraron una menor ganancia de peso corporal respecto a los cricetos control durante el tiempo transcurrido desde la infección. Todos los estudios coinciden en señalar como manifestaciones más características de la dicroceliosis las alteraciones digestivas y de la nutrición, estando ampliamente descritas la pérdida de peso e incluso la emaciación en las infecciones más intensas, de forma semejante a como se ha puesto de manifiesto en animales infectados con *Fasciola hepatica*, como consecuencia de la disminución de la ingestión de alimentos en la fase de migración de los parásitos por el parénquima hepático (Sinclair, 1967; Berry y Dargie, 1976; Sykes y cols., 1980; Ferre y cols., 1994).

Nuestros resultados coinciden con estudios previos realizados en animales infectados con *D. dendriticum* en los que se observó un menor incremento del peso corporal (Sinclair, 1967). Asimismo, en corderos infectados en la naturaleza con *D. dendriticum* se indicó la existencia de una ganancia de peso corporal inferior a los no infectados (Rosef y cols., 1985). No obstante, es muy difícil evaluar la disminución de peso en los animales parasitados de forma natural con *D. dendriticum* ya que, con frecuencia, también lo están por *F. hepatica* y/o por otros parásitos. Si bien son escasos los trabajos experimentales realizados sobre este tema, parece existir una relación directa entre la evolución del peso corporal y la carga parasitaria (Hohorst y Lämmler, 1962; Salimova, 1972).

Por otra parte, los cricetos infectados a los 80 d.p.i. mostraron un peso hepático y una relación hepatosomática significativamente inferior a los cricetos control. La disminución del peso hepático observado en los cricetos infectados a los 80 d.p.i., podría derivarse del efecto lesivo ejercido por el parásito sobre el parénquima hepático y los conductos biliares, actuando bien mediante una acción mecánica o bien química, y que parece corroborarse tanto por las lesiones histológicas como por las alteraciones de las enzimas marcadoras de daño hepatocelular descritas. Al disminuir el peso hepático de manera más marcada que el peso corporal, la relación hepatosomática resultó asimismo reducida.

Estos hallazgos no coinciden con lo indicado en ratas y ovejas infectadas con *Fasciola hepatica*, en las cuales la relación hepatosomática aumentó respecto a los animales control (Berry y Dargie, 1976; Sykes y cols., 1980; Galtier y cols., 1983; 1985; 1987; González y cols., 1991; Ferre y cols., 1994), posiblemente como una consecuencia de la inferior ganancia de peso observada en los animales infectados durante la migración de los parásitos por el parénquima hepático. No obstante, hay que considerar, como posible explicación de dicha discrepancia, la divergencia existente en los mecanismos patogénicos de ambos parásitos en el hospedador definitivo, como son las distintas características migratorias, tamaño y alimentación de los mismos, lo que motiva la distinta evolución del cuadro clínico y de las lesiones en el tiempo en ambas parasitosis.

A diferencia de los resultados observados en la fase inicial considerada por nosotros de la parasitosis, en los cricetos infectados a los 120 d.p.i., el peso hepático y la relación hepatosomática no difirieron de los mostrados por los cricetos control. La recuperación de la masa hepática y, por tanto, de la relación hepatosomática, podría explicarse como una consecuencia de la proliferación de los conductos biliares y de la existencia de una intensa reacción fibrosa, más manifiestas cuanto más avanzada es la fase considerada, que darían lugar a un aumento del peso del hígado que, como indicaremos posteriormente, está asociado a un incremento de la función biliar en los cricetos infectados a los 120 d.p.i.

En nuestro estudio, la recuperación de las formas adultas del parásito del hígado, de los conductos biliares y de la vesícula biliar representó un 43% del total de metacercarias adminis-

tradas. Estudios previos indican un porcentaje de vermes recuperados en cricetos infectados del 68% de la dosis infectante (Hohorst y Lämmler, 1962). Se ha descrito un porcentaje del 50% de parásitos recuperados en el criceto cuando se administra una dosis infectante de 40 metacercarias (Krull, 1956), dosis elegida para la realización del presente estudio. Ahora bien, la carga parasitaria recuperada en las infecciones experimentales con *D. dendriticum* puede variar en función de la duración de la infección y de la metodología utilizada en la extracción de los vermes (Wolff y cols., 1984).

5.2. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE LOS MECANISMOS DE FORMACIÓN DE LA BILIS

La bilis es una solución acuosa de compuestos orgánicos e inorgánicos secretada por los hepatocitos al canalículo biliar y que se modifica a su paso por los conductillos y los conductos biliares mediante procesos de reabsorción y/o secreción de agua y electrólitos. Podemos distinguir dos fracciones dentro de la secreción biliar, la secreción biliar canalicular, dividida en una fracción dependiente de los ácidos biliares (FDAB) y otra independiente de los ácidos biliares (FIAB) y la secreción biliar de los conductos (Klaassen y Watkins, 1984). Los ácidos biliares juegan un papel fundamental en la formación de la bilis, actuando como solutos osmóticamente activos responsables de la formación de la denominada fracción de secreción dependiente de los ácidos biliares. La secreción activa de los ácidos biliares y sus conjugados representa, al menos, el 40-50% del flujo biliar canalicular; la secreción biliar canalicular independiente de los mismos se produce por la secreción de compuestos orgánicos distintos. Los conductos biliares segregan además un fluido enriquecido en bicarbonato que es estimulado por la acción de la secretina (Erlinger, 1993; Elsing y cols., 1996; Roberts y cols., 1997).

El flujo biliar no experimentó modificaciones significativas en los cricetos infectados a los 80 d.p.i. respecto al de los cricetos control. Sin embargo, en la fase más avanzada de la infección considerada en nuestro estudio (120 d.p.i.) el flujo biliar aumentó significativamente. Con el término coleresis se define el aumento del flujo biliar provocado por la acción de diversos compuestos tanto endógenos como exógenos.

Con el fin de establecer si la coleresis observada en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. tenía su origen en el canalículo o en los conductos biliares, se procedió al estudio comparado de la secreción biliar tras la administración de manitol [^{14}C] a ambos grupos, infectados (120 d.p.i.) y control. La medida de la depuración biliar de carbohidratos inertes, tales como el eritritol o el manitol, ha sido ampliamente utilizada para diferenciar el flujo biliar de origen canalicular del producido en los conductos. Se considera que, en la mayoría de las especies, estos compuestos fluyen libremente a través del hepatocito, entrando en los canalículos biliares por difusión sin metabolizarse, ni secretarse o reabsorberse en los conductillos y/o conductos biliares (Feverly y cols., 1990). La validez de este método ha sido cuestionada al existir

evidencias de que estos solutos son capaces de atravesar en cierta medida el epitelio biliar (Smith y Boyer, 1982); ahora bien, esta reabsorción parece afectar tan sólo al 10% del total de soluto inerte excretado en la bilis (Tavoloni y cols., 1986). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la existencia de un aumento en la depuración biliar de manitol, lo que sugiere que la coleresis observada en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. tendría su origen en el canalículo.

La secreción biliar canalicular puede modificarse durante su tránsito a través del árbol biliar (Peterson y Fujimoto, 1973; Strazzabosco y cols., 1991). Se ha sugerido la existencia de reabsorción de agua y de electrolitos por el epitelio biliar intrahepático al observarse que, en el perro y en el mono, la relación de la concentración en bilis y en plasma del eritritol era superior a la unidad (Tavoloni, 1988). En nuestro estudio, la relación bilis/plasma de manitol [^{14}C] fue superior a la unidad en los cricetos infectados a los 120 d.p.i., lo que parece indicar la existencia de procesos de reabsorción de la bilis canalicular a su paso por los conductos biliares. La contribución del árbol biliar a la formación de la secreción biliar total fue inferior en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. respecto a la mostrada en los cricetos control (20% y 30%, respectivamente).

Por tanto, el incremento del flujo biliar observado a los 120 d.p.i. se explicaría como el resultado de dos acciones opuestas. Por una parte, la secreción biliar canalicular se encontraría estimulada como consecuencia de la dicroceliosis, mientras que, por otra parte, se incrementaría la función de reabsorción frente a la función secretora de los conductos biliares sobre dicha bilis canalicular.

La proliferación de estructuras semejantes a conductos biliares intrahepáticos en el hombre se asocia, fundamentalmente, a situaciones en las que existe obstrucción extrahepática, observándose también en diversas enfermedades infecciosas y por la acción de agentes tóxicos (Popper, 1986; Alpini y cols., 1988; 1989). En distintos animales, esta reacción hiperplásica puede inducirse por ligadura del conducto biliar común (Alpini y cols., 1988; Slott y cols., 1990; Sirica y Williams, 1992; Bravo y cols., 1997), por infección con *Fasciola hepatica* (Isseroff y cols., 1977; Foster, 1981; López y cols., 1993; Ferre y cols., 1995), *Schistosoma mansoni* (Bedi e Isseroff, 1979; DaSilva y cols., 1985), *Eimeria stiedai* (Esteller y cols., 1990), y por una gran variedad de fármacos (Richards y cols., 1982; Alpini y cols., 1989), así como por regímenes alimentarios que conducen a carcinoma hepatocelular (Sirica y Cihla, 1984; Yokohama y cols., 1986).

Se ha descrito, como mecanismo patogénico del parásito, un efecto irritativo del mismo sobre la mucosa de los conductos biliares de mayor tamaño, lo que podría explicar la proliferación observada. Algunos autores han sugerido que las ventosas del parásito podrían ser las responsables de las erosiones y alteraciones mecánicas observadas en la mucosa de dichos conductos (Dhar y Singh, 1963b; Rahko, 1972). Sin embargo, no hay que descartar el posible

incremento de la presión biliar provocado por la acción mecánica obstructiva del propio parásito (Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991) o de productos tóxicos liberados por el mismo, como factores desencadenantes de la división de las células del epitelio biliar, al igual que se ha descrito para explicar la hiperplasia observada en infecciones con *Fasciola hepatica* (Isseroff y cols., 1977; Foster, 1981; López y cols., 1993).

Esta disminución de la contribución del árbol biliar a la secreción biliar total, observada en la dicroceliosis, está en discrepancia con lo descrito en diversas situaciones patológicas que cursan, asimismo, con hiperplasia del epitelio biliar. Así, el flujo biliar de los conductos en la rata, que en condiciones basales representa el 10% del flujo biliar total, se incrementa con el aumento en el número de células de los conductos biliares que tiene lugar en diferentes condiciones experimentales (Accatino y cols., 1979; Alpini y cols., 1988; 1989). Se ha demostrado la existencia de una relación lineal entre el flujo biliar y el número de estas células, de tal modo que una gran hiperplasia de los conductos biliares induce una marcada coleresis (González y cols., 1991; Jiménez y cols., 1992; López y cols., 1993). En nuestro estudio, los cambios histopatológicos descritos en el sistema de conductos biliares de los cricetos infectados, consistentes en una proliferación y una fibrosis en la pared de los mismos, parecen inducir una mayor contribución de la reabsorción de agua y electrólitos por el epitelio biliar intrahepático, frente a su capacidad secretora.

Con el fin de establecer la contribución relativa de la FDAB y de la FIAB a la coleresis canalicular, puesta de manifiesto tras el estudio de la depuración de manitol [^{14}C] en los cricetos infectados a los 120 d.p.i., se determinaron la secreción biliar de ácidos biliares y de glutatión, involucrados, respectivamente, en la formación de cada una de dichas fracciones.

Diversos investigadores apuntan que la secreción activa de glutatión a la bilis, junto con la de bicarbonato (Hardison y Wood, 1987), son las principales fuerzas en la formación de la bilis canalicular independiente de los ácidos biliares (Ballatori y Truong, 1992; Mohan y cols., 1994). El papel del glutatión en la formación de la bilis se ha puesto de manifiesto mediante estudios realizados en ratas mutantes adultas Groningen Yellow, que carecen de actividad -glutamyltranspeptidasa (GGT) (Dijkstra y cols., 1990) y estudios sobre la inhibición de su degradación por acción de la acivicina, sustancia que bloquea la acción de la GGT (Ballatori y Truong, 1992). Así, se ha demostrado en hígado de rata aislado y perfundido que cualquier compuesto que aumente o disminuya la secreción biliar de glutatión produce cambios similares en el flujo biliar existiendo una relación lineal, en diferentes situaciones experimentales, entre flujo biliar y secreción biliar de glutatión (Ballatori y Truong, 1989; Hofmann, 1990).

En el presente estudio, la secreción biliar de glutatión aumentó significativamente en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. respecto a los cricetos control, sin que se modificara significativamente la secreción de bicarbonato. El marcado incremento observado de la secre-

ción de glutatión y, por tanto, de la FIAB, podría explicar, al menos en parte, la coleresis observada en dicho grupo.

Como se comentará con mayor profundidad en el siguiente apartado, la concentración hepática de los TBARS y la relación hepática entre el glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH), marcadoras de estrés oxidativo, aumentaron significativamente en los cricetos infectados a los 80 y 120 d.p.i. En situaciones en las que un exceso de GSSG no puede reducirse por la acción de la actividad glutatión reductasa (GR) y se acumula en el hígado, como sucede en nuestro estudio, éste se elimina a la bilis (Sies y cols., 1978; Eberle y cols., 1981; Kaplowitz y cols., 1983; Lauteburg y cols., 1984; Akerboom y Sies, 1989), lo que podría explicar el aumento de la secreción biliar de glutatión y, por tanto, el aumento de la FIAB que se produce en los cricetos infectados a los 120 d.p.i.

Además, en los animales parasitados, la actividad enzimática hepática - glutamilcisteína sintetasa (GCS), enzima limitante en la síntesis de glutatión (Kretzschmar y cols., 1989), resultó significativamente aumentada, mientras que la actividad - glutamiltranspeptidasa (GGT) hepática, enzima que hidroliza el glutatión en sus aminoácidos constituyentes (Meister y cols., 1981), disminuyó de forma significativa como consecuencia de la dicroceliosis. La regulación de la GCS es de vital importancia en la homeostasis del GSH. La inducción de dicha enzima parece estar asociada a una sobreexpresión del transportador canalicular MRP1, que participa en el transporte de conjugados de glutatión y GSSG (Müller y Jansen, 1997) y parecen estar correguladas (Ishikawa y cols., 1996), lo que parece apoyar el incremento en la secreción biliar de glutatión comentado anteriormente.

El origen de las alteraciones oxidativas producidas por la dicroceliosis no se conoce actualmente, pero podrían estar implicados productos metabólicos tóxicos liberados por el parásito que, desde la bilis, alcanzarían el torrente sanguíneo, ejerciendo su acción lesiva en el hígado (Krull y Mapes, 1952b; Dhar y Shing, 1963b; Aliev, 1968; Steele, 1982; Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991).

Respecto a la contribución de la FDAB a la coleresis canalicular descrita en los cricetos infectados a los 120 d.p.i., en el presente trabajo se ha observado un marcado incremento en la secreción biliar de los ácidos biliares y, por tanto, en el flujo biliar dependiente de los mismos, en dicho grupo respecto a los cricetos control. En el grupo de cricetos infectados a los 80 d.p.i., dicha secreción y, por tanto, la FDAB, no experimentaron modificaciones significativas. Como hemos indicado, existe una relación directa entre el flujo biliar y la secreción biliar de ácidos biliares (Sellinger y Boyer, 1990), por lo que el aumento en su secreción explica, al menos en parte, la coleresis canalicular observada en nuestro estudio.

En resumen, el aumento del flujo biliar observado a los 120 d.p.i. se acompañó de un aumento paralelo en la secreción biliar de ácidos biliares y de glutatión, lo que parece indicar

que tanto la FDAB como la FIAB participan en la coleresis de origen canalicular descrita en esta fase de la infección.

La conversión del colesterol en ácidos biliares primarios (cólico y quenodesoxicólico), se realiza en una cascada de reacciones enzimáticas que tienen lugar en los microsomas, el citosol, las mitocondrias y los peroxisomas hepáticos. La primera reacción del proceso enzimático es una 7 α -hidroxilación que constituye la reacción limitante del mismo (Danielsson y cols., 1976; Shefer y cols., 1970; Russell y Setchell, 1992), si bien existe otra vía de síntesis distinta, iniciada por una colesterol 27 α -hidroxilasa a través de la denominada "ruta ácida" (Axelson y Sjövall, 1990; Axelson y cols., 1992; Shoda y cols., 1993), que pueden afectar a la concentración y al perfil biliar de los ácidos biliares. Con el fin de establecer si el origen del incremento en la secreción de los ácidos biliares observado en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. se debía a un incremento en la síntesis de estos compuestos, se determinó la actividad colesterol 7 α -hidroxilasa microsómica hepática, que no resultó modificada por la dicroceliosis. Este resultado parece indicar la ausencia de estímulo en la síntesis hepática de los ácidos biliares, por lo que el aumento de su secreción biliar podría explicarse por un aumento de su salida a la bilis.

Los ácidos biliares hidrófobos, por sus propiedades detergentes, pueden dar lugar a estrés oxidativo al desestabilizar la estructura de las membranas (Hofmann y Roda, 1984), y al activar la capacidad oxidativa de las células de Kupffer, lo que genera intermediarios reactivos de oxígeno (De Lange y Glazer, 1990; Lujubuncic y cols., 1996). Con el fin de establecer la existencia de posibles cambios cualitativos de los ácidos biliares que pudieran estar involucrados en el estrés oxidativo observado en los animales infectados, se estudió el perfil de los ácidos biliares en la bilis, observándose tan sólo pequeñas modificaciones en dicho perfil y sin que se detectara ningún aumento en la hidrofobicidad de los mismos como consecuencia de la dicroceliosis.

Los ácidos biliares están sometidos a una serie de reacciones que los modifican por la acción de microorganismos presentes en el intestino (Whiting, 1986). En una de dichas reacciones los grupos hidroxilo se oxidan a grupos ceto, dando lugar a mono-, di- y tri-ceto derivados que se reducen a su paso por el hígado a su forma hidroxilo original. Los cetoderivados también pueden formarse en situaciones en las que los ácidos biliares actúan como último paso de una cadena de reacciones de peroxidación lipídica (De Lange y Glazer, 1990). Los fosfolípidos, tanto de las membranas del tracto biliar como los que se encuentran en la bilis, pueden ser vulnerables a la oxidación inducida por muchos xenobióticos que se excretan total o parcialmente en la bilis (Klaassen y Watkins, 1984). Los ácidos biliares, a concentraciones fisiológicas, junto con otros compuestos como el glutatión, son antioxidantes efectivos que eliminan los radicales libres de oxígeno facilitando la dismutación de los radicales superóxido mediante su oxidación directa a ceto derivados (De Lange y Glazer, 1990). Este papel antioxidante lo desempeñan fundamentalmente en la bilis y en el intestino (De Lange y Glazer, 1990).

Aunque la mayoría de las oxidaciones del grupo 7 de los ácidos biliares se lleva a cabo por la acción de las bacterias intestinales, recientes investigaciones ponen de manifiesto la existencia de una actividad enzimática dependiente de NADP(+), que no pertenece a ninguna familia de citocromo P-450, denominada 7-hidroxicolesterol deshidrogenasa. Esta actividad enzimática está presente en el hígado de criceto en alta concentración, catalizando la formación de 7-cetocolesterol, que a su vez puede regular el metabolismo de los ácidos biliares (Song y cols., 1996).

En nuestro estudio, el principal cetoácido encontrado en la bilis de los cricetos control ha sido el ácido 7ceto, 3, 12 dihidroxi, 5-colanoico. La presencia en la bilis de dicho ácido biliar aumentó significativamente en los cricetos infectados, representando en algunos de ellos hasta el 2,5 % del total de los ácidos biliares. El incremento en la formación de cetoácidos biliares parece ser más el resultado que la causa de la modificación del estado redox del hepatocito descrito anteriormente. Así, la protección que ejercen los ácidos biliares frente a la peroxidación de proteínas y de lípidos parece tener una significación fisiológica. El metabolismo del propio parásito podría estar relacionado con este cambio y con la disminución observada en los animales infectados a los 120 d.p.i. de la relación existente entre los ácidos biliares primarios y los secundarios.

Los cricetos infectados a los 120 d.p.i. mostraron un aumento en la secreción biliar de fosfolípidos y de colesterol respecto a los cricetos control. Como hemos indicado, la secreción de los lípidos biliares está relacionada cuantitativamente con la secreción de los ácidos biliares (Crawford y cols., 1988; 1991). Según se ha indicado en un apartado anterior, la secreción de los lípidos biliares se produce por dos mecanismos, uno dependiente y otro independiente de la secreción de los ácidos biliares. Este último es minoritario y se ha sugerido que es debido a la existencia de un proceso secretor regulado a través de vesículas que se produce en ausencia de aquéllos (Coleman y cols., 1989). Con respecto al primero, se requieren ácidos biliares para la secreción eficiente de lípidos, aunque hay que tener en cuenta que son dos procesos separados, produciéndose en primer lugar la secreción de los ácidos biliares a la luz canalicular (Coleman y cols., 1989; Nathanson y Boyer, 1991) desde donde actúan extrayendo fosfolípidos y colesterol desde microzonas de la membrana canalicular ricas en dichos lípidos (Verkade y cols., 1990). El incremento en la secreción de lípidos biliares observado en nuestro estudio podría deberse, por tanto, al aumento de la secreción biliar de los ácidos biliares, que actuarían desde el canalículo solubilizando los lípidos de la cara externa de la membrana canalicular.

La secreción biliar de fosfatasa alcalina, enzima localizada en la membrana canalicular de los hepatocitos, también resultó aumentada en los cricetos infectados respecto a los cricetos control. Si bien existe una fracción significativa de fosfatasa alcalina que se secreta a la bilis independientemente de los ácidos biliares (Wielandt y cols., 1993), la otra fracción biliar de la enzima depende de la secreción de los mismos (Price y cols., 1972; Holdsworth y Coleman, 1975; Hatoff y Hardison, 1982). La secreción de fosfatasa alcalina a la bilis se explica

principalmente por la solubilización de la enzima de la membrana canalicular por acción de los ácidos biliares presentes en el canalículo (Vyvoda y cols., 1977; Coleman y cols., 1979). El aumento en la secreción biliar de la fosfatasa alcalina observado en los animales infectados a los 120 d.p.i. podría, por tanto, deberse al incremento de la secreción de ácidos biliares constatado en dicho grupo.

En nuestro estudio, la capacidad solubilizante de los ácidos biliares sobre los lípidos biliares resultó aumentada en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. respecto a los cricetos control, existiendo, por tanto, un desacoplamiento entre la secreción de ácidos biliares y de lípidos biliares. En la diabetes inducida con estreptozotocina en la rata, se observó un incremento en la concentración de los fosfolípidos secretados por μmol de ácidos biliares secretados (Villanueva y cols., 1990), de forma similar a lo descrito en nuestro estudio.

La capacidad de los ácidos biliares para estimular la secreción de los lípidos biliares depende de, al menos, 3 factores: su concentración intracanalicular, su perfil en la bilis y la concentración biliar de los aniones orgánicos desacoplantes (Apstein y Robins, 1982; Apstein, 1984; Gurantz y Hofmann, 1984), a los que habría que añadir otro parámetro que es la composición lipídica de la membrana canalicular (Coleman y cols., 1989; Smit y cols., 1993). La habilidad de los ácidos biliares para promover la secreción de lípidos biliares aumenta al modificarse el perfil biliar de los mismos, según su hidrofobicidad (Alvaro y cols., 1986). En nuestro estudio, no se observaron diferencias en el perfil biliar de los ácidos biliares, por lo que puede descartarse como mecanismo mediante el cual aumentaría la capacidad solubilizante de los ácidos biliares.

La secreción de fosfolípidos y de colesterol también puede resultar incrementada respecto a la secreción de los ácidos biliares en aquellas condiciones en las que aumenta la disponibilidad de ambos lípidos biliares a la acción detergente de los ácidos biliares sobre la cara externa de la membrana canalicular, al aumentar su transporte intracelular o su paso de la cara interna a la externa de la membrana canalicular, lo que a su vez depende de la proteína *mdr2* (Groen y cols., 1996; Oude-Elferink y cols., 1996)

El índice litogénico de la bilis indica la saturación en colesterol de la misma. La dicrocoliosis no parece afectar al índice litogénico de la bilis ya que no existieron diferencias significativas entre los animales control e infectados en dicho parámetro.

Con el fin de esclarecer el mecanismo colerético derivado del aumento de la secreción de los ácidos biliares, que se acompaña a su vez de un aumento en la secreción de lípidos biliares en los cricetos a los 120 d.p.i., se administró colchicina, fármaco inhibidor de los microtúbulos. Diferentes estudios indican que el transporte intracelular de vesículas juega un importante papel en la llegada de colesterol y fosfolípidos a la cara interna de la membrana canalicular del hepatocito, y se sabe, asimismo, que la estimulación de la secreción biliar de lípidos por

la acción de los ácidos biliares puede deberse a un aumento en su transporte mediante la vía transcitótica (Cohen, 1996). La colchicina carece de efectos sobre la secreción basal de los ácidos biliares o sobre la secreción de taurocolato [^{14}C] a dosis muy bajas, pero reduce la secreción de los lípidos biliares (Crawford y cols., 1988). Sin embargo, al aumentar la concentración de los ácidos biliares, la colchicina inhibe la secreción de los mismos asociada a una disminución paralela en la secreción biliar de los fosfolípidos y del colesterol (Erlinger, 1996).

En nuestro estudio, el tratamiento con colchicina revierte el aumento del flujo biliar y de la secreción biliar de ácidos y lípidos biliares observados en los animales parasitados no tratados. La vía de transporte vesicular transcitótica parece jugar, por tanto, un papel importante en la secreción de los ácidos y lípidos biliares en los animales infectados a los 120 d.p.i. La reducción del flujo biliar que se produjo tras el tratamiento con colchicina en los animales infectados, fue inferior a la producida en la secreción de los ácidos biliares, lo que concuerda con lo indicado de que la coleresis observada en los animales a los 120 d.p.i. también dependería de un aumento en la FIAB.

Además, tras el tratamiento con colchicina, el desacoplamiento entre la secreción biliar de los ácidos biliares y lípidos biliares observado en los animales parasitados no tratados desaparece. El aumento en la capacidad solubilizante de los ácidos biliares sobre los lípidos biliares en condiciones basales parece derivarse, por tanto, de un aumento en la disponibilidad de colesterol y de fosfolípidos a la acción aquéllos sobre la cara externa de la membrana canalicular al encontrarse estimulado su transporte transcitótico como consecuencia de la dicroceliosis.

Los mecanismos mediante los cuales el parásito estimula la secreción de los ácidos biliares sensible a la actuación de la colchicina son desconocidos. Sin embargo, la estimulación del sistema de transporte vesicular podría derivarse del efecto de diversas sustancias tóxicas liberadas por el parásito o de sus propios metabolitos sobre dicho sistema. Como se ha indicado anteriormente, existen referencias de que la acción tóxica de *D. dendriticum* en el hígado se debería, principalmente, a los efectos de sus productos metabólicos vehiculados a la sangre desde la bilis. Una posible explicación podría ser la existencia de sustancias que, excretadas por el parásito a la bilis fueran reabsorbidas, accediendo de nuevo al hígado vía porta o a través de las arterias peribiliares, y que en los hepatocitos estimularan el transporte vesicular transcitótico.

Dicrocoelium dendriticum, a diferencia de otros trematodos hematófagos como *Fasciola hepatica*, se alimenta de bilis, mucina y células epiteliales descamadas (Alzieu y Ducos de Lahitte, 1991). El aumento en la secreción de ciertos componentes biliares puede suponer, por tanto, un aumento en la fuente de alimento para el parásito, lo que podría tener una significación fisiológica como mecanismo adaptativo del mismo.

Tras la administración de taurocolato, que produce una coleresis de origen canalicular, a los animales infectados y controles, se observó un incremento del flujo biliar respecto al flujo

existente en condiciones basales, si bien la coleresis observada fue mucho más marcada en los animales control que en los animales infectados a los 120 d.p.i.

El valor máximo de la secreción de los ácidos biliares en los animales control indica que, posiblemente, no se alcanzó la tasa de secreción máxima, ya que la suma de la secreción basal de los ácidos biliares (22 nmol/gh/min) y de la concentración administrada del ácido biliar exógeno (140 nmol/gh/min) fue inferior al valor máximo de secreción biliar. Ahora bien, en animales infectados a los 120 d.p.i., este valor se redujo de forma significativa por debajo de la suma de las tasas de secreción de los ácidos biliares endógenos y del taurocolato administrado. Bajo nuestras condiciones experimentales, el máximo en la secreción de ácidos biliares puede asumirse como la capacidad secretora máxima (SRmax).

Estudios previos sugieren que la tasa de secreción máxima de los ácidos biliares podría depender de la habilidad del hepatocito para restaurar la pérdida continua de lípidos de la membrana canalicular en la bilis (Yousef y cols., 1987), por la acción detergente de los ácidos biliares. Los lípidos biliares parecen transportarse hacia la membrana canalicular mediante vesículas ricas en fosfatidilcolina procedentes del retículo endoplasmático. Tras su inserción en la membrana canalicular constituirían las microzonas más ricas en esta sustancia (Coleman y Rahman, 1992). La integridad funcional de los mecanismos de transporte vesicular, relacionados con los mecanismos de reparación de la membrana, es imprescindible en la protección de los hepatocitos contra el efecto lesivo de los ácidos biliares durante la formación normal de la bilis (Crocenzi y cols., 1997).

En situaciones en las que se produce un estímulo de la vía de transporte vesicular, como sucede en nuestro estudio, existe un incremento en la secreción de ácidos biliares y de lípidos biliares, así como de otros constituyentes de la membrana canalicular, como la enzima fosfatasa alcalina. En tal situación podría superarse la capacidad del hepatocito de restituir los lípidos biliares extraídos de la membrana canalicular como respuesta a la administración de ácidos biliares exógenos, a partir de las reservas intracelulares (Lowe y cols., 1986), lo que a su vez induciría una disminución de la SRmax del taurocolato.

Por otra parte, la SRmax de taurocolato puede disminuir en situaciones en las que la actividad de los propios sistemas de transporte canalicular de los ácidos biliares se encuentre reducida (Azer y Stacey, 1996). Estudios previos llevados a cabo por Akerboom y cols. (1984), indican que la salida canalicular de taurocolato está estrechamente relacionada con el contenido intracelular de GSSG, existiendo una disminución de la misma al administrar compuestos que aumentan la concentración de GSSG, tales como hidroperóxido o diamida. En nuestro estudio, el incremento en la concentración hepática de GSSG descrito en los cricetos infectados puede estar relacionado con la disminución de la SRmax del taurocolato observada en dichos animales.

Si bien existe una menor coleresis y una menor secreción de ácidos biliares en los cricetos infectados a los 120 d.p.i. respecto a los cricetos control, tras el tratamiento con taurocolato, la secreción biliar de fosfolípidos, colesterol y fosfatasa alcalina correspondientes a la SRmax del taurocolato no presentó diferencias significativas entre ambos grupos. Existe, por tanto, un desacoplamiento entre la secreción biliar de los ácidos biliares y de los lípidos biliares, como ya indicamos para la secreción biliar basal. Se han descrito varias situaciones en las que la secreción biliar de los lípidos puede aumentar respecto a la secreción de los ácidos biliares, como consecuencia de tratamientos hormonales con etinil estradiol (Kern y cols., 1977), progesterona (Nervi y cols., 1983) o triyodotironina (Gebhard y cols., 1992) o de ciertas alteraciones en la dieta (Smit y cols., 1994). El desacoplamiento observado en nuestro estudio podría explicarse como una consecuencia de la estimulación de la vía vesicular de transporte existente en los animales infectados a los 120 d.p.i., que incrementaría la secreción de lípidos biliares, acompañado de una posible alteración en el sistema de transporte canalicular de los ácidos biliares, al producirse un acúmulo intrahepatocitario de GSSG. El sistema de transporte canalicular de los ácidos biliares, como hemos indicado, consiste en un transportador (cBST) dependiente de ATP (Meier, 1996), que constituye el paso limitante en la secreción a la bilis de los ácidos biliares (Nathanson y Boyer, 1991; Azer y Stacey, 1996). Al disminuir la concentración de los ácidos biliares en el canalículo en los animales infectados respecto a los animales control, el arrastre de los lípidos de membrana por su acción detergente sería menor, lo que justificaría la ausencia de diferencias significativas en la secreción de fosfolípidos y de colesterol detectada entre ambos grupos, a pesar de que su transporte hacia la membrana canalicular se encuentre estimulado.

La existencia de una circulación colehepática de los ácidos biliares es compatible con la existencia de un incremento en la salida de los lípidos biliares (Dumont y cols., 1980). Así, los ácidos biliares serían reabsorbidos por el epitelio biliar, captados por los hepatocitos a su paso por el hígado y secretados de nuevo, estimulando el flujo biliar canalicular y aumentando la secreción de lípidos biliares. Sin embargo, si está circulación existe, no parece intervenir en muchos de los cambios de la función biliar observados en la dicroceliosis, tales como el aumento del flujo biliar y de la secreción de ácidos biliares. De igual manera, en nuestro estudio no se detectaron ácidos biliares con un pKa elevado en la bilis de los animales infectados, siendo ésta una característica de los ácidos biliares relacionada con su circulación enterohepática, así como tampoco aumentó la secreción biliar de bicarbonato, lo que difiere de lo indicado en situaciones en las que existe circulación colehepática de los ácidos biliares.

Si bien hay que ser cautelosos a la hora de interpretar estos hallazgos, ya que en los animales parasitados existe un proceso inflamatorio y una compleja diversidad de lesiones histopatológicas, estos resultados indican que, en ausencia de administración de ácidos biliares exógenos, la estimulación de los mecanismos sensibles a la acción de la colchicina parece contribuir sustancialmente a la secreción de los ácidos biliares en la dicroceliosis. Este mecanismo,

probablemente, es el responsable del aumento inducido por el parásito en la secreción biliar de los ácidos biliares, el colesterol, los fosfolípidos y las proteínas de la membrana canalicular, los cuales pueden jugar un papel nutricional importante en la fisiología del parásito.

También contribuyen a la formación de la bilis canalicular diversos cambios metabólicos inducidos en el hígado por la presencia del parásito, mediante la inducción de estrés oxidativo, lo que provoca el aumento de la secreción biliar de glutatión. Además, en los animales infectados a los 120 d.p.i., la contribución de la bilis de los conductos biliares, pobre en nutrientes, a la secreción biliar total está reducida, no diluyéndose así la bilis canalicular. Los cambios inducidos por la dicroceliosis sobre la función biliar del hospedador definitivo parecen depender estrechamente de la duración de la infección, siendo prácticamente inexistentes en la primera etapa considerada de la misma (80 d.p.i.), pero que se van produciendo según aumenta el tiempo de permanencia del parásito en los conductos biliares. Si dichos cambios tienen una base evolutiva, jugando un papel en la fisiología del parásito o bien se trata de un fenómeno derivado del proceso infeccioso, es una interesante cuestión que requiere investigaciones posteriores.

5.3. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE EL SISTEMA GLUTATIÓN Y LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES HEPÁTICAS

La formación de intermediarios reactivos de oxígeno, tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno "singlet" (1O_2), en los sistemas biológicos depende del consumo de oxígeno y su producción puede causar daño celular mediante procesos de peroxidación lipídica. Además, la producción de radicales libres altera la estructura de las proteínas de membrana (Zhang y cols., 1990), y ambos procesos pueden dar lugar a alteraciones en las actividades enzimáticas asociadas a la membrana.

Se han descrito distintas situaciones patológicas en las cuales la existencia de estrés oxidativo y el aumento en la peroxidación lipídica se ha asociado con distintos tipos de daño hepático (Mourelle y Mezza, 1990; Panozzo y cols., 1995). El daño tisular que hemos descrito en la dicroceliosis podría deberse, al menos en parte, a la generación de especies reactivas de oxígeno. Así, en la oveja, la fasciolosis experimental induce un incremento simultáneo del calcio citosólico y una disminución del glutatión citosólico a las 8 semanas postinfección, cuando el proceso degenerativo celular hepático es máximo (Galtier y cols., 1986). Se han descrito alteraciones similares en ratas a las 3 y 6 semanas postinfección (Galtier y cols., 1987). El desarrollo de peroxidación lipídica ha sido descrito en hígado de ratas infectadas con *F. hepatica* (Facino y cols., 1989; González y cols., 1991; Galtier y cols., 1994). Se ha sugerido que el daño celular oxidativo observado en el curso de la fasciolosis sería una consecuencia de la destrucción tisular producida por las secreciones tóxicas de los parásitos (Galtier y cols., 1987).

Nuestros resultados indican que la dicroceliosis experimental, al igual que la fasciolosis, cursa con peroxidación lipídica, como se desprende del aumento significativo observado en la concentración hepática de los TBARS. La peroxidación lipídica derivada del estrés oxidativo produce malondialdehído, que puede interactuar con el DNA y causar citotoxicidad (Chaudhary y cols., 1994).

La determinación de los TBARS es el método más frecuentemente utilizado para valorar la producción de malondialdehído como marcador de peroxidación lipídica. Ahora bien, este método está sometido a crítica debido a las drásticas condiciones usadas en la prueba, que pueden inducir la producción artificial de malondialdehído y, además, porque algunas moléculas no lipídicas pueden ser fuente de los TBARS. Por dichas razones, deberían usarse al menos dos métodos distintos para establecer la existencia de peroxidación lipídica (Sergent y cols., 1995).

El GSH juega un papel fundamental, como antioxidante endógeno, en el mantenimiento del estado redox de la célula, pudiendo consumirse mediante reacciones de conjugación con compuestos endógenos y exógenos o mediante su oxidación a la forma disulfuro (GSSG) que se elimina principalmente a la bilis (Sies y cols., 1978; Kaplowitz y cols., 1983; Lauteburg y cols., 1984). La relación GSSG/GSH es un índice alternativo ampliamente utilizado en la determinación de la existencia de estrés oxidativo en los tejidos (Werner y Cohen, 1993). Dicha relación se mantiene muy baja en condiciones fisiológicas por la acción de la glutatión reductasa, conservando así la célula su capacidad de combatir el estrés oxidativo. Cuando un tejido se expone a gran cantidad de radicales libres dicha relación aumenta, provocando una alteración en el estado redox intracelular que puede dar lugar a la inactivación de distintas enzimas (Lieber y cols., 1990). Como hemos indicado, los animales infectados experimentalmente mostraron un incremento significativo de esta relación.

A pesar del aumento de dichos marcadores de peroxidación lipídica y de estrés oxidativo (TBARS y GSSG/GSH), la concentración hepática de DCF, índice de la concentración de hidroperóxidos, no resultó modificada por la parasitosis. Este hecho puede deberse a un posible aumento en la degradación de los hidroperóxidos, como se ha indicado en ratas intoxicadas con etanol (Sergent y cols., 1995). En la actualidad no se conocen los mecanismos mediante los cuales el parásito causa alteraciones oxidativas en el hígado pero, aparte del efecto irritativo desarrollado por el parásito, podrían estar relacionadas con la secreción de toxinas o de productos derivados de su metabolismo.

Las células de los mamíferos poseen, además de GSH, distintas defensas antioxidantes frente a los radicales libres, que incluyen las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión transferasa (GST) (Inoue, 1994). Estas enzimas realizan su función de forma acoplada para eliminar los intermediarios reactivos de oxígeno. Así, la SOD cataliza la conversión de radicales superóxido a peróxido de

hidrógeno, actuando seguidamente la catalasa que reduce dicho peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. La GPx protege a la célula del daño derivado de diversas especies oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos (Michiels y cols., 1994), que actúan causando peroxidación lipídica. Los resultados observados en este estudio sobre las distintas actividades del sistema enzimático antioxidante hepático indican que la microceliosis experimental influye de manera específica en la capacidad de defensa del hígado frente a un daño oxidativo.

La elevación significativa de la actividad enzimática glutatión peroxidasa total citosólica y mitocondrial en los animales infectados, debida fundamentalmente al aumento de la actividad GPx selenio dependiente, es de mayor entidad cuanto más prolongado es el período postinfección, lo que podría representar un cambio adaptativo frente al potencial daño hepático y reflejar la habilidad del hígado para eliminar el exceso de especies reactivas de oxígeno. Este aumento compensatorio de la actividad GPx selenio dependiente ha sido descrito en distintas situaciones, tales como el ejercicio extenuante o ciertas enfermedades hepáticas, que cursan con estrés oxidativo (Ji y cols., 1988; Pastor y cols., 1997). El hígado utiliza una elevada concentración de GSH en la reducción de peróxidos de hidrógeno y de peróxidos orgánicos, reacciones catalizadas por la GPx, por las cuales se transforma en GSSG. Este es un proceso de gran importancia en la protección de las membranas lipídicas contra la oxidación. De hecho, una de las principales funciones celulares del glutatión es el mantenimiento estructural de las membranas (Kosower y Kosower, 1978).

La actividad glutatión reductasa (GR) complementa la acción de las citadas enzimas antioxidantes al convertir el glutatión oxidado en reducido (Michiels y cols., 1994). La actividad GR disminuyó en los animales infectados, de forma más manifiesta a los 120 d.p.i., lo que parece indicar la existencia de una respuesta adaptativa subcelular en el hígado distinta para las diversas actividades enzimáticas del sistema antioxidante en el curso de la infección. Al disminuir la capacidad de regenerarse el GSSG por la acción de la GR, se produciría un acúmulo de glutatión oxidado en el hepatocito con los efectos ya descritos sobre el estado redox intracelular. Como hemos indicado en el apartado anterior, el exceso de GSSG se elimina fundamentalmente en la bilis, lo que podría explicar el aumento de la secreción biliar de glutatión y, por tanto, de la FIAB observadas en los cricetos infectados a los 120 d.p.i.

Existe un aumento en la relación GPx/GR en los cricetos infectados, que es más manifiesto cuanto más avanzada es la etapa de la infección. Dicha elevación puede ser indicativa de la existencia de daño oxidativo ya que la célula consume más GSH del que es capaz de regenerar, con lo que disminuye su capacidad de eliminar los peróxidos de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos derivados de la presencia del parásito, a pesar de que los cambios en las actividades GCS y GGT, descritos en el apartado anterior, producen un aumento de la síntesis y una disminución de la degradación del GSH.

Otra de las actividades enzimáticas perteneciente al sistema antioxidante celular es la actividad superóxido dismutasa. Hemos observado una disminución en la actividad SOD, tanto citosólica como mitocondrial, en los animales infectados, que es de mayor entidad según avanza el período postinfección. Dicha disminución podría deberse a la elevada formación de peróxidos de hidrógeno derivados de la dismutación de aniones superóxido como consecuencia del aumento en la producción de dichos aniones asociados a una situación de estrés oxidativo (Hodgson y Fridovich, 1975; Santiard y cols., 1995). Se ha descrito un hallazgo similar en ratas a las que se les administró etanol de forma crónica (Nanji y cols., 1995; Sergent y cols., 1995). La actividad SOD mitocondrial también disminuyó en ratas sometidas a estrés oxidativo mediante la oclusión y reperfusión de la vena cava suprahepática, como consecuencia de la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial y del aumento en la formación de peróxidos de hidrógeno (González-Flecha y cols., 1993). La mitocondria es una fuente importante de intermediarios reactivos de oxígeno, por lo que la inhibición de la actividad SOD mitocondrial puede incrementar aún más la producción de aquéllos, facilitando de esta forma el desarrollo del estrés oxidativo derivado de la dicroceliosis.

Diversas relaciones entre diferentes actividades enzimáticas antioxidantes se han utilizado como índices de estrés oxidativo. Éstas pueden orientar sobre el estado y los posibles mecanismos adaptativos del sistema de enzimas antioxidantes en una situación de daño oxidativo (Hong y Johnson, 1995; Somani y cols., 1997). En nuestro estudio, la relación entre las actividades catalasa/SOD aumentó significativamente en los cricetos infectados, siendo esta elevación más manifiesta a medida que evolucionaba el proceso. La relación GPx total/SOD sólo aumentó significativamente a los 120 d.p.i.

Los aumentos de dichas relaciones enzimáticas parecen indicar cierta incapacidad de tales enzimas para eliminar de una forma suficientemente eficiente las especies reactivas de oxígeno generadas, lo que confirmaría los resultados obtenidos respecto a los aumentos en la concentración hepática de TBARS y en la relación GSSG/GSH y, por tanto, en la existencia de estrés oxidativo.

Las glutatión S-transferasas (GST) son una familia de enzimas que catalizan la conjugación de una amplia variedad de compuestos electrófilos hidrófobos y tienen, además, actividad GPx selenio independiente (Inoue, 1994). Se ha descrito una disminución en la actividad GST citosólica en ratas y en ovejas infectadas con *Fasciola hepatica* (Galtier y cols., 1986; 1987; 1991; Biro-Sauveur y cols., 1995), lo que podría explicar la alteración en la excreción biliar de compuestos tales como sulfobromoftaleína que se conjuga con el glutatión en el hígado (González y cols., 1991). En contraste con estos resultados, observados en la fasciolosis, en el presente trabajo la actividad GST aumentó en los cricetos infectados a los 120 d.p.i, sin que se modificara a los 80 d.p.i.

Como hemos indicado, la regulación del sistema de enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo parece depender de la evolución de la dicroceliosis en el criceto, aumentando las consecuencias nocivas cuanto más prolongado es el período desde la infección (120 d.p.i.).

La inadecuada actividad de las enzimas antioxidantes observada conlleva una disminución en la capacidad de protección de la célula frente al estrés oxidativo, da lugar a un mayor daño oxidativo tisular e inicia un círculo vicioso con un aumento en la producción de radicales libres que supera la capacidad antioxidante hepática, lo que a su vez favorece un mayor daño oxidativo.

Los cambios específicos encontrados en las actividades enzimáticas antioxidantes y en el sistema glutatión pueden estar relacionados con distintos factores, tales como la posible acción específica de los productos tóxicos derivados del metabolismo de los parásitos adultos, la respuesta inflamatoria de los animales a la presencia del parásito y/o la particular localización de las enzimas en diversas áreas de los lóbulos hepáticos.

En resumen, los hallazgos encontrados en el presente trabajo indican que, a pesar de que la dicroceliosis cursa con la activación de algunas enzimas antioxidantes y un incremento en la síntesis de glutatión, existe una ineficiente eliminación de las especies de oxígeno reactivo lo que conlleva un daño oxidativo en el hígado que es de mayor entidad cuanto más prolongado es el período postinfección.

5.4. EFECTOS DE LA DICROCELIOSIS EXPERIMENTAL SOBRE EL SISTEMA DE MONOOXIGENASAS DEPENDIENTES DEL CITOCROMO P-450

Los resultados obtenidos en el presente estudio, respecto a los efectos de la dicroceliosis sobre el funcionamiento del sistema oxidativo microsómico hepático, ponen de manifiesto la existencia de una disminución significativa en la concentración de citocromo P-450 en los animales infectados a los 80 y a los 120 d.p.i. respecto a los animales control. Una reducción similar ha sido observada en ratas y en ovejas infectadas con *Fasciola hepatica* durante el período correspondiente a la migración de los parásitos a través del parénquima hepático (Galtier y cols., 1983; 1986; 1987; 1994; Facino y cols., 1985; Elsheikh y cols., 1992; López y cols., 1994; Biro-Sauveur y cols., 1995). Esta deplección puede ser debida a un incremento del catabolismo del citocromo o a una inactivación del mismo, unido a una disminución en su síntesis. Así, la aparición del citocromo P-420, durante algunas infecciones parasitarias (fasciolosis y amebiasis hepáticas), indica la existencia de una degradación del citocromo P-450 a sus formas catalíticamente inactivas (Tekwani y cols., 1988).

Como hemos indicado, el citocromo P-450 funciona como oxidasa terminal del sistema de monooxigenasas microsómico encargado del metabolismo tanto de compuestos endógenos como de xenobióticos (Ziegler, 1994). Todos los citocromos P-450 hepáticos son proteínas

integrales de membrana, habiéndose caracterizado distintas isoformas que se agrupan dentro de una superfamilia de genes, que integra a su vez distintas familias de genes entre las que destacan: la CYP1, la CYP2 y la CYP3, a las que pertenecen la mayoría de las isoenzimas P-450 relacionados con el metabolismo de fármacos (Nebert y cols., 1991). Las distintas familias de proteínas no sólo se diferencian en su estructura y propiedades fisicoquímicas, sino también en su especificidad por distintos sustratos (Gonzalez, 1992; Ziegler, 1994).

Las actividades monooxigenasas determinadas en el presente estudio, representativas de dichas familias de citocromo P-450, han sido progresiva y diferencialmente alteradas por la infección. Así, las actividades anilina hidroxilasa y etoxicumarina O-desetilasa disminuyeron en ambos períodos postinfección, mientras que las actividades aminopirina N-desmetilasa y eritromicina N-desmetilasa sólo se mostraron reducidas en la fase más avanzada de la parasitosis (120 d.p.i.).

De forma similar, se ha descrito en el curso de la fasciolosis una inhibición selectiva de las isoformas del citocromo P-450 inducibles por el fenobarbital, sin que se modificaran las isoformas inducibles por metilcolantreno (Tujenkji y cols., 1988). En la rata, la fasciolosis altera las actividades microsómicas aminopirina N-desmetilasa y anilina hidroxilasa, sin afectar a las actividades NADPH citocromo c reductasa y 7-etoxicumarina O-desetilasa (Galtier y cols., 1983; 1985). Sin embargo, en estudios posteriores se detectó una alteración de la actividad 7-etoxicumarina O-desetilasa en ratas infectadas con *F. hepatica* (Galtier y cols., 1994; López y cols., 1994). La disminución en la concentración del citocromo P-450 microsómico y en las actividades monooxigenasas asociadas, descritas en la fase aguda de la fasciolosis, varían según sean o no tratados los animales infectados con fenobarbital o con aroclor 1254, lo que sugiere que ciertas isoenzimas del citocromo P-450 están selectivamente alteradas por la fasciolosis (Galtier y cols., 1985).

En ovejas infectadas con *F. hepatica*, las actividades aminopirina N-desmetilasa, 7-etoxicumarina O-desetilasa y anilina hidroxilasa también disminuyeron (Galtier y cols., 1986; Elsheikh y cols., 1992). Se ha demostrado que la exposición a diversos agentes químicos puede inducir alteraciones selectivas en la actividad de una o más familias del citocromo P-450 (Ioannides y Parke, 1987; 1990; Watkins, 1992). Asimismo, se han descrito en ovejas y en ratas infectadas con *F. hepatica* diferencias en la alteración de las distintas actividades según la fase de la enfermedad (Galtier y cols., 1983; 1986; 1987; Facino y cols., 1985; Elsheikh y cols., 1992; Biro-Sauveur y cols., 1995).

Diversos mecanismos pueden ser la causa de la alteración selectiva de diversas monooxigenasas en los cricetos infectados. Las enzimas citocromo P-450 están integradas en la membrana como proteínas embebidas en la matriz, por lo que, en situaciones en las que la fluidez de la misma se vea alterada, puede verse afectada la función de dichas actividades enzimáticas

microsómicas como consecuencia de una posible modificación de la movilidad lateral y/o rotacional de diversos componentes del sistema oxidativo microsómico.

Se ha demostrado, en diversos modelos experimentales, que la función de las actividades citocromo P-450 puede verse afectada por la existencia de alteraciones en la fluidez microsómica. Así, en ratones con obesidad congénita existe una disminución en la afinidad con la que la benzfetamina y la anilina se unen al citocromo P-450 que parece estar asociada a una disminución en la fluidez de la membrana microsómica hepática (Rouer y cols., 1980). Por otra parte, se ha indicado la existencia de una relación directa entre la fluidez de la membrana microsómica y la actividad colesterol 7 α -hidroxilasa microsómica (Freese y cols., 1987), así como también se ha observado una correlación positiva entre la actividad aminopirina N-desmetilasa y la fluidez de la membrana en hígados cirróticos (Reichen y cols., 1992). De forma semejante, en la infección experimental de ratas con *F. hepatica*, la depleción del citocromo P-450 y la inhibición de algunas de las actividades monooxigenasas microsómicas se asoció a una alteración en el estado físico de dicha membrana (López y cols., 1994).

La ausencia de cambios en la polarización de la membrana microsómica en los animales infectados respecto a los controles, en nuestro estudio, indica que podemos descartar como causa de las alteraciones del metabolismo de los fármacos y otros xenobióticos inducidas por la dicroceliosis una alteración en el estado físico de dicha membrana. Debe existir, por tanto, otro mecanismo responsable de la disminución en la función microsómica de los hígados infectados. La reducción en las actividades de las monooxigenasas estudiadas puede ser debida, al menos en parte, a la disminución de la concentración hepática del citocromo P-450.

La alteración específica de diferentes isoenzimas de citocromo P-450 puede estar relacionada, como se ha sugerido por diversos autores en el curso de la fasciolosis (Galtier y cols., 1985; 1986; 1987; 1991; Elsheikh y cols., 1992; López y cols., 1994), a una acción específica de la excreción de sustancias tóxicas o a productos propios del metabolismo del parásito. En el caso de la fasciolosis, estas sustancias tóxicas parecen actuar durante la migración histofágica de los vermes a través del parénquima hepático (Jubb y cols., 1993). Mediante estudios ultraestructurales se ha indicado que, en la infección por *Fasciola hepatica*, la disminución en la actividad de las oxidasas de función mixta era debida, probablemente, a un daño directo sobre el retículo endoplasmático de los hepatocitos causado por los parásitos en su migración (Tekwani y cols., 1988). Así, tanto la concentración del citocromo P-450 como las actividades de las monooxigenasas dependientes del mismo, que se encontraban alteradas en la fase aguda de la enfermedad, recuperaron los valores normales al alcanzar la fase crónica, cuando el parásito se localiza en los conductos biliares (Galtier y cols., 1983; 1985; 1986; 1994; Elsheikh y cols., 1992; López y cols., 1994). En nuestro estudio, existe una alteración progresiva de las actividades de las monooxigenasas microsómicas por acción del parásito, indicando un mayor efecto lesivo cuanto mayor es el tiempo transcurrido desde la infección.

Teniendo en cuenta la evolución en el tiempo de las alteraciones observadas y las características migratorias de *D. dendriticum*, las excreciones tóxicas o metabolitos producidos por él podrían actuar alcanzando el parénquima hepático a través del torrente sanguíneo desde su localización en los conductos biliares y ejercer, posteriormente, su acción lesiva en el mismo.

Como hemos indicado, el parásito podría ejercer su acción tóxica mediante una alteración del estado redox intracelular causando peroxidación lipídica, lo que a su vez podría explicar, al menos en parte, el daño hepático observado y la presumible reducida capacidad para la biotransformación de fármacos y otros xenobióticos derivada de esta parasitosis. Aunque los radicales libres pueden interactuar con cualquier estructura, son los ácidos grasos poliinsaturados, que forman parte de la mayoría de las estructuras membranosas de la célula, los más susceptibles (Halliwell y Chirico, 1993). Además, la producción de radicales libres altera la estructura de las proteínas de membrana (Zhang y cols., 1990), y ambos procesos pueden dar lugar a alteraciones en las actividades enzimáticas asociadas a la membrana como son las actividades de las monooxigenas dependientes del citocromo P-450 (Pastor y cols., 1996).

Asimismo, la particular localización de dichas enzimas en áreas específicas de los lóbulos hepáticos podría ser una explicación plausible de su inhibición selectiva por la dicroceliosis, posibilidad descrita también en el caso de la fasciolosis (Galtier y cols., 1986; López y cols., 1994).

En resumen, el presente estudio muestra que el efecto de la dicroceliosis experimental sobre las enzimas metabolizadoras de fármacos en el criceto, podría alterar la capacidad del hígado para biotransformar fármacos y otros xenobióticos, lo que puede tener consecuencias fisiológicas, farmacológicas y/o toxicológicas en los animales parasitados. De esta forma, los fármacos utilizados en el tratamiento de la dicroceliosis o de cualquier otra patología pueden acumularse en el organismo del animal, debido a alteraciones en su proceso de excreción, ocasionando un riesgo potencial no sólo para dichos animales, sino también para los humanos que consuman leche y carne con residuos químicos. Es necesario, por tanto, considerar las pautas terapéuticas utilizadas en el tratamiento de la dicroceliosis con el fin de evitar una posible toxicidad de los mismos y mejorar la eficacia de los tratamientos.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

La dicroceliosis experimental origina en el criceto, a los 120 d.p.i., una coleresis de origen canalicular, como sugiere el aumento de la depuración biliar de manitol [^{14}C]. Dicha coleresis se acompaña de un incremento en la secreción de los ácidos biliares y del glutatión a la bilis, lo que parece indicar la participación tanto de la fracción dependiente como de la fracción independiente de los ácidos biliares en el fenómeno colerético.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

Los cambios histopatológicos descritos en el sistema de conductos biliares de los cricetos infectados, consistentes en una hiperplasia de su epitelio y una fibrosis de la pared de los mismos, parecen inducir un incremento de su función de reabsorción frente a su función secretora, reduciéndose la contribución de los conductos biliares a la secreción biliar total.

CONCLUSIÓN TERCERA

El incremento de la secreción biliar de los ácidos biliares se acompaña de un aumento en la secreción de fosfolípidos, colesterol y proteínas de la membrana canalicular. Dicho efecto parece derivarse de una estimulación de la vía de transporte mediado por vesículas, sensible a la acción de la colchicina, sin que se encuentre estimulada la síntesis de los ácidos biliares ni se observen modificaciones importantes en su perfil biliar.

CONCLUSIÓN CUARTA

La administración de taurocolato sódico a los 120 d.p.i. induce una menor respuesta colerética y una disminución en la tasa de secreción máxima de los ácidos biliares, indicando la existencia de una alteración en los mecanismos de transporte canalicular de los mismos cuando su concentración hepática es elevada.

CONCLUSIÓN QUINTA

La dicroceliosis experimental cursa en el criceto con una modificación de las reacciones de destoxificación de fase I, como indica la alteración específica y progresiva de diferentes isoenzimas del citocromo P-450, sin que se modifique el estado físico de la membrana en la que se encuentran integradas. Dicha alteración podría deberse a una acción específica de la excreción de sustancias tóxicas o a productos propios del metabolismo del parásito.

CONCLUSIÓN SEXTA

La dicroceliosis experimental origina en el criceto un fenómeno de estrés oxidativo puesto de manifiesto por el incremento de la concentración de TBARS y de la relación glutatión oxidado/glutatión reducido en el hígado. A pesar de producirse una activación progresiva de algunas de las enzimas antioxidantes y un incremento en la síntesis de glutatión, existe una eliminación insuficiente de radicales libres con aparición de un daño oxidativo en el hígado.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA

El aumento de la secreción biliar de glutatión observado a los 120 d.p.i. parece derivarse del aumento de su síntesis y de la disminución de su degradación. La mayor secreción del tripéptido a la bilis se relaciona con la necesidad de eliminar el exceso de glutatión oxidado formado en el hígado como consecuencia del estrés oxidativo causado por el parásito.

León, 25 de Septiembre de 1998

Fdo: Sonia Sánchez Campos

7. BIBLIOGRAFÍA

ACCATINO, L., CONTRERAS, A., FERNÁNDEZ, S. y QUINTANA, C. (1979). The effect of complete biliary obstruction on bile flow and bile acid secretion: Postcholestatic cholestasis in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 93, 706-717.

ADACHI, Y., KOBAYASHI, H., KURUMI, Y., SHOUJI, M., KITANO, M. y YAMAMOTO, T. (1991). ATP-dependent taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles. *Hepatology* 14, 655-659.

ADAMS, J.D., LAUTEBURG, B.H. y MITCHELL, J.R. (1983). Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227, 749-754.

AHMED, H.A., JAZRAWI, R.P., GOGGIN, P.M., DORMANDY, J. y NORTHFIELD, T.C. (1995). Intrahepatic biliary cholesterol and phospholipid transport in humans: effect of obesity and cholesterol cholelithiasis. *J. Lipid Res.* 36, 2562-2573.

AINSWORTH, M.A., LADEGAARD, L., SVENDSEN, P., CANTOR, P. y OLSEN, O. (1991). Pancreatic, hepatic and duodenal mucosal bicarbonate secretion during infusion of secretin and cholecystokinin. Evidence of the importance of hepatic bicarbonate in the neutralization of acid in the duodenum of anaesthetized pigs. *Scan. J. Gastroenterol.* 26, 1035-1041.

AKERBOOM, T., BILZER, M. y SIES, H. (1982). The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione content in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 257, 4248-4252.

AKERBOOM, T., BILZER, M. y SIES, H. (1984). Relation between glutathione redox changes and biliary excretion of taurocholate in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 259, 5838-5843.

AKERBOOM, T. y SIES, H. (1989). Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol.* 173, 532-534.

ALESSIO, H.M. y GOLDFARB, A.H. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J. Appl. Physiol.* 64, 1333-1336.

ALIEV, S.Y. (1968). Pathomorphological changes during dicrocoeliosis. *Materiali k nauknoi Konferentsii Vsesoiusnovo Obchestva Gelmintologov, Part I*, pp. 20-26.

ALMÉ, B., BREMMELGAARD, A., SJÖVALL, J. y THOMASSEN, P. (1977). Analysis of metabolic profiles of bile acids in urine using a lipophilic anion exchanger and computerized gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 18, 339-362.

ALPINI, G., LENZI, R., SARKOZI, L. y TAVOLONI, N. (1988). Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J. Clin. Invest.* 81, 569-578.

ALPINI, G., LENZI, R., ZHAI, W.R., SLOTT, P.A., LIU, M.H., SARKOZI, L. y TAVOLONI, N. (1989). Bile secretory function of intrahepatic biliary epithelium in the rat. *Am. J. Physiol.* 257, G124-G133.

ALUNDA, J.M. (1984). Ecología de *D. dendriticum* en León. Ed. Institución "Fray Bernardino de Sahagún". Excma. Diputación Provincial de León. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CECEL).

ALUNDA, J.M. y ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (1983). Survival and infectivity of *Dicrocoelium dendriticum* eggs under field conditions in NW Spain. *Vet. Parasitol.* 13, 245-249.

ÁLVAREZ-NOGAL, R., MANGA-GONZÁLEZ, M.Y., GONZÁLEZ-LANZA, C. y DEL POZO CARNERO, P. (1992). Preliminary study on *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). First larval stages in experimentally infected *Cermea (Xeromagna) cespitum arigonis* (Mollusca). *Vith European Multicolloquium of Parasitology*. The Hague, The Netherlands, September, 163.

ALVARO, D., CANTAFORA, A., ATILI, A.F., CORRADINI, S.G., DE LUCA, C., MINERVINI, G., DI BIASE, A. y ANGELICO, M. (1986). Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 551-554.

ALZIEU, J.P. y DUCOS DE LAHITTE, J. (1991). La dicroceliose chez les bovins. *Bulletin des G.T.V.* 6, 135-146.

ANDERSON, M.E. y MEISTER, A (1986). Inhibition of gamma-glutamyl amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5029-5032.

ANUNDI, I., HOEGBERG, J. y STEAD, A.H. (1979). Glutathione depletion in isolated hepatocytes: its relation to lipid peroxidation and cell damage. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 45, 45-51.

ANWER, M.S. (1991). Anatomy and physiology of bile formation. *Prog. Pharm. Clin. Pharm.* 8, 3-24.

ANWER, M.S., HONDALUS, M.K. y ATKINSON, J.M. (1989). Ursodeoxycholate induces changes in hepatic $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchange and biliary bicarbonate excretion. *Am. J. Physiol.* 257, G371-G379.

APSTEIN, M.D. (1984). Inhibition of biliary phospholipid and cholesterol secretion by bilirubin in the Sprague-Dawley and Gunn rats. *Gastroenterology* 87, 634-638.

APSTEIN, M.D. y ROBINS, S.J. (1982). Effect of organic anions on biliary lipids in the rat. *Gastroenterology* 83, 1120-1126.

ARIAS, I.M. y FORGAC, M. (1984). The sinusoidal domain of the plasma membrane of rat hepatocytes contains an amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiport. *J. Biol. Chem.* 259, 5406-5408.

ARRESE, M., PIZARRO, M., SOLIS, N. y ACCATINO, L. (1997). Adaptative regulation of hepatic bile salt transport: role of bile salt hydrophobicity and microtubule-dependent vesicular pathway. *J. Hepatol.* 26, 694-702.

AXELSON, M., SHODA, J., SJÖVALL, J., TOLL, A. y WIKVALL, K. (1992). Cholesterol is converted to 7 - hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid in liver mitochondria. Evidence for a mitochondrial sterol 7 - hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 267, 1701-1704.

AXELSON, M. y SJÖVALL, J. (1974). Separation and computerized gas chromatography-mass spectrometry of unconjugated neutral steroids in plasma. *J. Steroid Biochem.* 5, 733-738.

AXELSON, M. y SJÖVALL, J. (1990). Potential bile acid precursors in plasma possible indicators of biosynthetic pathways to cholic acid and chenodeoxycholic acid in man. *J. Steroid Biochem.* 36, 631-640.

AYUPOV, K.V. (1967). Pathogenesis of *Dicrocoelium* infection. *Veterinariya* 43, 41-42.

AZER, S.A. y STACEY, N.H. (1996). Current concepts of hepatic uptake, intracellular transport on biliary secretion of bile acids: physiological and pathophysiological changes in cholestatic liver dysfunction. *J. Gastroenterol.* 11, 396-407.

BALABAUD, C., KRON, K.A. y GUMUCIO, J.J. (1977). The assessment of the bile salt nondependent fraction of canalicular bile water in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 89, 393-399.

BALLATORI, N. y TRUONG, A.T. (1989). Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am. J. Physiol.* 256, G22-G30.

BALLATORI, N. y TRUONG, A.T. (1992). Glutathione as a primary driving force in hepatic bile formation. *Am. J. Physiol.* 263, G617-G624.

BALLATORI, N., TRUONG, A.T., MA, A.K. y BOYER, J.L. (1989). Determinants of glutathione efflux and biliary GSH/GSSG ratio in the perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 256, G482-490.

BARNHART, J.L. y COMBES, B. (1976). Biliary excretion of dye in dogs infused with BSP or its glutathione conjugate. *Am. J. Physiol.* 231, 339-407.

BARNWELL, S.G., LOWE, P.J. y COLEMAN, R. (1984). The effects of colchicine on secretion into bile of bile salts, phospholipids, cholesterol and plasma membrane enzymes: bile salts are secreted unaccompanied by phospholipids and cholesterol. *Biochem. J.* 220, 723-731.

BATTA, A.K., ARORA, R., SALEN, G., TINT, G.S., ESKREIS, D. y KATZ, S. (1989). Characterization of serum and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: effect of ursodeoxycholic acid treatment. *J. Lipid Res.* 30, 1953-1962.

BEATRICE, M.C., STIERS, D.L. y PFEIFFER, D.R. (1984). The role of glutathione in the retention of Ca^{+2} by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259, 1279-1287.

BEDI, A.J.K. e ISSEROFF, H. (1979). Bile duct hyperplasia in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 9, 401-404.

BEER, F., MEIER, P.J. y STIEGER, B. (1993). Evidence for the presence of a phosphatidylcholine translocator in isolated rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 268, 3976-3979.

BELLENTANI, S., PECORARI, M., MARCHEGIANO, P., MANENTI, F., BOSISIO, E., DE FABIANI, E. y GALLI, G. (1987). Taurine increases bile acid pool size and reduces bile saturation index in the hamster. *J. Lipid Res.* 28, 1021-1027.

BERRY, C.I. y DARGIE, J.D. (1976). The role of host nutrition in the pathogenesis of ovine fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 2, 317-332.

BIRO-SAUVEUR, B., EECKHOUTTE, C., BAEZA, E., BOULARD, C. y GALTIER, P. (1995). Comparison of hepatic and extrahepatic drug-metabolizing enzyme activities in rats given single or multiple challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 25, 1193-1200.

BJÖRKHEM, K., LILEQVIST, L., NILSELL, K. y EINARSSON, K. (1986). Oxidoreduction of different hydroxyl groups in bile acids during their enterohepatic circulation in man. *J. Lipid Res.* 27, 177-182.

BLACK, S.D. y COON, M.J. (1987). P450 cytochromes: structure and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 60, 35-87.

BLITZER, B.L. y BOYER, R.L. (1982). Cellular mechanisms of bile formation. *Gastroenterology* 82, 346-357.

BOCH, J. y SUPPERER, R. (1982). *Parasitología en Medicina Veterinaria*. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.

BODE, L. y GEYER, E. (1981). Experimental dicroceliasis: the humoral immune response of golden hamsters and rabbits to primary infection with *Dicrocoelium dendriticum*. *Z. Parasiten.* 66, 167-178.

BORAY, J.C. (1985). Flukes of Domestic Animals. En: *Parasites, pests and predators. (World Animal Science B2)*. Ed. S.M. Gaafar, W.E. Howard y R.E. Marsh. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 179-185.

BORCHET, A. (1981). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 745-750.

BORG, D.C. y SCHAICH, K.M. (1984). Cytotoxicity from coupled redox cycling of autooxidizing xenobiotics and metals. A selective critical review and commentary on work-in-progress. *Isr. J. Chem.* 24, 38-53.

BOYER, J.L. (1986). Mechanisms of bile secretion and hepatic transport. En: *Physiology of membrane disorders*. Ed. T.E. Andreoli, J.F. Hoffman, D.D. Fanestil y S.G. Schultz. Plenum Publishing Corp., Nueva York, pp. 609-636.

BOYER, J.L. (1996). Bile duct epithelium: frontiers in transport physiologic. *Am. J. Physiol.* 270, 1-5.

BOYER, J.L. y KLATSKIN, G. (1970). Canalicular bile flow and bile secretory pressure: evidence for a nonbile salt dependent fraction in isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 59, 853-859.

BRAVO, A., PASTOR, A., ALMAR, M., COLLADO, P.S. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1997). Effects of S-adenosylmethionine and N-acetylcysteine on the histological changes induced by biliary obstruction in the rat. *Biochem. Res.* 18, 279-286.

BREIMER, D.D. (1983). Interindividual variations in drug disposition. Clinical implications and methods of investigation. *Clin. Pharmacokinet.* 8, 371-377.

BREZA, M. y SVARC, R. (1968). Eine einfache methode zur bestimmung der eierzahl gastroinfestionaler brongilaten aus dem faeces der Wiederkauer. *Studia Helminthol.* 2, 89.

BRUNNERT, S.R. y ALTMAN, N.H. (1991). Laboratory assessment of chronic hepatitis in Syrian hamsters. *Lab. An. Sci.* 41, 559-562.

BUANES, T., GROTMOL, T., LANDSVERK, T. y RAEDER, M. (1988). Secretin empties bile duct cell cytoplasm of vesicles when it initiates ductular HCO₃⁻ secretion in the pig. *Gastroenterology* 95, 417-424.

BULGIN, M.S., ANDERSON, B.C., HALL, R.F. y LANG, B.Z. (1984). Serum gamma glutamyl transpeptidase activity in cattle with induced fascioliasis. *Res. Vet. Sci.* 37, 167-171.

BURK, R.F., NISHIKI, K., LAWRENCE, R.A. y CHANCE, B. (1978). Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in haemoglobin-free perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 253, 43-46.

BURR, R., SCHWENK, M. y PFAFF, E. (1977). Interaction of sulfobromophthalein with mitochondrial membrane. Inhibition of respiration. *Biochem. Pharmacol.* 26, 461-466.

CABANAS, E. (1995). *Estudio del ciclo biológico de Dicrocoelium dendriticum (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 en condiciones naturales*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León.

CABANAS, E., MANGA-GONZÁLEZ, M.Y. y GONZÁLEZ-LANZA, M.C. (1989). Eliminación mensual de huevos de *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) por ovinos marcados en los montes Cántabro-Leoneses. *Actas del VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología*, Cáceres, septiembre, 126.

CADENAS, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79-110.

CAMPO, R. (1996). *Estudios Experimentales sobre la Dicroceliosis*. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

CAMPO, R., MANGA GONZÁLEZ, M.Y., GONZÁLEZ LANZA, C. y DÍEZ BAÑOS, N. (1993). Infestación experimental de corderos con *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda): Eliminación de huevos y carga parasitaria. *Acta Parasitológica Portuguesa* 1, Supl. 1, 2.

CAPRON, J.P. y ERLINGER, S. (1975). Barbiturates and biliary function. *Digestion* 12, 43-56.

CAREY, M.C. (1978). Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J. Lipid Res.* 19, 945-955.

CAREY, M.C. y DUANE, W.C. (1994). Enterohepatic circulation. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D. Schachter y D.A. Schafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 719-767.

CAREY, M.C. y MAZER, N.A. (1984). Biliary lipid secretion in healthy and in cholesterol gallstone disease. *Hepatology* 4, 31S-37S.

CAREY, M.C., SMALL, D.M. y BLISS, C.M. (1983). Lipid digestion and absorption. *Ann. Rev. Physiol.* 45, 651-677.

CATHCART, R., SCHWIERS, E. y AMES, B. (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem.* 134, 111-116.

CAVANI, C., LOSI, G., MANFREDINI, M., PAVONCELLI, R.M., PIETROBELLI, M. y RESTANI, R. (1982). Ricerche sull'influenza della dicroceliasi sulle caratteristiche quantitative e qualitative della produzione di latte in pecore. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 3, 59-63. En: *Helminth. Abstr.* (1983), 52, n°1444.

CHANCE, B. y MACHLEY, A.L. (1955). Assays of catalases and peroxidases. *Methods. Enzymol.* 2, 764-775.

CHANCE, B. SIES, H. y BOVERIS, A. (1979). Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.

CHANDRA, G. (1973). First detection of *Dicrocoelium* eggs in the faeces of experimentally infected lambs, guinea pigs and pigs. *Haaryana Agricultural University Journal of Research* 3, 31-37.

CHAUDHARY, A.K., NOKUBO, M., REDDY, G.R., YEOLA, S.N., MORROW, J.D., BLAIR, I.A. y MARNETT, L.J. (1994). Detection of endogenous malodialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 265, 1580-1582.

CHEN, T.C. (1978). *Parasitología general*. Ed. AC, Madrid.

CHOWDHURY, N.R., ARIAS, I.M., LEDERSTEIN, M. y CHOWDHURY, J.R. (1986). Substrates and products of purified rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Hepatology* 6, 123-128.

COHEN, D.E. (1996). Hepatocellular transport and secretion of biliary phospholipids. *Sem. Liver Dis.* 16, 191-200.

COHEN, D.E. y CAREY, M.C. (1990). Physical chemistry of biliary lipids during bile formation. *Hepatology* 12, 143-148.

COHEN, D.E., LEONARD, M.R. y CAREY, M.C. (1994). In vitro evidence that phospholipid secretion into bile may be coordinated intracellularly by the combined of bile salts and the specific phosphatidylcholine transfer protein of liver. *Biochemistry* 33, 9975-9980.

COLELL, A., GARCÍA-RUIZ, C., MORALES, A., BALLESTA, A., OOKHTENS, M., RODES, J., KAPLOWITZ, N. y FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. (1997). Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplast from ethanol-treated rats: effects of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology* 26, 699-708.

COLEMAN, R. (1987). Biochemistry of bile secretion. *Biochem. J.* 244, 249-261.

COLEMAN, R., IQVAL, S., GODFREY, P.P. y BILLINGTON, D. (1979). Membranes and bile formation: composition of several mammalian biles and their membrane-damaging properties. *Biochem. J.* 178, 201-208.

COLEMAN, R. y RAHMAN, K. (1992). Lipid flow in bile formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1125, 113-133.

COLEMAN, R., RAHMAN, K., BELLRINGER, M.E., KAN, K. y HAMLIN, S. (1989). Secretion of biliary lipids and its control. En: *Trends in bile acid research*. Ed. G. Stiehl, A. Strefl y W. Gerok. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 161-175.

COLLADO, P.S., MUÑOZ, M.E., ESTELLER, A. y GONZÁLEZ, J. (1988). Influence of bile acids on the biliary transport maximum of phenolsulfophthalein in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Biochim.* 96, 17-23.

CORDERO DEL CAMPILLO, M., CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L y REGUERA-FEO, A. (1994). *Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de León, León.

CRAPO, J.D. y TIERNEY, D.F. (1974). Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.* 226, 1401-1407.

CRAWFORD, J.M. (1997). Bile salt stimulation of biliary phospholipid secretion. En: *Bile Acids in Hepatobiliary Diseases, Basic Research and Clinical Application*. Ed. G. Paumgartner, A. Stiehl y W. Gerok. Kluwer Academic Publishers, Londres, pp. 224-227.

CRAWFORD, J.M., BARNES, S., STEARNS, R.C., HASTING, O.L. y GODLESKI, J.J. (1994). Ultrastructural localization of a fluorinated bile salt in hepatocytes. *Lab. Invest.* 71, 42-51.

CRAWFORD, J.M., BERKEN, C. y GOLLAN, J.L. (1988). Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport. *J. Lipid Res.* 29, 144-156.

CRAWFORD, J.M., MÖCKEL, G.-M., CRAWFORD, A.R., HAGEN, S.J., HATCH, V.C., BARNES, S., GODLESKI, J.J. y CAREY, M.C. (1995). Imaging biliary lipid secretion in the rat: ultrastructural evidence for vesiculation of the hepatocyte canalicular membrane. *J. Lipid Res.* 36, 2147-2163.

CRAWFORD, J.M., VINTER, D.W. y GOLLAN, J.L. (1991). Taurocholate induces pericanalicular localization of C6-NBD-ceramide in isolated hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 260, G119-G132.

CROCENZI, F.A., SISTI, A., PELLEGRINO, J.M. y ROMA, M.G. (1997). Role of bile salts in colchicine induced hepatotoxicity: implications for hepatocellular integrity and function. *Toxicology* 121, 127-142.

CROSIGNANI, A., PODDA, M., BERTOLINI, E., BATTEZZATI, P.M., ZUIN, M. y SETCHELL, K.D.R. (1991). Failure of ursodeoxycholic acid to prevent a cholestatic episode in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis: a study of bile acid metabolism. *Hepatology* 13, 1076-1083.

DÄLLENBACH, A. y RENNER, E.L. (1995). Colchicine does not inhibit secretin-induced choleresis in rats exhibiting hyperplasia of bile ductules: evidence against a pivotal role of exocytic vesicle insertion. *J. Hepatol.* 22, 238-348.

DANIELSSON, H., EINARSSON, K. y JOHANSSON, G. (1976). Effects of biliary drainage on individual reactions in the conversion of cholesterol to taurocholic acid. *Eur. J. Biochem.* 2, 44-49.

DaSILVA, L.C., ALVES, V.A.F., ABRANTES, C.P., LIMA, D.M., CHRISTO, C.H. y DeBRITO, T. (1985). Effects of chemotherapy on mice submitted to multiple *Schistosoma mansoni* infections. A controlled randomized prospective study. *Trop. Med. Parasitol.* 36, 150-154.

DE BETHIZY, J.D. y HAYES, J.R. (1989). Metabolism: a determinant of toxicity. En: *Principles and Methods of Toxicology*. Ed. A.W. Hayes. Raven Press, Nueva York, pp. 29-66.

DEBY, C. y GOUTIER, R. (1990). New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and efficiency of superoxide dismutases. *Biochem. Pharmacol.* 39, 399-405.

DE LANGE, R.J. y GLAZER A.N. (1990). Bile acids: antioxidants or enhancers of peroxidation depending on lipid concentration. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 19-25.

DELPIERRE, J.W., ANDERSON, G. y DELLMER, J.G. (1988). Endoplasmic reticulum and Golgi complex. En: *Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, H. Popper, W.B. Jakoby, D. Schachter y D.A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 165-188.

DEL RIO LOZANO, J. (1967). Epizootiología de la dicroceliosis en la provincia de León. *Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León* 4, 163-237.

DEMENTEV, L.S., SERIKBAEVA, B.K. y KARABAEV, D.K. (1978). The effect of vitamin C and cobalt chloride on the pathological process in dicroceliasis in sheep. *Trudy kazazhskogo Nauchno-issledovatel'skogo Veterinarnogo Instituta (Voprosy veterinarnoi parazitologii v Kazakhstane)* 17, 79-81.

DESMET, J.J. (1977). Congruence of renal and hepatic excretory functions: sulfonic acid dyes. *Am. J. Physiol.* 220, 1755-1758.

DHAR, D.N. y SINGH, K.S. (1963a). Histochemical studies on liver in dicrocoeliasis. *Ind. J. Vet. Sci. Anim.* 33, 142-151. En: *Helminth. Abstr.* (1964), 33, n° 2198.

DHAR, D.N. y SINGH, K.S. (1963b). Pathology of liver in dicrocoeliasis. *Ind. J. Vet. Sci. Anim.* 33, 200-210. En: *Helminth. Abstr.* (1965), 34, n° 293.

DIJKSTRA, M., KUIPERS, F., HAVINGA, R., SMIT, E.P. y VONK, R.J. (1990). Bile secretion of trace elements in rats with a congenital defect in hepatobiliary transport of GSH. *Pediatric. Res.* 28, 339-343.

DRABICK, J.J., EGAN, J.E., BROWN, S.L., VICK, R.G., SANDMAN, B.M. y NEAFIE, R.C. (1988). Dicroceliasis (lancet fluke disease) in an HIV seropositive man. *JAMA* 259, 567-568.

DUBIN, M., MAURICE, M. y FELDMANN, G. (1980). Influence of colchicine and phalloidine on bile secretion and hepatic ultrastructure in the rat. Possible interaction between microtubules and microfilaments. *Gastroenterology* 79, 646-654.

DUJARDIN, F. (1845). *Histoire Naturelle Des Helminthes Ou Vers Intestinaux*. Rovet, Paris.

DUMASWALA, R., SETCHELL, K.D.R., MOYER, M.S. y SUCHY, F.J. (1993). An anion exchanger mediates bile acid transport across the placental microvillous membrane. *Am. J. Physiol.* 264, G1016-1023.

DUMONT, M., D'HONT, C., LEGRAND-DEFRETIN, V., DURAND-SCHENEIDER, A.M., FELDMANN, G. y ERLINGER, S. (1991). Inhibition by colchicine of biliary secretion of diethylmaleate in the rat: evidence for microtubular-dependent vesicular transport. *Hepatology* 14, 10-15.

DUMONT, M., ERLINGER, S. y UCHMAN, S. (1980). Hypercholeresis induced by ursodeoxycholic acid and 7-ketolithocholic acid in the rat: possible role of bicarbonate transport. *Gastroenterology* 79, 82-89.

DUTTON, G.S. (1980). *Glucuronidation of Drugs and other Compounds*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

EBERLE, D., CLARKE, R. y KAPLOWITZ, N. (1981). Rapid oxidation *in vitro* of endogenous and exogenous glutathione in bile of rats. *J. Biol. Chem.* 256, 2115-2117.

ELSHEIKH, H.A., ALI, B.H., HOMEIDA, A.M., LUTFI, A.A.A. y HAPKE, H.J. (1992). The effects of fascioliasis on the activities of some drug-metabolizing enzymes in desert sheep. *Br. Vet. J.* 148, 249-257.

ELSING, C., HASSNER, A., HUBNER, C., BUHLI, H. y STREMMEL, W. (1996). Absortive and secretory mechanisms in biliary epithelial cells. *J. Hepatol.* 24, 121-127.

ELSING, C., REICHEN, J., MARTI, M. y RENNER, E.L. (1994). Hepatocellular Na⁺/H⁺ exchange is activated at transcriptional level and postranscriptional levels in rat biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 107, 468-478.

ERLINGER, S. (1982). Cholerease et cholestase. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 6, 500-508.

ERLINGER S. (1990). Role of intracellular organelles in the hepatic transport of bile acids. *Biomed. Pharmacother.* 44, 409-416.

ERLINGER, S. (1993). Intracellular events in bile acid transport by the liver. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion. Physiology and Pathophysiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Nueva York, pp. 467-475.

ERLINGER, S. (1994). Bile flow. En: *The Liver: Biology and Pathology*. Ed. I.M. Arias, H. Popper, W.B. Jakoby, D. Schachter y D.A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 769-789.

ERLINGER, S. (1996). Do intracellular organelles have any role in transport of bile acids by hepatocytes?. *J. Hepatol.* 24, 88-93.

ERLINGER, S. y DHUMEAUX, D. (1974). Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes. *Gastroenterology* 66, 281-304.

ERLINGER, S., DHUMEAUX, D., BERTHELOT, P. y DUMONT, M. (1970). Effect of inhibitors of sodium transport on bile formation in the rabbit. *Am. J. Physiol.* 219, 416-422.

ESTELLER, A., JIMÉNEZ, R. y LÓPEZ, M.A. (1981). Biliary excretion in conscious rabbits: role of the enterohepatic circulation of bile salts and of the gallbladder. *Q. Ji. Exp. Physiol.* 66, 349-357.

ESTELLER, A., TORRES, M.D., GÓMEZ-BAUTISTA, M., MARIÑO, E.L., FERNÁNDEZ-LASTRA, C. y JIMÉNEZ, R. (1990). Pharmacokinetics, hepatic biotransformation and biliary and urinary excretion of bromosulphthalein (BSP) in an experimental liver disease mimicking biliary cirrhosis. *Eur. J. Drug Metab. Ph.* 15, 7-14.

ESTERBAUER, H. (1982). Aldehydic products of lipid peroxidation. En: *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*. Ed. D.C.H. Mc Brien y T.F. Slater. Academic Press, Nueva York, pp. 101-128.

FACINO, R.M., CARINI, M. y GENCHI, C. (1985). Decrease in hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity in rats and cattle with fascioliasis. Impaired in vitro glucuronidation of oxyclozanide. *Toxicol. Lett.* 26, 65-71.

FACINO, R.M., CARINI, M., GENCHI, C., TOFANETTI, O. y CASCIARRI, J. (1989). Participation of lipid peroxidation in the loss of hepatic drug-metabolizing activities in experimental fascioliasis in the rat. *Pharmacol. Res.* 21, 549-560.

FELDMAN, P.L., GRIFFITH, O.W. y STUEHR, D.J. (1993). The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News*, December, 26-38.

FERNÁNDEZ-CHECA, J.C., GARCÍA-RUIZ, C., OOKHTENS, M. y KAPLOWITZ, N. (1991). Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. *J. Clin. Invest.* 87, 397-405.

FERNÁNDEZ-CHECA, J.C., SHELLY, L., OOKHTENS, M., DELEVE, L., RUNNEGER, M., YOSHIDA, H., SAIKI, H., KANNAN, R., MADDATU, T., GARCÍA-RUIZ, C., KUHNENKAMP, I. y KAPLOWITZ, N. (1993a). Regulation of hepatic glutathione. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion. Physiology and Pathophysiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Nueva York, pp. 363-395.

FERNÁNDEZ-CHECA, J.C., YI, Y.R., GARCÍA-RUIZ, C., KNEZIA, Z., TAHARA, S.M. y KAPLOWITZ, N. (1993b). Expression of rat liver sinusoidal and canalicular GSH transport systems in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 2324-2328.

FERRE, I. (1994). *Estudios sobre fasciolosis ovina*. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

FERRE, I., BARRIO, J.P., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. y ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (1994). Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 55, 71-79.

FERRE, I., LÓPEZ, P., GONZALO-ORDEN, M., JULIAN, M.D., ROJO-VÁZQUEZ, F.A. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1995). The effects of subclinical fasciolosis on hepatic secretory function in sheep. *Parasitol. Res.* 81, 127-131.

FERRE, I., LÓPEZ, P., ROJO-VÁZQUEZ, F.A. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1996). Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet. Parasitol.* 62, 93-100.

FEVERY, J., MESA, V. y VAN STEENBERGEN, W. (1990). Choleresis and cholestasis. En: *Systematic and Quantitative Hepatology. Pathophysiological and Methodological Aspects*. Ed. G. Molino. Masson, Milán, pp. 95-108.

FITZ, G. (1993). Na⁺-coupled solute transport in hepatocytes. En: *Hepatic transport and bile secretion: Physiology and Pathophysiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Nueva York, pp. 281-295.

FLOHÉ, L. (1982). Glutathione peroxidase brought into focus. En: *Free Radicals in Biology Vol 5*. Ed. W.A. Pryor. Academic Press, Nueva York, pp. 223-254.

FOSTER, J.R. (1981). A study of the initiation of biliary hiperplastia in rats infected with *Fasciola hepática*. *Parasitology* 83, 253-258.

FREESE, D., WHITMER, D., WATSON, M., BOWERS, L. y LERDAHL, R. (1987). The relationship of 7 -hydroxylase and membrane fluidity in the developing rat. *Hepatology* 7, 1108.

FRENCH, S.W. (1985). Role of canalicular contraction in bile flow. *Lab. Invest.* 53, 245-249.

FROMUNDA, V., PAUL, I., POPESCU, S. y HRISANIDI, St. (1968). Recherches concernant la modification du foie dans la Dicrocoeliose ovine. *Arch. Vet.* 4, 111-120.

FUNAE, Y. e IMAOKA, S. (1993). Cytochrome P-450 in rodents. En: *Cytochrome P450*. Ed. J.B. Schenkman y H. Griem. Springer-Verlag, Berlín, pp. 221-238.

GALTIER, P., BATAGLIA, A., MORE, J. y FRANC, M. (1983). Impairment of drug metabolism by the liver in experimental fascioliasis in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 35, 729-733.

GALTIER, P., CAMBON-GROS, C., FERNÁNDEZ, Y., DELTOUR, P., EECKHOUTTE, C. y HOELLINGER, H. (1994). *Fasciola hepática*: liver microsomal membrane functions in host rat. *Exp. Parasitol.* 78, 175-182.

GALTIER, P., EECKHOUTTE, C. y LARRIEU, G. (1987). *Fasciola hepática*: Liver enzymes in rats and interaction with chemical inducers. *Exp. Parasitol.* 63, 189-194.

GALTIER, P., LARRIEU, G. y LESCA, P. (1985). Induction of drug metabolizing enzymes in the liver of rats infested with *Fasciola hepática*. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 751-754.

GALTIER, P., LARRIEU, G., TUFENKJI, A.E. y FRANC, M. (1986). Incidence of experimental fascioliasis on the activity of drug-metabolizing enzymes in lambs liver. *Drug Metab. Dispos.* 14, 137-141.

GALTIER, P., VANDENBERGHE, Y., COECKE, S., EECKHOUTTE, C., LARRIEU, G. y VERCRUYSSSE, A. (1991). Differential inhibition of rat hepatic glutathione S-transferase isoenzymes in the course of fascioliasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 255-260.

GARCÍA-PÉREZ, A.L. y JUSTE-JORDÁN, R.A. (1987a). Helmintos parásitos de la oveja en el País Vasco. *Revista Ibérica de Parasitología, Vol. Extraordinario*, 105-113.

GARCÍA-PÉREZ, A.L. y JUSTE-JORDÁN, R.A. (1987b). Observaciones sobre la prevalencia de los helmintos parásitos del ganado vacuno en la C.A.V. *II Jornadas sobre Producción Animal*, Zaragoza, mayo, 262-265.

GARFINKLE, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. En: *Enzyme and pigment composition of different microsomal fractions. Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509.

GASCON, M.P. y DAYER, P. (1993). Metabolismo hepático de los fármacos y de las toxinas. En: *Tratado de Hepatología Clínica*. Ed. J. Rodés, J.P. Benhamon, J. Bircher, N. McIntyre y M. Rizzeto. Científicas y Técnicas, S.A., Barcelona, pp. 291-305.

GEBHARD, R.L., STONE, B.G., ANDREINI, J.P., DUANE, W.C., EVANS, C.D. y PRIGGE, W.F. (1992). Thyroid hormone differentially augments biliary sterol secretion in the rat. I. The isolated-perfused liver model. *J. Lipid Res.* 33, 1459-1466.

GLEESON, D., SMITH, N.D. y BOYER, J.L. (1989). Bicarbonate-dependent and independent intracellular pH regulatory mechanisms in rat hepatocytes exhibit basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport. *J. Clin. Invest.* 84, 312-321.

GONZALEZ, F.J. (1989). The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol. Rev.* 40, 244-250.

GONZALEZ, F.J. (1992). Human cytochromes P450: problems and prospects. *TIPS* 13, 346.

GONZALEZ, J., FERNANDEZ, C., MARIÑO, E., MORALES, A. y JIMENEZ, R. (1989). Biliary excretion and choleric effect of cefmetazole in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 323, 1970-1974.

GONZÁLEZ, P., TUÑÓN, M.J., LÓPEZ, P., DÍEZ, N. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1991). Hepatic disposition of organic anions in rats infested by *Fasciola hepática*. *Exp. Parasitol.* 73, 396-402.

GONZÁLEZ-FLECHA, B., REIDES, C., CUTRIN, J.C., LÑESUY, S.F. y BOVERIS, A. (1993). Oxidative stress produced by suprahepatic occlusion and reperfusion. *Hepatology* 18, 881-889.

GONZÁLEZ-LANZA, C., MANGA-GONZÁLEZ, M.Y. y DEL POZO-CARNERO, P. (1993). Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in Leon Province, NW Spain. *Parasitol. Res.* 76, 488-491.

GONZÁLEZ-LANZA, C., MANGA-GONZÁLEZ, M.Y., DEL POZO-CARNERO, P., CAMPO, R., HIDALGO-ARGÜELLO, R. y DÍEZ-BAÑOS, N. (1994). Infestación experimental de *Cermea* (*Xeromagna*) *cespitem arigonis* (Mollusca) por *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles, Barcelona-Sitges*, septiembre, 23.

GORSKY, L.D., KOOP, D.R. y COON, M.J. (1984). On the stoichiometry of the oxidase and mono-oxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 259, 6812.

GRAF, J. y HAUSSINGER, D. (1996). Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J. Hepatol.* 24, 53-77.

GREEN, R.C. y O'BRIEN, P.J. (1970). The cellular localization of glutathione peroxidase and its release from mitochondria during swelling. *Biochim. Biophys. Acta* 197, 31-39.

GREGORY, D.H., VLAHCEVIC, Z.R., PRUGH, M.F. y SWELL, L. (1978). Mechanism of secretion of biliary lipids: role of a microtubular system in hepatocellular transport of biliary lipids in the rat. *Gastroenterology* 74, 93-100.

GREGORY, E.M. y FRIDOVICH, I. (1973). Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *J. Bacteriol.* 114, 5443-5448.

GREGUS, Z., FISCHER, E. y VARGA, F. (1979). Correlations between hepatic transport of cholephilic organic anions and their effect on hepatic mitochondrial respiration. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 36, 197-202.

GRIFFITH, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analyt. Biochem.* 106, 207-212.

GRIFFITH, O.W. y MEISTER, A. (1979). Glutathione: Interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5606-5610.

GRIFFITH, O.W. y MEISTER, A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4668-4672.

GROEN, A.K., OUDE-ELFERINK, R.P.J. y TAGER, J.M. (1996). Control analysis of biliary lipid secretion. *J. Theor. Biol.* 182, 427-436.

GUENGERICH, R.P. (Ed). (1987). *Mammalian Cytochrome P-450*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

GUENGERICH, R.P. (1992). Characterization of human cytochrome P-450 enzymes. *FASEB J.* 6, 745-748.

GUMUCIO, J.J. y GUIBERT, E.G. (1993). Zonal transport an functional compartment of the liver acinus. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion. Physiology and Pathobiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Nueva York, pp. 71-82.

GUMUCIO, J.J. y MILLER, D.L. (1982). Liver cell heterogeneity. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I. Arias, H. Popper, D.Schachter y D.A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 644-661.

GUNTZLER, W.A. y FLOHÉ, L. (1985). Glutathione peroxidase. En: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Ed. R.A. Greenmald. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 285-290.

GURANTZ, D. y HOFMANN, A.F. (1984). Influence of bile acid structure on bile flow and biliary lipid secretion in the hamster. *Am. J. Physiol.* 247, G736-G748.

HABIG, W.H., PABST, M.J. y JAKOBY, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

HAFEMAN, D.C., SUNDE, R.A. y HOEKSTRA, W.G. (1974). Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in rat. *J. Nutr.* 104, 580-587.

HAGENBUCH, B., JACQUEMIN, E. y MEIER, P.J. (1994). Na⁺-dependent and Na⁺-independent bile acid uptake systems in the liver. *Cell Physiol. Biochem.* 4, 198-205.

HAGEY, L.R., NEOPTOLEMOS, J.P., ROSSI, S.S., TON-NU, H.T. y HOFMANN, A.F. (1985). Deamination and ester glucuronidation: new side chain biotransformation of bile acid occurring in mammals. *Hepatology* 5, 1023-1027.

HALLIWELL, B. y CHIRICO, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715-725.

HARDISON, W.G.M. y WOOD, C.A. (1987). Importance of bicarbonate in bile salt independent fraction on bile flow. *Am. J. Physiol.* 235, 158-164.

HAROUN, E.T. y HILLYER, G.V. (1986). Resistance to fascioliasis. A review. *Vet. Parasitol.* 20, 63-93.

HARRIS, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6, 2675-2683.

HARVEY, P.R.C., TOTH, J.L., UPDNAYA, G.A., ILSON, R.G. y STRASBERG, S.M. (1988). Total protein output during rapid reduction of bile salt secretion rates in man. *Gut* 30, 118-122.

HATOFF, D.E. y HARDISON, W.G.M. (1982). Bile acid-dependent secretion of alkaline phosphatase in rat bile. *Hepatology* 2, 433-439.

HILL, K.E., BURK, R.F. y LANE, J.M. (1987). Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *J. Nutr.* 117, 99-104.

HIRATA, E., INOUE, M. y MORINO, Y. (1984). Mechanism of biliary secretion of ectoenzymes: bile acids are important factors for biliary occurrence of γ -glutamyltransferase and other hydrolases. *Sulfur Amino Acids* 7, 365-376.

HISSIN, P.J. y HILF, R. (1976). A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214-226.

HODGSON, E.K. y FRIDOVICH, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14, 5294-5299.

HOFMANN, A.H. (1988). Enterohepatic circulation of bile acids: a topic in molecular physiology. En: *Bile Acids in Health and Disease*. Ed. T. Northfield, R. Jazrawi y P. Zeutler Munro. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 1-19.

HOFMANN, A.H. (1990). Hepatic secretion of bile acids. En: *Hepatic transport and Bile Secretion. Physiology and Pathophysiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Nueva York, pp. 553-569.

HOFMANN, A.H. (1994). Bile acids. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D. Shachter y D.A. Schafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 677-717.

HOFMANN, A.H. y RODA, A. (1984). Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J. Lipid Res.* 25, 1477-1489.

HOHORTS, W. (1962). Die Rolle der Ameisen im Entwicklungsgang des Lanzettegels (*Dicrocoelium dendriticum*). *Z. Parasiten.* 22, 105-106.

HOHORST, W. y GRAEFE, G. (1961). Ameisen - obligatorische Zwischenwirte des Lanzettegels (*Dicrocoelium dendriticum*). *Naturwissenschaften* 48, 229-230.

HOHORST, W. y LÄMMLER, G. (1962). Experimentelle Dicrocoeliose-Studien. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 13, 377-397.

HOLDSWORTH, G. y COLEMAN, R. (1975). Enzyme profiles of mammalian bile. *Biochim. Biophys. Acta* 389, 47-50.

HOLMGREM, A. (1980). Pyridine nucleotide disulfide oxidoreductases. En: *Experientia Supplementum: Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes*. Ed. J. Jeffreery. Bichhauser, Basel, pp. 149-180.

HONG, H.U.I. y JOHNSON, P. (1995). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 921-931.

HORTON, J.D., CUTHBERT, J.A. y SPADY, D.K. (1994). Regulation of hepatic 7 α -hydroxylase expression by dietary psyllium in the hamster. *J. Clin. Invest.* 93, 2084-2092.

HOWARD-BLACK, T. (1983). The preparation and reactions of diazomethane. *Aldrichimica Acta* 16, 3-9.

HUGHES, D.L. (1987). *Fasciola* and *Fascioloides*. En: *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis, Vol. II, Trematodes and Cestodes*. Ed. E.J.L. Soulsby. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 92-114.

HYLEMON, P.B. (1985). Metabolism of bile acids in intestinal microflora. En: *Sterols and bile acids*. Ed. H. Danielsson y J. Sjövall. Elsevier, Nueva York, pp. 331-343.

HYLEMON, P.B., HUDER, J.E., PERUDENK, M.W., HEUMAN, D.M., VLAHCEVIC, Z.R. y CHIANG, J. (1989). Simultaneous measurement of cholesterol 7 α -hydroxylase activity by reverse-phase (4-14C) high-performance liquid chromatography using both endogenous and exogenous cholesterol as substrate. *Anal. Biochem.* 182, 212-216.

IMAI, Y., ITO, A. y SATO, R. (1966). Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic fraction. *J. Biochem.* 60, 417-428.

INGELMAN-SUNDBERG, M. (1993). Ethanol-inducible cytochrome P450 2E1, regulation, radical formation and toxicological importance. En: *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Ed. G. Poli, E. Albano y M.U. Dianzani. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 287-290.

INGELMAN-SUNDBERG, M., JOHANSSON, I., HU, Y., TERELIUS, Y., ELIASSON, E., CLOT, P. y ALBANO, E. (1994). Ethanol-inducible cytochrome P450 2E1: Genetic polymorphism, regulation and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 10, 447.

INOUE, M. (1994). Protective mechanism against reactive oxygen species. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D.A. Schachter y D.A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 443-460.

IOANNIDES, C. y PARKE, D.V. (1987). The cytochromes P-448 a unique family of enzymes involved in chemical toxicity and carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 36, 4197-4207.

IOANNIDES, C. y PARKE, D.V. (1990). The cytochrome P-450 I gene family of microsomal hemoproteins and their rol in the metabolic activation of chemicals. *Drug. Metab. Rev.* 22, 1-85.

ISHIKAWA, T., BAO, J.J., YAMANE, Y., AKIMARU, K., FRINDRICH, K., WRIGHT, C.D. y KUO, M.T. (1996). Coordinated induction of MRP/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 271, 14981-14988.

ISSEROFF, H., SAWMA, J.T. y REINO, D. (1977). Fascioliasis: role of proline in bile duct hyperplasia. *Science* 198, 1157-1159.

JACKSON, R.C. (1969). Studies in the enzymology of glutathione metabolism in human erythrocytes. *Biochem. J.* 111, 309-315.

JACQUELYN, J., MAHER, M.D. y SCOTT, L. (1993). Parenchymal and non parenchymal cell interactions in the liver. *Sem. Liver Dis.* 13, 13-20.

JAKOBY, W.B. (1978). The glutathione S-transferases. A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* 46, 383-390.

JAKOBY, W.B. (1994). Detoxification: Conjugation and Hydrolysis. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D. Schachter y D.A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 429-441.

JENKINS, R.R. (1993). Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25, 210-212.

JL, L.L., STRATMAN, F. y LARDY, H.A. (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 150-160.

JIMÉNEZ, R., MUÑOZ, E., GALÁN, I., ROMÁN, I. y FERNÁNDEZ, E. (1992). Conceptos básicos de la fisiología hepatobiliar. En: *Temas Actuales de Nutrición Artificial*. Ed. E. Martínez-Fidalgo. Cuadernos Europeos, León. pp. 59-84.

JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C. y PALMER, N. (Ed). (1993). *Pathology of domestic animals. Fourth Edition*. Academic Press, Nueva York.

KAJUBIRI, V. (1982). Studies on the pathogenicity of *Dicrocoelium* in a model definitive host *Mesocricetus auratus* (Warterhouse, 1839). *Dissertationen Universitaet Hohenheim (FRG)*.

KAPLOWITZ, N., EBERLE, D.E., PETRINI, J., TOULOKIAN, J., CORVASCE, M.C. y KUHLENKAMP, J. (1983). Factors influencing the efflux of hepatic glutathione into bile in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224, 141-146.

KARANFILOVSKI, G. (1983). Economic losses caused by fasciolosis and dicrocoeliasis to livestock production in Pljevlja and surrounding area. *Vet. Yugoslavia* 32, 253-260.

KAWAJIRI, K., NAKACHI, K., IMAI, K., WATANABE, J. y HAYASHI, S. (1993). The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 14, 77-87.

KENT, C. y BLEKKENHORTST, G. (1991). Time modulation effect of diethyldithiocarbamate (DDC) on radiosensitization by superoxide dismutase (SOD) inhibition. *Free Radic. Res. Commun.* 2, 595-599.

KERN, F. Jr., ERIKSSON, H., CURSTEDT, T. y SJÖVALL, J. (1977). Effect of ethinylestradiol on biliary excretion of bile acids, phosphatidylcholines, and cholesterol in the bile fistula rat. *J. Lipid Res.* 18, 623-634.

KETTERER, B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 16, 957-973.

KETTERER, B., COLES, B. y MEYER, D.J. (1983). The role of glutathione in detoxification. *Environ. Health Perspect.* 49, 59-69.

KIMURA, A., MAHARA, R., TOHMA, M., USHIJIMA, K., YUGE, K., ONO, E. y YAMASHITA, F. (1989). Unusual 1- α -hydroxylated bile acids in children with a paucity in interlobular bile ducts. *Clin. Chim. Acta* 185, 215-217.

KIMURA, A., YAMAKAWA, R., USHIJIMA, K., FUJISAWA, T., KURIA, N., KATO, H., ISO-KUCHI, T., MAHARA, R., KUROSAWA, T. y THOMA, M. (1994). Fetal bile acid metabolism during infancy: Analysis of 1- α -hydroxylated bile acids in urine, meconium and feces. *Hepatology* 20, 819-824.

KIRKWOOD, A.C. y PEIRCE, M.A. (1971). The longevity of *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Res. Vet. Sci.* 12, 588-589.

KLAASSEN, C.D. (1974). Bile flow and composition during bile acid depletion and administration. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52, 334-348.

KLAASSEN, C.D. y WATKINS, J.K. (1984). Mechanisms of bile formation, hepatic uptake and biliary excretion. *Pharmacol. Rev.* 36, 1-67.

KLIGENBERG, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386.

KÖHLER, P. y HANSELMANN, K. (1973). Intermediary metabolism in *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 45, 825-845.

KÖHLER, P. y STAHEL, O.F. (1972). Metabolic end products of anaerobic carbohydrate metabolism of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 43, 733-741.

KOLARS, J.C., SCHMIEDLIN-REN, P., DOBBINS, W.O., SCHUETZ, J., WRIGHTON, S.A. y WATKINS, P.B. (1992). Heterogeneity of cytochrome P-450 III expression in rat gut epithelia. *Gastroenterology* 102, 1186-1198.

KOOP, D.R. y COON, M.J. (1986). Purification of liver microsomal cytochrome P-450 isozymes 3A and 6 from imidazole-treated rabbits. *Mol. Pharmacol.* 25, 494.

KOPP, H. (1975). *Untersuchungen über die Eiausscheidung von Fasciola hepatica und Dicrocoelium dendriticum bei Schaf und Rind im Verlauf eines Jahres*. Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität, München. pp. 52.

KOSOWER, N.S. Y KOSOWER, E.M. (1978). The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54, 109-160.

KOSTKA, P. (1992). Free radicals (nitric oxide). *Anal. Chem.* 67, 411R-416R.

KRETZSCHMAR, M., FRANKE, H., ZIMMERMANN, T., DARGEL, R. y KLINGER, W. (1989). Glutathione synthesis and export in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide. Relations to ultrastructural changes. *Exp. Pathol.* 36, 113-122.

KRULL, W.H. (1956). Experiments involving potential definitive hosts of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899: Dicrocoeliidae. *Cornell Vet.* 46, 511-525.

KRULL, W.H. (1958). The migratory route of the metacercariae of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819). Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae) in the definitive host. *Cornell.Vet.* 48, 17-24.

KRULL, W.H. y MAPES, C.R. (1952a). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). III. Observations on the slimeballs of *Dicrocoelium dendriticum*. *Cornell Vet.* 42, 253-276.

KRULL, W.H. y MAPES, C.R. (1952b). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). IV. Infection experiments involving definitive hosts. *Cornell Vet.* 42, 277-285.

KRULL, W.H. y MAPES, C.R. (1952c). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). V. Notes on infection of *Dicrocoelium dendriticum* in *Cionella lubrica*. *Cornell Vet.* 42, 339-351.

KRULL, W.H. y MAPES, C.R. (1952d). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). VII. The second intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum*. *Cornell Vet.* 42, 603-604.

KRULL, W.H. y MAPES, C.R. (1953). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). IX. Notes on the cyst, metacercaria, and infection in the ant, *Formica fusca*. *Cornell Vet.* 43, 389-410.

KUKIELKA, E. y CEDERBAUM, A.I. (1994). DNA strand cleavage as a sensitive assay for the production of hydroxyl radicals by microsomes: role of cytochrome P4502E1 in the increased activity after ethanol treatment. *Biochem. J.* 302, 773-779.

KULLAK-UBLICK, G.A., GERLOFF, T., HAGENBUCH, B., BERR, F., MEIER, P. y STIEGER, B. (1996). Expression of a rat liver phosphatidylcholine translocator in *Xenopus laevis* oocytes. *Hepatology* 23, 1254-1259.

KUTHAN, H. y ULLRICH, V. (1982). Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur. J. Biochem.* 126, 583-588.

LAKE, B.G., FOSTER, J.R., COLLINS, M.A., STUBBERFIELD, C.R., GANGOLLI, S.D. y SRI-VASTAVA, S.P. (1982). Studies on the effects of orally-administered dicyclohexylphthalate in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 51, 217-226.

LAMERS, W.H., HILBERTS, A. y FURT, E. (1989). Hepatic enzyme zonation: a reevaluation of the concept of liver acinus. *Hepatology* 10, 72-76.

LAMRI, Y., RODA, A., DUMONT, M., FELDMAN, G. y ERLINGER, S. (1988). Immunoperoxidase localization of bile salts in rat liver cells: evidence for a role of the Golgi apparatus in the bile salts transport. *J. Clin. Invest.* 82, 1173-1182.

LAPAGE, G. (1982). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Continental, S.A. de C.V., México.

LA RUE, G.R. (1957). Parasitological Reviews. The classification of Digenetic Trematoda: A review and a new system. *Exp. Parasitol.* 6, 306-349.

LAUTBURG, B.H., SMITH, C.V. y HUGHES, H. (1984). Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response to oxidative stress. *J. Clin. Invest.* 73, 124-133.

LAUTT, W.W. y GREENWAY, C.V. (1987). Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology* 7, 952-963.

LAWSON, A.M. y SETCHELL, K.D.R. (1988). Mass spectrometry of bile acids. En: *The Bile Acids. Vol 4. Methods and Applications*. Ed. K.D.R. Setchell, D. Kritchevsky y P. Nair. Plenum, Nueva York, pp. 167-267.

LEIER, I., JEDLITSCHKY, G., BUCHHOLZ, U., CENTER, M., COLE, S.P.C., DEELEY, R.G. y KEPPLER, D. (1996). ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem. J.* 314, 433-437.

LENZEN, R., ALPINI, G. y TAVOLONI, N. (1992). Secretin stimulates bile ductular secretory activity through the cAMP system. *Am. J. Physiol.* 263, 527-532.

LEWIS, D.F.V., LAKE, B.G. y PARKE, D.V. (1995). Molecular orbital-generated QSARs in an homologous series of alkoxyresorufins and studies of their interactive docking with cytochromes P450. *Xenobiotica* 25, 1355-1369.

LIEBER, C.S., CASINI, A., DE CARLI, L.M., LOWE, N., SASAKI, R. y LEO, M.A. (1990). S-adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. *Hepatology* 11, 850-858.

LOEPER, J., DESCATOIRE, V., MAURICE, M., BEAUNNE, P., FELDMAN, G., LARREY, D. y PASSAYRE, D. (1990). Presence of functional cytochrome P450 on isolated rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology* 11, 850-858.

LOOSS, A. (1899). Weitere Beiträge zur Kenntniss der Trematoden-Fauna Aegyptnes zugleich Versuch einer natürlichen Gliederung des Genus *Distomum* Retzius. *Zoologische Jahrbücher Systematik* 12, 632-635.

LOOSS, A. (1907). Ueber einige zum teil neue distomen der eropaischen fauna. *Centralbl. Bakt. I. Abt. Orig. Bd.* 43, 603.

LÓPEZ, P., GARCÍA-PARDO, L.A., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., GONZÁLEZ, P. y TUÑÓN, M.J. (1992). Alterations induced by fascioliasis and cirrhosis on the biliary excretion of cefmetazole in wistar rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C, 53-56.

LÓPEZ, P., GONZÁLEZ, P., TUÑÓN, M.J. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1994). The effects of experimental fasciolosis on bilirubin metabolism in the rat. *Exp. Parasitol.* 78, 386-393.

LÓPEZ, P., TUÑÓN, M.J., GONZÁLEZ, P., DÍEZ, N., BRAVO, A.M. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1993). Ductular proliferation and hepatic secretory function in experimental fascioliasis. *Exp. Parasitol.* 77, 36-42.

LÓPEZ-BAREA, J., BÁRCENA, J.A., BOCANEGRA, J.A., FLORINDO, J., GARCÍA-ALFONSO, C., LÓPEZ-RUIZ, A., MARTÍNEZ-GALISTEO, E. y PEINADO, J. (1990). Structure, mechanism, functions and regulatory properties of glutathione reductase. En: *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Ed. J. Viña. CRC Press, Boca Ráton, Florida, pp. 105-116.

LOWE, P.J., BARNWELL, S.G. y COLEMAN, R. (1986). Rapid kinetic analysis of the bile-salt-dependent secretion of phospholipid, cholesterol and a plasma-membrane enzyme into bile. *Biochem. J.* 222, 631-637.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, N.J. (1951). Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

LU, S.C., SUN, W.M., YI, J., OOKHTENS, M., SZE, G. y KAPLOWITZ, N. (1996). Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells. *J. Clin. Invest.* 97, 1488-1496.

LUENGO, N. (1995). *Reaparición de ácidos biliares fetales durante la hepatocarcinogénesis*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.

LUJUBUNCIC, P., FUHRMAN, B., OIKNINE, J., AVIRAM, M. y BOMZON, A. (1996). Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut* 39, 475-478.

LUKIN, A.K. (1980). The prevalence and economic loss due to dicrocoeliasis in ruminants. *Trudy Saratovski Nauchno-Issledovatel'skoi veterinamoi Stantsii* 14, 76-79. En: *Helminth. Abstr.* (1984), 53 (1), n°40.

MACHLIN, L.J. y BENDICH, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASED J.* 1, 441-445.

MALAVOLTI, M., FROMM, H., NSIEN, E., SETCHELL, K.D.R., ALBERT, M.B., COHEN, B. y CERYAK, S. (1993). Formation, absorption, and biotransformation of 6-litocholenic acid in humans. *Am. J. Physiol.* 264, G163-G171.

MALEK, E.A. (1980). *Snail-transmitted parasitic diseases. Volume I and II*. Ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

MANGA-GONZÁLEZ, M.Y. (1987). Some aspects of the biology and helminthofauna of *Helicella* (*Helicella*) *itala* (Linnaeus, 1758) (Mollusca). Natural infection by Dicrocoeliidae (Trematoda). *Rev. Iber. Parasitol., Vol. Extraordinario*, 131-148.

MANGA-GONZÁLEZ, M.Y., GONZÁLEZ-LANZA, C. y DEL POZO-CARNERO, P. (1991). Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in the Porma basin (León, NW Spain). *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 66, 57-61.

MAPES, C.R. (1950). The lancet fluke, a new parasite of the woodchuck. *Cornell Vet.* 40, 346-349.

MAPES, C.R. (1951). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819), Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae) including its relation to the intermediate host *Cionella lubrica* (Müller). En: *A study of Dicrocoelium dendriticum and Dicrocoelium infection*. *Cornell. Vet.* 41, 382-432.

MAPES, C.R. y BAKER, D.W. (1950). The white-tailed deer, a new host of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Cornell Vet.* 40, 211-212.

MARCHAND, A. (1966). *La dicrocoeliose*. Thèse, Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort.

MARKS, D.L. y LaRUSSO, N.F. (1993). Vesicle-dependent transport pathways in liver cells. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion. Physiology and Pathophysiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Nueva York, pp. 513-530.

MARKWELL, M.A.K., HAAS, S.M., BIEBER, L.L. y TOLBERT, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206-210.

MARTENSSON, J., JAIN, A., FRAYER, W. y MEISTER, A. (1989). Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5296-5300.

MARTENSSON, J., LAI, C.K. y MEISTER, A. (1990). High affinity transport of GSH is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7185-7189.

MARTENSSON, J. y MEISTER, A. (1989). Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 471-475.

MARTÍNEZ-ANSÓ, E., CASTILLO, J.E., DÍEZ, J., MEDINA, J.F. y PRIETO, J. (1994). Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonate anion exchange in human liver. *Hepatology* 6, 1400-1406.

MASSOUD, J. (1981). Histopathology of liver in Iranian sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 75, 293-298.

MATEJKA, M., VESCINA, C., CARDUCCI, C.N., ALAYON, A., DIOS, A., SCARLATTO, E. y MAMIANETTI, A. (1990). Effect of ursodeoxycholic acid administration on bile acid composition in hamster bile. *Pharmacol. Res.* 22, 297-305.

MEIER, P.J. (1993). Canalicular Membrane Transport Processes. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Ltd. Nueva York, pp 587-595.

MEIER, P.J. (1995). Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am. J. Physiol.* 269, G801-G812.

MEIER, P.J. (1996). Hepatocellular transport systems: from carrier identification in membrane vesicles to cloned proteins. *J. Hepatol.* 24, 29-40.

MEIER, P.J., MEIER-ABT, A.S. y BOYER, J.L. (1987). Properties of the canalicular bile acid transport system in rat liver. *Biochem. J.* 242, 465-469.

MEIJER, D.K.F., VONK, R.J. y WEITERING, J.G. (1978). The influence of various bile salts and some cholephilic dyes on Na⁺-K⁺ and Mg²⁺ activated ATPase of rat liver in relation to cholestatic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43, 597-612.

MEISTER, A. (1975). Metabolism of sulfur compounds. En: *Metabolic Pathways*. Ed. D.M. Greenberg. Academic Press, Nueva York. pp. 101-188.

MEISTER, A. y ANDERSON, M.E. (1983). Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711-760.

MEISTER, A., TATE, S.S. y GRIFFITH, O.W. (1981). γ -Glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol.* 77, 237-253.

MEISTER, A., TATE, S.S. y ROSS, L.L. (1976). Membrane bound γ -glutamyl transpeptidase. En: *The Enzymes of Biological Membranes*. Ed. A. Martinosi. Plenum Publishing, Nueva York, pp. 315-347.

MEREDITH, M. y REED, DJ. (1988). Depletion in vitro of mitochondrial GSH in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and BCNU. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1383-1388.

MEZES, M., PAR, A., BARTOSIEWICZ, G. y NEMENTH, J. (1987). Vitamin E content and lipid peroxidation of blood in some chronic inflammatory diseases. *Acta Physiol. Hung.* 69, 133-138.

MICHIELS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O. y RAMACLE, J. (1994). Importance of γ -glutamyl transpeptidase, catalase and Cu,Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 235-248.

MINGRONE, G., GRECO, A.V., BONIFORTI, L. y PASSI, S. (1983). Analysis of conjugated bile acids by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Lipids* 18, 90-95.

MIRSA, H.P. y FRIDOVICH, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.

MITTERER, K.E. (1975). Untersuchungen zum Schlüpfen der Miracidien des Kleinen Leberegels *Dicrocoelium dendriticum*. *Z. Parasiten.* 48, 35-45.

MOHAMED, A.R.E. y MUMMERY, V. (1990). Human dicrocoeliosis. Report of 208 cases from Saudi Arabia. *Trop. Geogr. Med.* 42, 1-7.

MOHAN, P., LING, S. y WATKINS, J. (1994). Ontogeny of the hepatobiliary secretion: role of glutathione. *Hepatology* 19, 1504-1512.

MONCADA, S. y HIGGS, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329, 2002-2011.

MOSELEY, R.H., MEIER, P.J., ARONSON, P.S. y BOYER, J.L. (1986). Na⁺-H⁺ exchange in rat liver basolateral but no canalicular plasma vesicles. *Am. J. Physiol.* 250. G35-G43.

MOSS, G.D. (1970). The excretory metabolism of the endoparasitic digenean *Fasciola hepatica* and its relationship to its respiratory metabolism. *Parasitology* 60, 1-19.

MOURELLE, M. y MEZA, M.A. (1990). CCl₄-induced lipoperoxidation triggers a lethal defect in the liver plasma membranes. *J. Appl. Toxicol.* 10, 23-27.

MÜLLER, M., ISHIKAWA, T., BERGER, U., KLÜNEMANN, C., LURKA, L., SCHREGER, A., KANNICKT, C., REUTTER, W., KURZ, G. y KEPPLER, D. (1991). ATP-dependent transport of taurocholate across the hepatocyte canalicular membrane mediated by 110-KD glycoprotein binding ATP and bile salt. *J. Biol. Chem.* 266, 18920-18926.

MÜLLER, M. y JANSEN, P. (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* 272, G1285-1303.

MÜLLER, M., MEIJER, C., ZAMAN, G.J.R., BORST, P., SCHEPER, R.J., MULDER, N.H., DE VRIES, E.G.E. y JANSEN, P.L.M. (1994). Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 13033-13037.

MURACA, M., FEVERY, J. y BLACKAERT, N. (1988). Analytical aspects and clinical interpretation of serum bilirubins. *Semin. Liver Dis.* 8, 137-147.

NAKASHIMA, O., WATANABE, J., TAGUCHI, J., OKUDAIRA, S., NAKASHIMA, Y., YASUNAGA, M., IHA, H., KOJIRO, M., TANAKA, M., MAJIMA, Y., TANIKAWA, K., TANIWAKI, S., SAIT-

SU, H. y NAKAYAMA, T. (1994). Clinicopathologic study on necrotic nodules in the liver. *Acta Hepatol. Jpn.* 35, 527-535.

NANJI, A.A., GRINIUVIENE, B., SADRZADES, S.M.H., LEVITSKY, S. y McCULLY, J.D. (1995). Effect of type of dietary fat and ethanol on antioxidant enzyme mRNA induction in rat liver. *J. Lipid Res.* 36, 736-744.

NASH, T. (1953). The colorimetric stimulation of formaldehyde by means of the Hautzsch reaction. *J. Biol. Chem.* 239, 416-421.

NATHANSON, M.H. y BOYER, J.L. (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14, 551-556.

NEBERT, D.W., ADESNIK, M., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., GONZALEZ, F.J.M., GUENGERICH, F.P., GUNSALUS, I.C., JOHNSON, E.F., KEMPER, B., LEVIN, W., PHILLIPS, J.R., SATO, R., y WATERMAN, M.R. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.* 6, 1-11.

NEBERT, D.W., NELSON, D.R., ADESNIK, M., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., GONZALEZ, F.J., GUENGERICH, F.P., GUNSALUS, I.C., JOHNSON, E.J., KEMPER, B., LEVIN, W., PHILLIPS, I.R., SATO, R. y WATERMAN, M.R. (1989). The P450 gene superfamily: update on listing of all genes and recommended nomenclature of chromosomal loci. *DNA Cell. Biol.* 8, 1-14.

NEBERT, D.W., NELSON, D.R., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., FEVEREISEN, R, FUJII-KURIYAMA, Y., GONZALEZ, F.J., GUENGERICH, F.P., GUNSALUS, J.C., JOHNSON, E.F., LOPER, J.C., SATO, R., WATERMAN, M.R. y WAXMAN, D.J. (1991). The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.* 10, 1-4.

NERVI, F., DEL POZO, R., COVARRUBIAS, C. y RONCO, B. (1983). The effect of progesterone on the regulatory mechanisms of biliary cholesterol secretion in the rat. *Hepatology* 3, 360-367.

NEUHAUS, W. (1936). Untersuchungen über bau und Entwicklung der Lanzettegel-Cercarie (*Cercaria Vitrina*) und Klarstellung des Infektionsvorganges beim Endwirt. *Z. Parasiten.* 8, 431-473.

OBERLEY, L.W. y OBERLEY, T.D. (1988). Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation. *Mol. Cell. Biol.* 84, 147-153.

OBERLEY, L.W., ST CLAIR, D.K., AUTOR, A.P. y OBERLEY, T.D. (1987). Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch. Biochem. Biophys.* 254, 69-80.

O'BRIEN, P.J. y RAHIMTULA, A.D. (1978). A peroxidase assay for cytochrome P-450. En: *Methods in Enzymology. Vol. LII part C. Biomembranes.* Ed. S. P. Colowick y N.O. Kaplan. Academic Press, Orlando, pp 408-409.

ODHNER, T. (1901). Nordafrikanische Trematoden grösstenteils von Weissen Nil: I. Fascioliden. En: *Results of the Swedish Zoological Expedition to Egypt and the White Nile*. Royal University, Uppsala.

OELDBERG, D.G., ROGER, M.D. y LESTER, M.D. (1986). Cellular mechanisms of cholestasis. *Ann. Rev. Med.* 37, 297-317.

OKADA, T., KAWASHIMA, K., FUKUSHI, S., MINAKUCHI, T. y NISHIMURA, S. (1994). Association of a cytochrome P450IA1 genotype with human lung cancer and metastasis. *Pharmacogenetics* 4, 333-340.

OKOLICSANYI, L., LIZUSSI, F., STRAZZABOSCO, M., JEMMOLO, R., ORLANDO, R., NASSUATO, G., MURACA, M y CREPALDI, G. (1986). The effect of drugs on bile flow and composition. An overview. *Drugs* 31, 430-448.

OMURA, T. y SATO, R.J. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385.

ORLOWSKI, M. y WILK, S. (1976). Metabolism of gamma-glutamyl amino acids and peptides in mouse liver and kidney in vivo. *Eur. J. Biochem.* 71, 549-555.

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. (Ed). (1986). Oxygen activation and transfer. En: *Cytochrome P-450. Structure, Mechanism and Biochemistry*. Plenum Press, Nueva York, pp. 217-273.

OSHIO, C., MIYAIRI, M., WATANABE, S., SMITH, C.R. y PHILLIPS, M.J. (1995). Colchicine effect on bile canalicular motility: long-term study using isolated cultured hepatocytes and time-lapsed cinemography. *Liver* 5, 101-107.

OUDE-ELFERINK, R.P.J., MEIJER, D.K.F., KUIPERS, F., JANSEN, P.L.M., GROEN, A.K. y GROOTHUIS, G.M.M. (1995). Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochem. Biophys. Acta* 1241, 215-268.

OUDE-ELFERINK, R.P.J., OTTENHOFF, R., RADOMINSKA, A., HOFMANN, A.F., KUIPERS, F. y JANSEN, P.L.M. (1991). Inhibition of glutathione-conjugate secretion from isolated hepatocytes by dipolar bile acids and other organic anions. *Biochem. J.* 274, 281-286.

OUDE-ELFERINK, R.P.J., OTTENHOFF, R., VAN WIJLAND, M., FRIJTERS, C.M.G., VAN NIEUWKERK, C. y GROEN, A.K. (1996). Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdr2 P-glycoprotein. *J. Lipid Res.* 37, 1065-1075.

PANOZZO, P.M., BASSO, D., BALINT, L., BIASIN, M.R., BONVICINI, P. y METUS, P. (1995). Altered lipid peroxidation/glutathione ratio in experimental extrahepatic cholestasis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 266-271.

PASTOR, A., COLLADO, P.S., ALMAR, M. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1996). Microsomal function in biliary obstructed rats: effects of S-adenosylmethionine. *J. Hepatol.* 24, 353-359.

PASTOR, A., COLLADO, P.S., ALMAR, M. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1997). Antioxidant enzyme status in biliary-obstructed rats: effects of S-adenosylmethionine. *J. Hepatol.* 27, 363-367.

PAULUSMA, C.C., BOSMA, P.J., ZAMAN, G.J.R., BAKKER, C.T.M., OTTER, M., SCHEFFER, G.L., SCHEPER, R.J., BORST, P. y OUDE-ELFERINK, R.P.J. (1996). Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271, 1126-1128.

PAUMGARTNER, G. y PAUMGARTNER, D. (1982). Current concepts of bile formation. En: *Progress in Liver Diseases. Vol VII.* Ed. H. Popper y F. Schaffner. Grune and Stratton, Nueva York, pp. 207-220.

PAUMGARTNER, G. y SAUERBRUCH, T. (1983). Secretion, composition and flow of bile. *Clin. Gastroenterol.* 1, 3-23.

PEGREFFI, G. (1957). La distomatosi epatica da *Dicrocoelium dendriticum*. *Veterinaria Italiana* 8, 123-135.

PETERSON, J.A., EBEL, R.E. y D'KEEFFE, D.H. (1978). Dual-wavelength stopped-flow spectrophotometric measurement of NADPH-cytochrome P-450 reductase. En: *Methods in Enzymology, LII.* Ed. S. Fleischer y L. Packer. Academic Press, Nueva York, pp. 221-226.

PETERSON, R.E. y FUJIMOTO, J.M. (1973). Retrograde intrabiliary injection: absorption of water and other compounds from the rat biliary tree. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985, 150-162.

PETROV, Yu.F. y ABALIKHIN, B.G. (1983). Biochemical indicators and the microflora of the bile and intestinal contents in sheep with dicrocoeliasis. *Veterinariya* 3, pp. 45-47.

PHILLIPS, D.J., POUCELL, S y ODA, M. (1986). Biology of disease. Mechanisms of cholestasis. *J. Lab. Clin. Med.* 112, 679-685.

PICKETT, C.B. y LU, A.Y.H. (1989). Glutathione S-transferases: genes structure, regulation and biological function. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 743-764.

PINTO, M.C., MATA, A.M. y LÓPEZ-BAREA, J. (1984). Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 1-12.

POLJAKOVA-KRUSTEVA, O., CHANDRA, G. y SVILENOV, D. (1974). Studies on experimental dicrocoeliasis in lambs, pigs and guinea-pigs. IV. Morphological changes in the liver of lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Izvestiya na Tsentralnata Khelmintologichna Laboratoriya* 17, 101-110. En: *Helminth. Abstr.* (1975), 44 (10), n° 4822.

POPPER, H. (1986). General pathology of the liver: light microscopic aspect serving diagnosis and interpretation. *Semin. Liver Dis.* 6, 175-184.

POUPON, R.E. y EVANS, N.H. (1979). Biochemical evidence that Na⁺-K⁺ ATPase is located at the lateral region of the hepatocyte surface membrane. *FEBS Lett.* 108, 374-378.

PRICE, C.P., HILL, P.G. y SAMMONS, H.G. (1972). The nature of alkaline phosphatases of bile. *J. Clin. Pathol.* 25, 149-154.

PRICE, E.W. y CHILD, P.L. (1971). Dicrocoeliasis (Distomiasis, Lancet Fluke Disease). En: *Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases*. Ed. R.A. Marcial-Rojas. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 498.

PRIESTLY, B.G. y PLAA, G.L. (1970). Sulfobromophthalein metabolism and excretion in rats with iodometane-induced depletion of hepatic glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 174, 221-231.

PRUNESCU, C., PRUNESCU, P., FROMUNDA, V., PARASCHIVESCU, D. y POPESCU, S. (1979). Histopathological changes of the liver in hamsters with experimental dicrocoeliasis. *Arch. Vet.* 14, 83-91.

PUGLIELLI, L., RIGOTTI, A., AMIGO, L., NÚÑEZ, L., GRECO, A.V., SANTOS, M.J y NERVI, F. (1996). Modulation of intrahepatic cholesterol trafficking-evidence by in vivo antisense treatment for the involvement of sterol carrier protein-2 in newly synthesized cholesterol transport into rat bile. *Biochem. J.* 317, 681-687.

PULLAN, N.B., SEWELL, M.M.H. y HAMMOND, J.A. (1970). Studies on the pathogenicity of massive infections of *Fasciola hepatica* in lambs. *Br. Vet. J.* 126, 543-558.

QUIRÓZ, H. (1984). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Limusa, México.

RACLIFFE, L.H. (1968). Hatching of *Dicrocoelium dendriticum* eggs. *Exp. Parasitol.* 23, 67-78.

RADAK, Z., ASANO, K., INOUE, M., KIZAKI, T., OH-ISHI, S., SUZUKI, K., TANIGUCHI, N. y OHNO, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 72, 189-194.

RADI, R. (1996). Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 828-835.

RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M. y FREEMAN, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266, 4244-4250.

RAHKO, T. (1972). Studies on the pathology of dicrocoeliasis and fascioliasis in the goat. I. The histopathology of the liver and bile ducts. *Acta Vet. Scand.* 13, 554-562.

RANUCCI, S. y GROL-RANUCCI, H. (1978). Ricerche ematochimiche in ovini con lesioni parassitarie del fegato. *Clin. Vet.* 101, 324-333.

RANUCCI, S., MUGHETTI, L., AMBROSI, M. y GRELLONI, V. (1981). Rilievi ematochimici, anatomo-istopatologici e parassitologici in ovini infetti da dicroceliosi. *Rivista di Zootecnia e Veterinaria* 9, 173-175.

RAPPAPORT, A.M. (1973). The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc. Res.* 6, 212-228.

RAPPAPORT, A.M. (1980). Hepatic blood flow: morfologic aspects and physiologic regulation. En: *International Review of Physiology. Vol. 21. Liver and Biliary Tract.* Ed. H.B. Javitt. University Park Press, Baltimore, pp. 1-63.

REED, D.J. (1986). Regulation of reductive process by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 35, 7-13.

REICHEN, J., BUTERS, J.T.M., SOJCIC, Z. y ROOS, F.J. (1992). Abnormal lipid composition of microsomes from rat liver. Does it contribute to decreased microsomal function?. *Experientia* 48, 482-486.

REINA, D., NAVARRETE, I., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S. y HABELA, M. (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación: II. Helmintos. *Rev. Iber. Parasitol., Vol. Extraordinario*, 85-90.

REINHARDT, P. (1978). Untersuchungen zur medikamentellen Metaphylaxe bei der Dikrozölise des Schafes. *Monatsh. Veterinärmed.* 33, 898-901.

RENNER, E.L., LAKE, J.R., SCHARSCHMIDT, B.F., ZIMMERLI, B. y MEIER, P.J. (1989). Rat hepatocytes exhibit basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport. *J. Clin. Invest.* 83, 1225-1235.

RENZ, B. (1972). Die Immunantwort bei der experimentellen Fasciolose und Dicrocoeliose des Kaninchens. *Inaug. Diss. Univ. Zürich*, pp. 33.

REUBEN, A. (1984). Bile formation and mechanisms. *Hepatology* 5, 155-245.

RICHARDS, W.L., TSUKUDA, Y. y POTTER, V.R. (1982). γ -glutamyltranspeptidase and α -fetoprotein expression during α -naphthylisothiocyanate-induced hepatotoxicity in rats. *Cancer Res.* 42, 5133-5138.

RISTER, M. y BAEHNER, R.L. (1976). The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 58, 1174-1184.

ROBERTS, S.K., LUDWIG, J. y LARUSSO, N.F. (1997). The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 112, 269-279.

ROCHE, P.J.L. (1948). Human dicrocoeliasis in Nigeria. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 41, 819-820.

RODA, A., CAPPELLERI, G., ALDANI, R., RODA, E. y BARBARA, L. (1982). Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J. Lipid Res.* 23, 490-495.

ROJO-VÁZQUEZ, F.A., CORDERO DEL CAMPILLO, M., DÍEZ-BAÑOS, P. y CHATON-SCHAFFNER, M. (1981). Relation existant entre le nombre d'oeufs dans les feces et la charge parasitaire lors des infestations naturelles à *Dicrocoelium dendriticum* chez les ovins. *Rev. Méd. Vét.* 132, 601-607.

ROMÁN, I.D., MONTE, M.J., GONZÁLEZ-BUITRAGO, J.M., ESTELLER, A. y JIMÉNEZ, R. (1990). Inhibition of hepatocytary vesicular transport by cyclosporin A in the rat: relationship with cholestasis and hyperbilirubinemia. *Hepatology* 12, 83-91.

ROMANO, M., FACCINETTI, T. y SALMONA, M. (1983). Is there a role for nuclei in the metabolism of xenobiotica?. A review. *Drug Metab. Rev.* 14, 803-829.

ROMERO, F.J. y CADENAS, E. (1987). Hydroperoxide metabolism in vitamin E-deficient hepatocytes treated with L-buthionine sulfoximine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 1116-1121.

ROSEF, O. SKEJERVE, E y GRODUM, A. (1985). Liver flukes in ruminants in the country of Aust-Agder, Norway. The influence of liver flukes on the weight of lamb carcasses. *Norsk-Veterinaertidsskrift* 97 (11), 733-737. En: *Helminth. Abstr.* (1986), 55, n° 1102.

ROSICKY, B. y GROSCHAFT, J. (1982). Dicrocoeliosis. En: *CRC handbook series in zoonoses. Section C: parasitic zoonoses. Volume III.* Ed. G.V. Hillyer y C.E. Hopla. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 33-52.

ROTRUCK, J.T., POPE, A.L., GANTHER, H.E., SWANSON, A.B., HAFEMAN, D. y HOEKSTRA, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.

ROUER, E., DANSETTE, P., BEAUNE, P. y LEROUX, J.P. (1980). Membrane fluidity and drug metabolism in liver microsomes of lean, ob/ob, and db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 41-46.

ROWLANDS, D.T. y CLAMPITT, R.B. (1979). Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 5, 155-175.

RUDOLPHI, C.A. (1819). *Entozoorum synopsis*. Author, Berlín, pp. 92-93.

RUETZ, S. y GROS, P. (1995). Enhancement of Mdr2-mediated phosphatidylcholine translocation by the bile salt taurocholate. Implications for hepatic bile formation. *J. Biol. Chem.* 270, 25388-25395.

RUIZ, J., MUÑOZ, M.E., ESTELLER, A. y GONZÁLEZ, J. (1988). The effect of methimazole on bile flow and bile acid secretion in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 37, 383-389.

RUSSELL, D.W. y SETCHELL, K.D.R. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31, 4733-4749.

SAEZ, J.C. y HERTZBERG, E.L. (1988). Gap junctions between hepatocytes: structural and regulatory features. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, H. Popper, W. B. Jakoby, D. Schachter y D.A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 851-866.

SALIMOVA, M. (1972). Experimental dicrocoeliasis of Karakul lambs. *Trudy VII Vsesoyuznoi Konferentsii po Prirodnoi Ochagovosti Boleznei i Obdchim Voprosam Parazitologii Zhivotnykn, 14-18 Oktyabrya 1969, Samarkand, 6 (2)*. Tashkent, USSR: Izdatel'stvo "FAN" Uzbekskoi SSR: 155-157. En: *Helminth. Abstr.* (1974) 43 (12), n° 4850.

SALIMOVA, M. y SALIMOV, B. (1972). Changes in vitamin A content in the serum of lambs with experimental *Dicrocoelium* infection. *Gel'minty pischevykh produktov. Tezisy dokladov mezhhrespublikanskoi nauchnoi konferentsii, Dekabrya 1972 goda*. Samarkand, USSR: 93. En: *Helminth. Abstr.* (1978), 47 (7), n° 3049.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S., LÓPEZ-ACEBO, R., GONZÁLEZ P., CULEBRAS, J.M., TUÑÓN, M.J. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1998). Cholestasis and alterations of glutathione metabolism induced by Tacrolimus (FK506) in the rat. *Transplantation* 66, 84-88.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUÑÓN, M.J., GONZÁLEZ, P., CAMPO, R., FERRERAS, M.C., MANGA, Y. y GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (1996). Effects of experimental dicrocoeliosis on oxidative drug metabolism in hamster liver. *Comp. Biochem Physiol.* 115C, 55-60.

SANTIARD, D., RIBIERE, C., NORDMANN, R. y HOUEE-LEVIN, C. (1995). Inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 121-127.

SATO, K., NIKI, E. y SCHIMAZAKI, H. (1990). Free-radical mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch. Biochem. Biophys.* 279, 402-405.

SATO, R. y OMURA, T. (Ed). (1978). *Cytochrome P-450*. Kodansha Ltd., Academic Press, Tokyo/Nueva York.

SCHACHTER, D. (1994). The hepatocyte plasma membrane: Organization and differentiation. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I. M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D. Schachter y D. A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 145-154.

SCHIRMER, R.H., KRAUTH-SIEGEL, R.L. y SCHULZ, G.E. (1989). Glutathione reductase. En: *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspect. (Part A)*. Ed. D. Doplin, R. Poulson y O. Avramovic. Wiley, Chischester, pp. 553-596.

SCHRÖDER, L. y GEYER, E. (1976). Experimentelle Dicroceliose: Bildung humoraler Antikörper heim Goldehamster (*Mesocricetus auratus*, Waterhouse). *Behring Inst. Mitt.* 60, 24-37.

SEELING, G.F. y MEISTER, A. (1984). Gamma-glutamylcysteine synthetase. Interactions of an essential sulfhydryl group. *J. Biol. Chem.* 259, 3534-3538.

SEKURA, R. y MEISTER, A. (1977). γ -glutamylcysteine syntetase. Further purification "half of the sites" reactivity, subunits and specificity. *J. Biol. Chem.* 252, 2599-2605.

SELLINGER, M. y BOYER, J.L. (1990). Physiology of bile and cholestasis. En: *Progress in Liver Diseases. IX*. Ed H. Popper, F. Schaffner y W. B. Saunders, Filadelfia, pp. 237-259.

SERAGENT, O., MOREL, I., CHEVANNE, M., CILLARD, P. y CILLARD, J. (1995). Oxidative stress induced by ethanol in rat hepatocyte cultures. *Biochem. Mol. Biol. Inter.* 35, 575-583.

SETCHELL, K.D.R., LAWSON, A.M., TANIDA, N. y SJÖVALL, J. (1983). General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids related compounds in feces. *J. Lipid Res.* 24, 1085-1100.

SETCHELL, K.D.R. y MATSIN, A. (1983). Bile acid analysis: the application of liquid-gel chromatographic techniques and capillary column gas chromatography and mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 127, 1-17.

SHAN, X., AW, T.Y. y JONES, D.P. (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac. Ther.* 47, 61-71.

SHEFER, S., HAUSER, S., BEKERSKY, I. y MOSBACH, E.H. (1970). Biochemical side of regulation of bile acid synthesis in the rat. *J. Lipid Res.* 11, 404-411.

SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. y AMES., B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10771-10778.

SHINITZKY, M y BARENHOLZ, Y. (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* 515, 367-394.

SHODA, J., TOLL, A., AXELSON, M., PIEPER, F., WIKVALL, K. y SJÖVALL, J. (1993). Formation of 7 α - and 7 β -hydroxylated bile acid precursors for 27-hydroxycholesterol in human liver microsomes and mitochondria. *Hepatology* 17, 395-403.

SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219.

SIES, H., BARTOLI, G.M., BURK, R.F. y WAYDHAS, C. (1978). Glutathione efflux from perfused rat liver phenobarbital treatment, during drugs oxidation, and in selenium deficiency. *Eur. J. Biochem.* 89, 113-118.

SIGUIER, F., FELD, P.M., WELTI, J.J. y LUMBROSO, P. (1952). Tribulations neurologiques d'un jeune berger de distomatose cérébrale à *Dicrocoelium lanceolatum*. *Bulletin et Mémoires de la Société de Médecine des Hôpitaux de Paris* 9/10, 353.

SINCLAIR, K.B. (1967). Pathogenesis of *Fasciola* and other liver flukes. *Helminth. Abstr.* 36, 115-134.

SIRICA, A.E. y CIHLA, H.P. (1984). Isolation and partial characterization of oral and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the livers of carcinogen and noncarcinogen-treated rats. *Cancer Res.* 44, 3454-3456.

SIRICA, A.E. y WILLIAMS, T.V. (1992). Appearance of ductular hepatocytes in rat liver after bile duct ligation and subsequent zone 3 necrosis by carbon tetrachloride. *Am. J. Pathol.* 140, 129-136.

SJÖVALL, J., LAWSON, A.M. y SETCHELL, K.D.R. (1985). Mass spectrometry of bile acids. En: *Methods in Enzymology. Vol. III.* Ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan. Academic Press, Orlando, pp. 63-113.

SLATER, T.F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 222, 1-15.

SLATER, T.F., CHEESEMAN, K.H., DAVIES, M.J., PROUDFOOT, K. y XIN, W. (1987). Free radical mechanisms: in relation to tissue injury. *Proc. Nutr. Soc.* 46, 1-12.

SLOTT, P.A., LIU, M.H. y TAVOLONI, N. (1990). Origin, pattern, and mechanisms of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 99, 466-477.

SMIT, J.J.M., SCHINKEL, A.M., OUDE-ELFERINK, R.P.J., GROEN, A.K., WAGENAAR, E., VAN DEEMTER, L. y MOL, C.A.A.M. (1993). Homozigous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451-462.

SMIT, M.J., VERKADE, H.J., HAVINGA, R., VONK, R.J., SCHERPHOF, G.L., IN'T VELD, G. y KUIPERS, F. (1994). Dietary fish oil potentiates bile acid-induced cholesterol secretion into bile in rats. *J. Lipid Res.* 35, 301-310.

SMITH, N.D. y BOYER, J.L. (1982). Permeability characteristics of bile duct in the rat. *Am. J. Physiol.* 242, G52-G57.

SNYDER, S.H. y BREDDT, D.S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* May, 68-77.

SOMANI, S.M., HUSAIN, K., DIAZ-PHILLIPS, L., LANZOTTI, D.J., KARETI, K.R. y TRAMMELL, G.J. (1996). Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of rat. *Alcohol* 13, 603-610.

SOMANI, S.M., HUSAIN, K. y SCHLORFF, E.C. (1997). Response of antioxidant system to physical and chemical stress. En: *Oxidants, antioxidants and free radicals.* Ed. S.Y. Baskin y H. Salem. CRC Taylor & Francis, Washington, pp. 125-129.

SOMVANSHI, R., VAID, J., BISWAS, J.C. y JITHENDRAN, K.P. (1992). Clinicopathological observations on dicrocoeliasis in goats. *Indian J. Vet. Pathol.* 16, 112-114.

SONG, W., PIERCE, W.M. Jr, SAEKI, Y., REDINGER, R.N. y PROUGH, R.A. (1996). Endogenous 7-oxocholesterol is an enzymatic product: characterization of 7 alpha-hydroxycholesterol dehydrogenase activity of hamster liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 272-282.

SOULSBY, E.J.L. (1965). *Textbook of Veterinary Clinical Pathology. Vol. I. Helminths*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.

SOULSBY, E.J.L. (1968). *Helminths, Arthropods and Protozoa of domestic animals*. Baillière, Londres.

SOULSBY, E.J.L. (1988). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Nueva Editorial Interamericana, México D.F.

SPEISKY, H., GURASEKARA, A., VARGHESE, G. y ISRAEL, Y. (1987). Basolateral gamma-glutamyltransferase ectoactivity in the rat liver: effects of chronic alcohol consumption. *Alcohol* 1, 245-249.

SPEISKY, H., SHACKEL, N., VARGUESE, G., WADE, D. y ISRAEL, Y. (1990). Role of hepatic -glutamyltransferase in the degradation of circulating glutathione: studies in the intact guinea pig perfused liver. *Hepatology* 11, 843-849.

SRIVASTAVA, G.C., KOLEV, C. y GEORGIEV, M. (1978). A surgical approach to trace the route of migration of *D. dendriticum* in the laboratory animals. *Rivista di Parassitologia* 39, 131-136.

STEELE, J.H. (1982). *Handbook series in Zoonoses. Section C: Parasitic Zoonoses Vol. III*. G.V. Ed. G.V. Hillyer y C.E. Hopla. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, pp. 33-52.

STOLZ, A., TAKIKAWA, H., OOKHTENS, M. y KAPLOWITZ, N. (1989). The role of cytoplasmic proteins in hepatic bile acid transport. *Ann. Rev. Physiol.* 51, 161-176.

STRANGE, R.C. (1984). Bile flow. *Physiol. Rev.* 64, 1055-1102.

STRAZZABOSCO, M., MENNOE, A. y BOYER, J.L. (1991). Intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 87, 1503-1512.

STRAZZABOSCO, M., ZSEMBERY, A. y FABRIS, L. (1996). Electrolyte transport in bile ductular epithelial cells. *J. Hepatol.* 24, 78-87.

SUCHY, F.J., BALISTERY, W.F. y HUNG, J., MILLER, P. y GARFIELD, S. (1983). Intracellular bile acid transport in rat liver as visualized by electron microscope autoradiography using a bile acid analogue. *Am. J. Physiol.* 245, G681-G689.

SUTTORP, N., TOEPPER, W. y ROKA, L. (1986). Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase. *Am. J. Physiol.* 215, CV671-680.

SVADZHYAN, P.K. (1951). Contribution to the study of the snails serving as intermediate hosts of *Dicrocoelium lanceatum*. *Izv. AN Armyanskoi SSR* 4, 649-656.

SVADZHYAN, P.K. (1959). Puti migracii metacerkarii *Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hasall, 1896 v organizme okonchatel'nogo joziaina. *Veterinariya* 36, 45-48.

SYKES, A.R., COOP, R.L. y RUSHTON, B. (1980). Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. *Res. Vet. Sci.* 28, 63-70.

TALALAY, P. (1960). Enzymatic analysis of steroid hormones. *Met. Biochem. Anal.* 8, 119-143.

TARRY, D.W. (1969). *Dicrocoelium dendriticum*: the life cycle in Britain. *J. Helminthol.* 43, 403-416.

TAVOLONI, N. (1987). The intrahepatic biliary epithelium: an area of growing interest in Hepatology. *Sem. Liver Dis.* 7, 280-292.

TAVOLONI, N. (1988). Biliary clearance of inert carbohydrates: Expectations and results. *Gastroenterology* 94, 217-228.

TAVOLONI, N., WYSSBROD, H.R. y JONES, M.J.T. (1986). Permeability characteristics of the guinea pig biliary apparatus. *Hepatology* 6, 1369-1381.

TEKWANI, B.L., SHUKLA, O.P. y GHATAKI, S. (1988). Altered drug metabolism in parasitic diseases. *Parasitol. Today* 4, 4-10.

TEPHLY, T.R. y BURCHELL, B. (1990). The UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharmacol. Sci.* 7, 276-279.

THEODORIDIS, Y., DUNCAN, J.L., MACLEAN, J.M. y HIMONAS, C.A. (1991). Patophysiological studies on *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 39, 61-66.

THOMA, M., MAHARA, R., TAKESHITA, H., KUROSAWA, T., IKEGAWA, S. y NITTONO, H. (1985). Synthesis of the 1 -hydroxylated bile acids and identification of 1 , 3 , 7 -trihydroxy- and 1 , 3 , 7 , 12 -tetrahydroxy-5 -cholan-24-oic acids in human. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3071-3073.

THOMAS, C.E. y AUST, S.D. (1985). Rat liver microsomal NADPH-dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* 1, 293-300.

THOMAS, P.J. y HOFFMAN, A.F. (1973). A simple calculation of the lithogenic index of bile: expressing biliary lipid composition on rectangular coordinates. *Gastroenterology* 65, 698-700.

TIETZE, R. (1969). Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxydized glutathione. Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502-522.

TOPARLAK, M. y GUL, Y. (1988). Investigations on liver flukes in sheep slaughtered at local abattoirs in Van, Turkey. *Vet. Fak. Dergisi Ankara Univ.* 35, 269-274.

TSUI, W.M.S., YUEN, R.W.S., CHOW, L.T.C. y TSE, C.C.H. (1992). Solitary necrotic nodule of the liver: parasitic origin. *J. Clin. Pathol.* 45, 975-978.

TUCHWEBER, B., WEBWE, A., ROY, C. y YOUSEF, Y.M. (1992). Mecanismos de experimentalmente induced intrahepatic cholestasis. *Prog. Liv. Dis.* 8, 167-178.

TUCHWEBER, B., YOUSEF, Y.M., FERLAND, G. y PEREA, A. (1996). Nutrition and bile formation. *Nutr. Res.* 16, 1041-1080.

TUJENKJI, A.E., ALVINERIE, M., PINEAU, T., BOULARD, C. y GALTIER, P. (1988). Incidence of subclinical fascioliasis on antipyrine clearance and metabolite excretion in sheep. *Xenobiotica* 18, 357-364.

TUÑÓN, M.J., GONZÁLEZ, P., LÓPEZ, P., SALIDO, G.M. y MADRID, J.A. (1992). Circadian rhythms in glutathione and glutathione-S transferase activity of rat liver. *Arch. Int. Physiol. Biophys.* 100, 83-97.

TURLEY, S.D. y DIETSCHY, J.M. (1988). The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. En: *The Liver. Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, H. Popper, W.B. Jakoby, D. Schachter y D.A. Schafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 617-641.

TURRENS, J.F., ALENXANDER, A. y LEHNINGER, A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 104-111.

ULLRICH, V. y WEBER, P. (1972). The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.* 353,1171-1177.

UTILI, R., TRIPODI, M.F., ABERNATHY, C.O., ZIMMERMAN, H.J. y GILLESPIE, J. (1992). Effects of bile salt infusion on chlorpromazine induced cholestasis in the isolated perfused rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 199, 49-55.

VANG, O., JENSEN, M.B. y AUTRUP, H. (1990). Induction of cytochrome P450 IA1 in rat colon and liver by indole-3-carbino and 5,6-benzoflavone. *Carcinogenesis* 11, 1259-1263.

VERKADE, H.J., VONK, R.J. y KUIPERS, F. (1995). New insights into the mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion. *Hepatology* 21, 1174-1189.

VERKADE, H.J., WOLBERS, M.J., HAVINGA, R., UGES, D.R., VONK, R.J. y KUIPERS, F. (1990). The uncoupling of biliary lipid from bile acid secretion by organic anions in the rat. *Gastroenterology* 99, 1485-1492.

VILLANGER, O., VEEL, T. y RAEDER, M.G. (1993). Secretion causes H⁺ secretion from intrahepatic bile ductules by vacuolar-type H⁺ ATPase. *Am. J. Physiol.* 265, 719-724.

VILLANUEVA, G.R., HERREROS, M., PÉREZ BARRIOCANAL, F., BOLAÑOS, J.P., BRAVO, P. y MARÍN, J.J.G. (1990). Enhancement of bile acid-induced biliary lipid secretion by streptozotocin in rats: role of insulin deficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 115, 441-448.

VON BRAND, T. (1966). *Biochemistry of Parasites*. Academic Press, Nueva York.

VYVODA, O.S., COLEMAN, R. y HOLDSWORTH, G. (1977). Effects of different bile salts upon the composition and morphology of a liver plasma membrane preparation: deoxycholate is more membrane damaging than cholate and its conjugates. *Biochim. Biophys. Acta* 465, 68-76.

WATANABE, N., TSUKADA, N., SMITH, C.R. y PHILLIPS, M.J. (1991). Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J. Cell Biol.* 113, 1069-1080.

WATKINS, P.B. (1990). Role of cytochrome P450 in drug metabolism and hepatotoxicity. *Semin. Liver. Dis.* 10, 235-250.

WATKINS, P.B. (1992). Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 21, 511-526.

WEDRYCHOWICZ, H., DUCOMMUN, D., GORSKI, P. y PFISTER, K. (1995). Somatic antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* recognised by bile antibodies of naturally infected cattle. *Vet. Parasitol.* 56, 47-56.

WEINMAN, S.A., GRAF, J. y BOYER, J.L. (1989). Voltage-driven, taurocholate dependent secretion in isolated hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 256, 6826-6832.

WERNER, P. y COHEN, G. (1993). Glutathione disulfide (GSSG) as a marker of oxidative injury to brain mitochondria. *Ann. NY Acad. Sci.* 679, 364-369.

WHEELER, H.O. y MANCUSI-UNGARO, P.L. (1966). Role of bile ducts during secretion choleresis in dogs. *Am. J. Physiol.* 210, 1153-1159.

WHITING, M.J. (1986). Bile acids. *Adv. Clin. Chem.* 25, 169-232.

WIELANDT, A.M., PIZARRO, M., SOLIS, N., ARRESE, M. y ACCATINO, L. (1993). Postcholestatic alkaline phosphatase activity after relief of bile duct obstruction in the rat. *Hepatology* 18, 179-187.

WILLIAMS, R.T. (1971). En: *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. Ed. B.N. LaDu, H.G. Mandel y E.L. Way. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 187-195.

WILLS, E.D. (1987). Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. En: *Biochemical Toxicology: a Practical Approach*. Ed. K. Snell y B. Mullock. IRL Press, Oxford, pp. 127-152.

WINTERS, D.K. y CEDERBAUM, A.I. (1993). Biochemistry of cytochrome P450. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion. Physiology and Pathophysiology*. Ed. N. Tavoloni y P.D. Berk. Raven Press, Nueva York, pp. 407-420.

WITZLEBEN, C.L., BOYER, J.L. y NGO, C.H. (1987). Manganese-bilirubin cholestasis. Further studies in pathogenesis. *Lab. Invest.* 56, 151-154.

WOLF, K., HAUSER, B. y WILD, P. (1984). Dicrocoeliose des Schafes; untersuchungen zur Pathogenese und zur Regeneration des Leber nach Therapie. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 97, 378-387.

WOLF-SPENGLER, M.L. e ISSEROFF, H. (1983). Fascioliasis: Bile duct collagene induced by proline from the worm. *J. Parasitol.* 69, 290-294.

YAN, N. y MEISTER, A. (1990). Amino acid sequence of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 265, 1588-1593.

YOKOYAMA, S., SATOH, M. y LOMBARDI, B. (1986). Bile ductular cells and the phenotypic heterogeneity of the population of hepatic non-parenchymal epithelial cells induced in rats by chemicals carcinogens. *Carcinogenesis* 7, 1215-1219.

YOUSEF, I.M., BARNWELL, S., GRATTON, F., TUCHWEBER, B., WEBER, A. y ROY, C.C. (1987). Liver cell membrane solubilization may control maximum secretory rate of cholic acid in the rat. *Am. J. Physiol.* 252, G84-G91.

YUET, P.K., BLANKSCHTEIN, D. y DONOVAN, J.M. (1996). Ultracentrifugation systematically overestimates vesicular cholesterol levels in bile. *Hepatology* 23, 896-903.

ZIEGLER, D.M. (1994). Detoxication: oxidation and reduction. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Ed. I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby. D. Scharchter y D.A. Shafritz. Raven Press, Nueva York, pp. 415-427.

ZHANG, Y., MARCILLAT, O., GIULIVI, C., ERNSTER, L. y DAVIES, K.J.A. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 265, 16330-16336.