

# **Fisiología y Bioquímica Animal**

## **Licenciatura en Biotecnología**

### **Trabajo Práctico**

## **Efecto de distintas sales biliares sobre el flujo biliar en la rata**

Área Fisiología

2026

## Introducción

El hígado es el principal órgano metabólico del organismo y también la víscera de mayor tamaño, con un peso en el individuo adulto de unos 1500 gramos. Ocupa una posición fisiológica fundamental ya que se encuentra interpuesto entre la corriente sanguínea que proviene del intestino y el resto del organismo.

Una de las características sobresalientes del hígado es que posee un doble riego sanguíneo. En promedio 75% de la sangre que recibe es *venosa*, proveniente del intestino delgado y saturada de productos de digestión, llegando al hígado por medio de la vena porta. El resto es sangre *arterial* que llega por la arteria hepática.

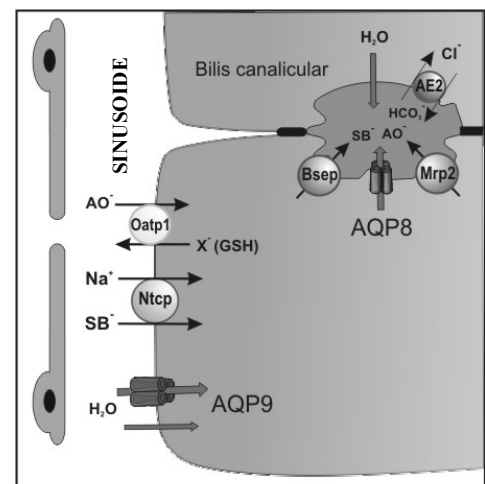
Los hepatocitos conforman el 99% de la masa hepática. Son células epiteliales altamente polarizadas cuya superficie está estructuralmente dividida en un dominio sinusoidal (*basolateral*) y un polo canalicular (*apical*). La membrana canalicular forma el polo secretor, cuyo lumen está aislado del espacio extracelular por las propiedades de barrera de las uniones estrechas. Las membranas apicales y basolaterales son estructural y funcionalmente distintas. El dominio basolateral, que alcanza el 85% de la membrana plasmática, contiene sistemas de transporte, receptores y canales que facilitan el intercambio de nutrientes y otros solutos entre los hepatocitos y la circulación sistémica. Por otro lado, el dominio apical abarca menos del 15% de la superficie celular y está altamente especializado para la formación de la bilis.

La bilis, que es la secreción exócina de los hepatocitos, es producida y secretada desde la membrana canalicular hacia finas vías intracelulares llamadas *canalículos biliares*. La bilis está compuesta por agua (85%), sales biliares (10%), mucus y pigmentos (3%) fosfolípidos (1%) sales inorgánicas (0,7%) y colesterol (0,3%). Mientras que la secreción interna de los hepatocitos (principalmente glucosa, proteínas y lipoproteínas) pasa al torrente sanguíneo desde la membrana sinusoidal. Por ello el hígado puede describirse como una glándula exócina y endócina.

## SECRECIÓN BILIAR

En el hombre, el hígado secreta aproximadamente 600-800 mL de bilis por día, proceso que cumple un rol central en un amplio rango de funciones fisiológicas. La bilis es utilizada como vehículo para la secreción de ácidos biliares que actúan en el proceso de digestión intestinal de lípidos y nutrientes liposolubles. Además, mediante la misma se eliminan elementos potencialmente tóxicos como el colesterol, la bilirrubina y una variedad de endo- y xenobióticos lipofílicos. Los hepatocitos elaboran la secreción biliar primaria o canalicular que es posteriormente modificada en volumen y composición por las células epiteliales de los conductos biliares (colangiocitos) y la vesícula biliar, para posteriormente llegar al intestino.

La secreción biliar es un proceso osmótico cuya fuerza impulsora se origina por el transporte activo de solutos (principalmente sales biliares, bicarbonato y glutatión). Dichos compuestos osmóticamente activos se transportan y concentran en el lumen canalicular hasta 100 veces con respecto a la concentración plasmática; induciendo así el influjo de agua predominantemente por vía transcelular (*Figura 1*).



**Figura 1:** La secreción biliar es un proceso osmótico generado por la excreción a nivel canalicular de sales biliares (bomba exportadora de sales biliares Bsep), glutatión (proteína multiresistente a drogas MRP2) y bicarbonato (intercambiador aniónico AE2). El flujo de agua es mayoritariamente transcelular, y la permeabilidad de la membrana podría ser parcialmente explicada por la presencia de canales de agua (aquaporinas, AQPs).

## SALES BILIARES

Los ácidos o sales biliares son ácidos esteroides, encontrados generalmente como sales sódicas en la bilis generada por los mamíferos. La principal función de las sales biliares es facilitar la formación de micelas, que promueven el procesamiento de los lípidos de la dieta.

La síntesis de sales biliares es la principal ruta implicada en el metabolismo del colesterol. En total alrededor de 20-30 gramos de sales biliares son secretadas diariamente al intestino. Aproximadamente un 90% de las sales biliares son reabsorbidas por transporte activo en el íleo y recicladas (circulación enterohepática) hacia el hígado.

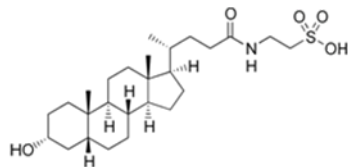
En el presente trabajo práctico utilizaremos las siguientes sales biliares:

### Taurolitocolato (TLC)

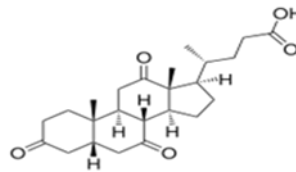
El TLC ( $C_{26}H_{45}NO_5S$ , 483.70 g/mol) es una sal biliar que induce colestasis intrahepática aguda en animales de experimentación e inhibe la excreción de compuestos que llegan a bilis por vía vesicular. Los mecanismos implicados en la génesis de la colestasis por TLC no son completamente conocidos, pero podría ser parcialmente explicada por un incremento selectivo del colesterol de la membrana canalicular (lo que disminuye su permeabilidad al agua) y además, por la internalización de Bsep (lo que disminuye la excreción de sales biliares).

### Dehidrocolato (DHC)

El DHC ( $C_{24}H_{34}O_5$ , 402.52 g/mol) es una sal biliar sintética que se produce en base a la oxidación del ácido cólico. Al igual que la sal biliar natural taurocolato (TC) actúa como agente colerético. Por lo que ambos poseen un uso medicinal. Sin embargo, a diferencia del TC, no forma micelas en bilis, lo que incrementa su eficiencia colerética.



Taurolitocolato (TLC)



Dehidrocolato (DHC)

## Objetivo

El objetivo del presente Trabajo Práctico es evaluar el *flujo biliar basal* en la rata y su modificación por la administración de distintas sales biliares.

## Materiales

### Quirúrgicos:

- Jeringas de 1 y 2 mL
- Agujas
- Guantes descartables
- Algodón y gasa
- Tablas de cirugía y lámparas de calentamiento
- Tijeras, pinzas, bisturí, hilo, catéteres PE-40 y PE-10
- Tubos eppendorf para recolección de bilis

*Reactivos:*

- Ketamina-Xylazina y Éter.
- Solución fisiológica, SF (NaCl 0.9%)
- TLC (en SF BSA 10%)
- DHC (en SF)

*Generales:*

- Balanzas
- Cronómetros
- Termómetros

**Protocolo Experimental**

1. Se pesa y anestesia el animal (Ketamina 100mg/kg p.c. - Xylazina 3,5 mg/kg p.c.) y se coloca en la tabla de operaciones manteniendo su temperatura corporal con lámpara de calentamiento (37-37.5 °C, monitoreando con termómetro la temperatura rectal).

2. Con una pinza de diente de ratón, se levanta la piel de la región inguinal y con una tijera hacer un corte en ojal que permita ver totalmente el paquete vasculo-nervioso formado por el nervio ciático, la arteria femoral y la vena femoral. Aislar la vena y con ayuda de una pinza de algodón pasar dos hilos por debajo de la vena. Luego se pasa la sonda acanalada por debajo de la misma, se efectúa una punción con una aguja calibre 21 G (cono verde) y se introduce un catéter de polietileno PE-40, unido a una jeringa con solución fisiológica. Mantener el catéter lleno con solución fisiológica, para que la sangre no lo obture.

3. Se abre la pared abdominal, se localiza el colédoco en el mesenterio duodenal y se lo aísla del tejido conectivo circundante colocando una sonda acanalada por debajo del mismo. Se liga el colédoco en su parte inferior. Por encima de la ligadura y utilizando la sonda acanalada como superficie de apoyo, se efectúa una punción con aguja calibre 22G (cono gris) y se introduce un catéter de polietileno PE-10 con el extremo biselado a través del orificio. Luego se fija el catéter por intermedio de dos ligaduras con hilo que engloban el catéter y la pared del colédoco.

Se recolecta bilis en un tubo eppendorf durante 5 minutos a fin de permitir la estabilización del flujo (este tubo se descarta). Luego se recolecta la bilis que fluye por el catéter en unos tubos pre-pesados en períodos de 5 min durante 20 min.



4. Se inyecta la sal biliar correspondiente (**TLC**: 3  $\mu\text{mol}/100\text{ g pc}$ ; **DHC**: 10  $\mu\text{mol}/100\text{ g pc}$ ) en la vena femoral a través del catéter PE-50 colocado previamente. Se recolecta bilis en tubos eppendorf, previamente pesados, cambiando los mismos cada 5 minutos durante 20 a 30 minutos.

***Determinación del flujo biliar (FB)***

Se realiza por gravimetría: Se pesan los tubos con bilis para determinar el volumen de la misma, asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/mL. Representar gráficamente el flujo biliar ( $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g p.c.}$ ) en función del tiempo.

**Bibliografía:**

- Beuers U, Denk GU, Soroka CJ, Wimmer R, Rust C, Paumgartner G, Boyer JL. "Tauroolithocholic acid exerts cholestatic effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets". *J Biol Chem.* 278:17810-8, 2003
- Marinelli RA, Gradilone SA, Carreras FI, Calamita G, Lehmann GL. "Liver aquaporins: significance in canalicular and ductal bile formation". *Ann Hepatology* 3(4):130-136, 2004.
- Marinelli RA, Roma MG, Pellegrino JM, Rodríguez Garay EA. "Tauroolithocholate-induced inhibition of biliary lipid and protein excretion in the rat". *Biochimica et Biophysica Acta* 1125: 44-48, 1992
- Marinelli RA, Carnovale CE, Rodríguez Garay EA. "Biliary excretion of proteins in the rat during dehydrocholate choleresis" *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 1286-1291, 1989.