

# Efectos de la oxitetraciclina sobre el hígado de rata

L. Pastor, L. del Olmo, C. Lorenzo, A. Almaraz, A. Belmonte, M.C. Coca y A. Caro-Patón

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. España.

## RESUMEN

**OBJETIVOS:** Este proyecto experimental ha sido diseñado para evaluar: *a*) la capacidad de la oxitetraciclina para inducir esteatosis en el hígado de rata cuando es administrada durante un período prolongado; *b*) evaluar si las ratas hembras son más susceptibles a este fármaco, y *c*) estudiar las posibles alteraciones ultraestructurales y su relación con los mecanismos de la esteatosis.

**MÉTODOS:** Sesenta y dos ratas Wistar (31 machos y 31 hembras) fueron distribuidas en 6 grupos, dos grupos control y cuatro grupos experimentales. El estudio duró 3 meses. Se obtuvo sangre y tejido hepático bajo anestesia para el estudio morfológico (microscopía óptica [MO] y microscopía electrónica [ME]).

**RESULTADOS:** La esteatosis fue de tipo microvesicular con una distribución periportal. Apareció en los grupos tratados, con un grado significativamente mayor en las hembras ( $p = 0,004$ ). No se observó ninguna relación con la dosis. El estudio ultraestructural reveló una dilatación de los microsomas en todos los grupos experimentales, sin diferencias en cuanto al sexo. No se constató una proliferación de los peroxisomas ni la aparición alteraciones mitocondriales.

**CONCLUSIONES:** La oxitetraciclina produce predominantemente esteatosis hepática microvesicular, apareciendo fundamentalmente en hembras. Como posible mecanismo de esta esteatosis inducida por oxitetraciclina postulamos un descenso en las funciones mitocondrial, microsomal y peroxisomal como resultado de una inhibición en la síntesis proteica de estos compartimientos celulares.

## EFFECTS OF OXYTETRACYCLINE ON RAT LIVER

**OBJECTIVES:** This experimental project was designed to evaluate: *a*) the capacity of oxytetracycline to induce microvesicle steatosis in rat liver when administered over long time periods; *b*) whether female rats are more susceptible to this substance, and *c*) the possible ultrastructural alterations and their relation to the mechanisms of steatosis.

Correspondencia: Dra. L. del Olmo Martínez.  
Federico Landrove, 14, 3.º. 47014 Valladolid.  
Correo electrónico: delolmo@uva.es

Recibido el 5-3-2002; aceptado para su publicación el 11-6-2002.

**METHODS:** Sixty-two Wistar rats (31 males and 31 females) were distributed into six groups, two control groups and four experimental groups. The experiment lasted three months. Blood and hepatic tissue samples were extracted under anesthesia for morphologic study (optical and electron microscopy).

**RESULTS:** Steatosis was of the microvesicular type with mainly periportal distribution. Steatosis developed in the treated groups and the degree was significantly greater in the females ( $p = 0.004$ ). No relationship was found with dose. Ultrastructural study revealed microsome dilation in all experimental groups, with no differences according to sex. Despite the steatosis, no proliferation of peroxisomes or mitochondrial alterations were observed.

**CONCLUSIONS:** Oxytetracycline produced predominantly periportal microvesicular hepatic steatosis, appearing mostly in the females. As a possible mechanism for tetracycline-induced steatosis, we postulate a decrease in mitochondrial, peroxisome and microsome function as a result of protein synthesis inhibition in these cell compartments.

## INTRODUCCIÓN

Las tetraciclinas (TC) producen esteatosis microvesicular hepática tanto en animales como en humanos. Esta lesión hepática es diferente de la esteatosis producida por el alcoholismo, la obesidad o la diabetes, pareciéndose al hígado graso que aparece durante el embarazo y al síndrome de Reye. La lesión hepática debida a la TC es característicamente dependiente de la dosis ( $> 1,5-2$  g/día). La administración intravenosa, el embarazo y la enfermedad renal parecen aumentar la susceptibilidad<sup>1-9</sup>.

La esteatosis microvesicular debida a muchos derivados de las TC es la consecuencia de dos efectos: disminución del *egress* de triglicéridos desde el hígado y a la inhibición de la betaoxidación mitocondrial de los ácidos grasos<sup>1,2,10-17</sup>.

Diversas observaciones clínicas sugieren que las hembras son más vulnerables que los machos a la hepatotoxicidad; sin embargo, en algunos estudios experimentales no se ha podido clarificar el papel del sexo<sup>1,10</sup>. Además, se han usado grandes dosis de TC administradas durante un cor-

Fig. 1. Esteatosis de predominio periportal (HE  $\times 400$ ).

Fig. 2. Ultraestructura hepática. Esteatosis microvesicular ( $\times 11.025$ ).

to período y, por otra parte, apenas existen descripciones ultraestructurales del hígado es estos trabajos.

En el presente estudio investigamos los efectos de la oxitetraciclina (OTC) sobre la histología del hígado de rata durante la administración a largo plazo de dosis equivalentes a aquellas utilizadas en humanos. También evaluamos si existen diferencias entre sexos y la relación entre los hallazgos ultraestructurales y los mecanismos sugeridos de hepatotoxicidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Utilizamos ratas Wistar, machos y hembras de 250-500 g de peso, con dieta estándar y libre acceso al agua, con períodos de 12 h de luz y oscuridad. Las ratas fueron divididas en 6 grupos:

- Grupo I: machos (n = 9), 0,6 ml/día i.m. de suero fisiológico (machos control).
- Grupo II: machos (n = 10), 15 mg/kg/día i.m. de OTC.
- Grupo III: machos (n = 12), 30 mg/kg /día i.m. de OTC.
- Grupo IV: hembras (n = 10), 0,6 ml/día i.m. de suero fisiológico (hembras control).
- Grupo V: hembras (n = 10), 15 mg/kg/día i.m. de OTC.
- Grupo VI: hembras (n = 11), 30 mg/kg /día i.m. de OTC.

Usamos OTC (Terramicina, Pfizer, Madrid, España), ya que es la única TC existente que puede ser usada por vía intramuscular. De esta forma todos los animales recibían la dosis especificada en el estudio. Se determinó semanalmente el peso de los animales y la dosis de OTC fue ajustada. Tras 12 semanas de tratamiento se llevaron a cabo los experimen-

tos. Después de 24 h de ayuno, los animales fueron anestesiados con thiopental sódico, 70-80 mg/kg intraperitoneal. Se realizaron una toracotomía y una laparotomía media extrayendo sangre por punción intracardiaca para determinar las concentraciones de urea, glucosa, colesterol total, triglicéridos, GOT, GPT, bilirrubina total y bilirrubina conjugada, fosfatasa alcalina y amilasa. Estos parámetros fueron obtenidos con un autoanalizador Hitachi 717.

También se extrajo una porción de hígado para la evaluación de la histología hepática mediante tinción con hematoxilina/eosina. Las secciones fueron visualizadas por dos observadores sin conocer el grupo al que pertenecían las muestras. La esteatosis fue graduada en una escala de 0 a 3 (0, ausencia o mínima esteatosis periportal; 1, esteatosis periportal; 2, esteatosis periportal y en la zona 2; 3, esteatosis panlobular), considerando valores de 2 o más como patológicos.

Un fragmento hepático fijado con glutaraldehído y paraformaldehído de cinco animales de cada grupo fue usado para análisis ultraestructural. Fueron estimados los siguientes parámetros cuantitativos: a) número de gotas de grasa y tamaño, según el diámetro medio de la gota mayor presente en la microfotografía; b) tamaño mitocondrial, en función del diámetro menor de la gota más grande encontrada en la microfotografía (consideramos mitocondrias gigantes o megamitocondrias aquellas cuyo diámetro menor era superior a 1  $\mu\text{m}$ ), y c) número de peroxisomas encontrados en la microfotografía. El estudio cualitativo tuvo en consideración la morfología de las mitocondrias (mitocondrias pleomórficas, inclusiones intramitocondriales y alteración de las crestas) y el aspecto de los canalículos biliares, el aparato de Golgi, el ergastoplasma y el compartimiento microsomal.

Las variables cuantitativas fueron analizadas usando el estadístico D de Kolmogorov-Smirnov. Utilizamos la t de Student para la comparación de las medias de los grupos y el test exacto de Fisher (bilateral) en la comparación de proporciones. Un valor de  $p < 0,05$  fue seleccionado como el nivel de significación. Los cálculos estadísticos fueron realizados con el programa SSPS 6.0.

## RESULTADOS

No hubo mortalidad durante el experimento. Los parámetros de laboratorio estuvieron dentro del rango normal en todos los grupos excepto la GOT, que estuvo elevada en todos los grupos, incluso en el control.

La esteatosis observada en las muestras hepáticas fue siempre microvesicular y de distribución predominantemente periportal (fig. 1), extendiéndose a la región centrilobulillar o centrizonal. Aisladamente, se observaron células espumosas.

Se observó una mayor proporción de casos de esteatosis en los grupos tratados con respecto a los controles (tanto machos como hembras), aunque sin significación estadística. Cuando comparamos globalmente los grupos tratados de animales machos (grupo II y III) con su grupo control, no se encontraron diferencias. Sin embargo, cuando hicimos lo mismo con los grupos de hembras (grupo V y grupo VI) con respecto a su control, la diferencia en la proporción de casos (el 91% en los tratados frente al 40% en los controles) estuvo próxima a la significación estadística ( $p = 0,063$ ). No encontramos diferencias entre los grupos tratados con dosis más altas (30 mg/kg/día) y aquellos con dosis de 15 mg/kg/día de OTC, tanto en machos como en hembras. Cuando comparamos globalmente las hembras de animales tratados (grupos V y VI) con los machos tratados (grupos II y III) la diferencia en la proporción de casos de esteatosis encontrada resultó estadísticamente significativa (un 91% de hembras frente al 30% de machos;  $p = 0,004$ ).

No se observaron diferencias en el número de gotas de grasa en las microfotografías estudiadas. Sin embargo, las gotas fueron más grandes en las hembras tratadas con 30 mg/kg/día (grupo VI) (fig. 2).

Observamos algunas mitocondrias pleomórficas y megamitocondrias, pero no hubo diferencias entre los grupos. Como tampoco las hubo en el tamaño ni en la apariencia de esta organela. En el análisis de las microfotografías se observaron inclusiones intramitocondriales en algunas ratas del grupo tratado pero no en los controles. Estas inclusiones tenían una densidad semejante al citosol y unas membranas similares al retículo endoplásmico liso. El canalículo biliar presentaba una estructura normal excepto en dos ratas macho del grupo III, que presentaron escasez de microvellosidades y material membranoso en su interior.

El aparato de Golgi se encontraba dilatado con más frecuencia en las hembras (incluyendo el grupo control) que en los machos.

El estudio ultraestructural del compartimiento microsomal detectó un grado mayor de hipertrofia en los grupos tratados que en los grupos control (fig. 3). Sin embargo, no hubo diferencias entre los microsomas de los distintos grupos tratados.

La morfología del retículo endoplásmico rugoso y el número de peroxisomas no reveló diferencias entre los grupos.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos observado que los animales tratados presentaban una esteatosis hepática microvesicular evidente, tanto en la microscopia óptica como en la electrónica. Este hallazgo es congruente con las descripciones existentes en la bibliografía<sup>2,4,10</sup>.

Aunque muchos de los casos publicados de esteatosis hepática relacionada con la TC se refieren a mujeres<sup>6,8,18,19</sup>, los estudios experimentales no han corroborado una mayor susceptibilidad del sexo femenino<sup>1,11</sup>. Sin embargo, hemos identificado más casos de esteatosis entre las hembras, siendo la diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon de forma global los grupos de hembras tratados con los machos tratados. Este hecho indica la importancia que las hormonas sexuales femeninas pueden tener como factor predisponente para la aparición de esteatosis hepática, combinado con otros factores, como la administración de OTC. También corrobora ese aspecto la mayor incidencia de hígado graso microvesicular durante el embarazo<sup>20-25</sup>, situación en la que existen mayores concentraciones de dichas hormonas.

En la práctica clínica y en los experimentos humanos, la toxicidad de las TC parece estar relacionada con la dosis usada y en la forma en que ésta es administrada<sup>6,9,18,19,26</sup>. Sin embargo, en estudios experimentales realizados con animales no se ha encontrado una clara relación entre la dosis y el grado de esteatosis<sup>11</sup>.

Nuestros resultados también parecen indicar esta ausencia de correlación en las ratas entre dosis y efecto. De hecho, la dosis más baja utilizada, que corresponde a la extrapolación de la dosis terapéutica recomendada para humanos<sup>27</sup>, produjo esteatosis en un mayor número de animales, tanto machos como hembras, que la dosis más alta.

Fig. 3. Ultraestructura hepática. Hipertrofia del compartimiento microsomal ( $\times 22.050$ ).

En general, las dosis de TC usadas en los trabajos experimentales revisados<sup>5,7,11-13,15</sup> son superiores a las usadas en el presente estudio. Además, la mayoría de los estudios publicados fue efectuada en ratas macho. Breen et al<sup>11</sup> estudiaron ratas machos, hembras y hembras embarazadas tratadas con una dosis muy elevada de TC durante un breve período, sin encontrar diferencias entre estos tres grupos. Incluso cuando estos autores valoran la liberación de lipoproteínas a través del hígado concluyen que las ratas hembras y gestantes son más resistentes al efecto de las TC que los machos. Quizás, en nuestro caso, el empleo de dosis menores y durante un tiempo prolongado ha puesto de manifiesto las diferencias existentes entre los sexos en cuanto al desarrollo de esteatosis. Así, la duración de la administración de OTC ha sido más prolongada que en otros estudios revisados, tanto clínicos como experimentales<sup>5-8,11-15,18,19,26</sup>. Precisamente, este trabajo fue estructurado así para tratar de establecer un paralelismo con situaciones clínicas de tratamientos a largo plazo con estos antibióticos.

Con respecto a la distribución de la esteatosis en el lóbulo hepático, encontramos un claro predominio de la misma en la región periportal, llegando en algunos casos a extenderse hasta la zona centrolobulillar. Esto contrasta con las descripciones de muchos autores, tanto en la clínica humana como en la experimentación con ani-

males<sup>1,4-6,8,10,18,19,26</sup>, en las cuales el predominio de la grasa es centrolobulillar o panlobulillar. Una excepción es el estudio realizado en mujeres embarazadas, donde se observa una distribución periportal. Igual que los autores de este trabajo, nosotros desconocemos la causa de esta discrepancia en la distribución de la esteatosis en estos dos estudios.

A pesar de haber observado la presencia de esteatosis, esta lesión hepática no se asoció con un aumento de GPT, en contraste con lo referido por la mayoría de los autores, quienes observan un ligero o moderado incremento de las transaminasas<sup>1,2,4,7,10,19</sup>.

Dado que uno de los mecanismos atribuidos en la aparición de esteatosis hepática secundaria a TC es la disfunción de la betaoxidación mitocondrial<sup>28</sup>, en nuestro estudio tratamos de detectar alteraciones morfológicas en las mitocondrias, pero no encontramos diferencias entre los grupos, como ya habían observado Wruble et al<sup>19</sup> en humanos. Tal ausencia de alteraciones contrasta con las descripciones de cambios mitocondriales en la esteatosis microvesicular producidas por otras causas, como el síndrome de Reye, la esteatosis gravídica y la producida por el ácido valproico, donde se han descrito la existencia de tumefacción mitocondrial<sup>29</sup>, variaciones en la forma y tamaño<sup>30</sup>, mitocondrias pleomórficas con inclusiones paracrystalinas<sup>25</sup>, desaparición de crestas<sup>31</sup> y granulación de la matriz<sup>32</sup>.

Tampoco detectamos diferencias entre los grupos con respecto al número de peroxisomas. Por tanto, no podemos atribuir a estas organelas ningún papel en la inducción de esteatosis. Cabe especular sobre la posibilidad de que el efecto inhibitorio de la OTC sobre la síntesis proteica haya impedido la aparición de mecanismos de compensación en la betaoxidación peroxisomal.

Hemos observado en todos los grupos de animales tratados de ambos sexos una tendencia a la dilatación de las vesículas del retículo endoplásmico liso (microsomas). Quizás podría deberse a un efecto de la OTC a través de su acción inhibitoria de la síntesis proteica con la consiguiente disminución de la síntesis de enzimas microsomales y la hipofunción de este compartimiento. En un estudio<sup>33</sup> se ha detectado un descenso en la actividad de las enzimas microsomales (citocromo P-450), así como del aclaramiento de la antipirina en ratas tratadas con clortetraciclina. Sherlock<sup>34</sup>, en una revisión sobre las alteraciones ultraestructurales provocadas por fármacos hepatotóxicos, refiere una hipertrofia del retículo endoplásmico liso junto con otras alteraciones, como hinchazón mitocondrial y degranulación del retículo endoplásmico rugoso, atribuida también a interferencia en la síntesis proteica. En este sentido, otros autores hablan de «hipertrofia hipoactiva» del retículo endoplásmico liso refiriéndose a este aspecto<sup>35</sup>.

Por otra parte, la fracción microsomal está involucrada en la síntesis de lípidos y lipoproteínas<sup>35-37</sup>. En relación con esto último desconocemos la conexión entre los citados procesos microsomales y la esteatogénesis por TC, aunque en una revisión de Jezequel y Orlandi<sup>38</sup> se sugiere la existencia de dicha relación.

En resumen, la administración de OTC provoca la aparición de esteatosis microvesicular periportal y una mayor afectación de las hembras. Todo ello parece depender del tiempo prolongado de administración del fármaco. No se han detectado alteraciones morfológicas mitocondriales ni proliferación peroxisomal. Por el contrario, la dilatación del compartimiento microsomal apareció en todos los grupos tratados. Algunos de estos hallazgos podrían ser interpretados como el resultado de la inhibición de la síntesis proteica inducida por la OTC, que podría estar relacionada con la aparición de la esteatosis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Zimmerman HJ. Agents employed in the treatment of infectious and parasitic diseases. En: Zimmerman HJ, editor. Hepatotoxicity. New York: Appleton-Century-Crofts, 1978; p. 468-509.
- Zimmerman HJ. Hepatotoxicity. Dis Month 1993;39:675-787.
- Larrey D. Hépatites médicamenteuses: aspects épidémiologiques, cliniques, diagnostiques et physiopathologiques in 1995. Rev Med Intern 1995;16:752-58.
- Stricker BH, Spoelstra P. Antimicrobial agents. En: Stricker BH, Spoelstra P, editors. Drug-induced hepatic injury. Amsterdam: Elsevier, 1985; p. 137-93.
- Lepper MH, Zimmerman HJ, Carroll G. Effect of large doses of aureomycin, terramycin, and chloramphenicol on livers of mice and dogs. Arch Intern Med 1951;88:284-95.
- Whalley PJ, Adams RH, Combes B. Tetracycline toxicity in pregnancy. Liver and pancreatic dysfunction. JAMA 1964;189:357-62.
- Kunelis CT, Peters JL, Edmondson HA. Fatty liver of pregnancy and its relationship to tetracycline therapy. Am J Med 1965;38:359-77.
- Lloyd-Still JD, Grand RJ, Vawter GF. Tetracycline hepatotoxicity in the differential diagnosis of postoperative jaundice. J Pediatr 1974;84:366-70.
- Allen ES, Brown WE. Hepatic toxicity of tetracycline in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1966;95:12-8.
- Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. Pharmac Ther 1995; 67:101-54.
- Breen KJ, Schenker S, Heimberg M. Fatty liver induced by tetracycline in the rat. Dose-response relationships and effect of sex. Gastroenterology 1975;69:714-23.
- Fréneaux E, Labbe G, Letteron P. Inhibition of the mitochondrial oxidation of fatty acids by tetracycline in mice and in man: possible role in microvesicular steatosis induced by this antibiotic. Hepatology 1988;8:1056-62.
- Labbe G, Fromenty B, Fréneaux E. Effects of various tetracycline derivatives on in vitro and in vivo  $\beta$ -oxidation of fatty acids, egress of triglycerides from the liver, accumulation of hepatic triglycerides, an mortality in mice. Biochem Pharmacol 1991;41:638-41.
- Bogert C, Kroon AM. Tissue distribution and effects on mitochondrial protein synthesis of tetracyclines after prolonged continuous intravenous administration to rats. Biochem Pharmacol 1981;30:1706-09.
- Bogert C, Holtrop M, Melis TE, Roefsema PR, Kroon AM. Different effects of oxytetracycline and doxycycline on mitochondrial protein synthesis in rat liver after long-term treatment. Biochem Pharmacol 1987;36:1555-9.
- Deboyser D, Goethals F, Krack G, Roberfroid M. Investigation into the mechanism of tetracycline-induced steatosis: study in isolated hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol 1989;97:473-9.
- Du Buy HG, Showacre JL. Selective localization of tetracycline in mitochondria of living cells. Science 1961;133:196-7.
- Lepper MH, Wolfe CK, Zimmerman HJ, Caldwell ER Jr, Spies HW, Dowling HF. Effect of large doses of aureomycin on human liver. Arch Intern Med 1951;88:271-83.
- Wruble LD, Ladman AJ, Britt LG, Cummins AJ. Hepatotoxicity produced by tetracycline overdosage. JAMA 1965;192:92-4.

20. Van Dyke RW. The liver in pregnancy. En: Zakim D, Boyer TD, editors. *Hepatology: a textbook of liver disease*. Philadelphia: WB Saunders 1996; p. 1734-50.
21. Barton JR, Riely CA, Adamec TA, Shanklin DR, Khoury AD, Sibai BM. Hepatic histopathologic condition does not correlate with laboratory abnormalities in HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count). *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1538-43.
22. Riely CA. Hepatic disease in pregnancy. *Am J Med* 1994;96: S18-22.
23. Miguil M, Sadraoui A, Moutaouakkil S, Idali B, Ghazli M, Benaguida M. La stéatose hépatique aigüe gravidique peut guérir malgré la poursuite de la grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1994;23:308-10.
24. Usta IM, Barton JB, Amon EA, González A, Sibai BM. Acute fatty liver of pregnancy: an experience in the diagnosis and management of fourteen cases. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171: 1342-7.
25. Reyes H, Sandoval L, Wainstein A. Acute fatty liver of pregnancy: a clinical study of 12 episodes in 11 patients. *Gut* 1994; 35:101-6.
26. Sborov VM, Sutherland DA. Fatty liver following aureomycin and terramycin therapy in chronic hepatic disease. *Gastroenterology* 1951;18:598-605.
27. Sande MA, Mandell GL. Agentes antimicrobianos: tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y agentes antibacterianos varios. En: Goodman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editores. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México DC: Panamericana, 1991; p. 1083-120.
28. Amacher DE, Martin BA. Tetracycline-induced steatosis in primary canine hepatocyte cultures. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 40:256-63.
29. Jiménez-Rodriguezvila M, Caro-Patón A, Dueñas-Laita A. Histological, ultrastructural and mitochondrial oxidative phosphorylation studies in liver of rats chronically treated with oral valproic acid. *J Hepatol* 1985;1:453-65.
30. MacLean MA, Cameron AD, Cumming GP, Murphy K, Mills P, Hilan KJ. Recurrence of acute fatty liver of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101:453-4.
31. Peters J, Wiener GJ, Gilliam J, Noord G, Geisinger KR, Roach ES. Reye's syndrome in adults. *Arch Intern Med* 1986;146: 2401-3.
32. Poss WB, Vernon DD, Dean JM. A reemergence of Reye's syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994;148:879-82.
33. Peters MA, Fouts JR. The inhibitory effect of aureomycin (chlortetracycline) pretreatment on some rat liver microsomal enzyme activities. *Biochem Pharmacol* 1969;18:1511-7.
34. Sherlock S. Clinical techniques for the evolution of therapeutic agents on the liver. En: Orlandi F, Jezequel AM, editors. *Liver and drugs*. London: Academic Press, 1972; p. 193-205.
35. Philhps MJ, Latham PS, Poucel S. Electron microscopy of human liver diseases. En: Schiff L, Schiff ER, editors. *Diseases of the liver*. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1987; p. 47-62.
36. Millward-Sadler GH, Jezequel AM. Normal histology and ultrastructure. En: Wright R, Alberti KG, Karrall NS, Millward-Sadler GH, editors. *Liver and biliary disease*. London: WB Saunders, 1979; p. 13-23.
37. Berkaloff A, Bourguet J, Favard P, Lacroix JC. Retículo endoplásmico. En: Berkaloff A, Bourguet J, Favard P, Lacroix JC, editores. *Biología y fisiología celular*. Barcelona: Omega, 1981; p. 229-43.
38. Jezequel AM, Orlandi F. Fine morphology of the human liver as a tool in clinical pharmacology. En: Orlandi F, Jezequel AM, editors. *Liver and drugs*. London: Academic Press, 1972; p. 145-65.