

00562 N:5
2Ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MEBENDAZOL
EN LA INDUCCION DE CIRROSIS HEPATICA
EXPERIMENTAL POR CCl₄.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADOACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
BIOQUIMICA

P R E S E N T A :

ARACELI PAEZ ARENAS



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MEBENDAZOL EN
LA INDUCCION DE CIRROSIS HEPATICA
EXPERIMENTAL POR CCl_4 .

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA) PRESENTA

ARACELI PAEZ ARENAS

MEXICO, D. F.

1994

A MIS PADRES:

FUASTO PAEZ Y ERNESTINA ARENAS
CON ADMIRACION Y RESPETO.
QUE GRACIAS A SU CARIÑO Y APOYO
FORJARON LA BASE DE TODOS MIS
LOGROS.

A MIS HERMANOS:

FAUSTO Y ELIZABETH
A QUIENES QUIERO
Y RESPETO.

A FELIPE:

MI COMPAÑERO Y ESPOSO
POR SU APOYO Y COMPRENSION
Y CON QUIEN COMPARTO
TODOS LOS MOMENTOS.

Mi agradecimiento al Dr. Lino Díaz de León
H., por la dirección en la realización de este
trabajo.

 Así mismo, agradezco a Hortensia Soto Trejo
y Ernesto Guerrero Padilla por toda su ayuda,
comprensión y sugerencias al trabajo. Gracias
por su apoyo y la amistad que me han brindado.

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMICAS, U.N.A.M. BAJO LA DIRECCION
DEL DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ Y CON
APOYO FINANCIERO DEL PROGRAMA
UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN SALUD
(PUIS).

CONTENIDO

I.- RESUMEN.....	2
II.- INTRODUCCION.....	5
2.1.- ETANOL.....	5
2.2.- TETRACLORURO DE CARBONO (CCl ₄).....	19
2.3.- CIRROSIS HEPATICA.....	21
2.4.- FIBROSIS.....	26
2.5.- COLAGENA.....	31
2.5.1.- BIOQUIMICA.....	34
2.6.- COLAGENASA.....	37
2.7.- MICROTUBULOS.....	41
2.8.- TERAPIAS EMPLEADAS PARA LA FIBROSIS HEPATICA.....	44
2.8.1.- COLCHICINA.....	44
2.8.2.- GLUCOCORTICOIDES, INHIBIDORES DE PROLIFERACION 4 HIDROXILASA Y LISIL HIDROXILASA	45
2.8.3.- ANALOGOS DE PROLINA.....	47
2.8.4.- PROSTAGLANDINAS Y ACIDO RETINOICO.....	48
2.8.5.- MALOTILATO, D-PENICILAMINA E INTERFERON GAMA.....	48
2.8.6.- S-ADENOSIL METIONINA.....	50
2.9.- MEBENDAZOL (CBZ).....	52
2.9.1.- CARACTERISTICAS.....	52
2.9.2.- MECANISMO DE ACCION.....	53
2.9.3.- FARMACOCINETICA.....	57
III.- ANTECEDENTES.....	60
IV.- HIPOTESIS Y OBJETIVO DEL TRABAJO.....	63
V.- MATERIAL Y METODOS.....	65
5.1.- INDUCCION DE CIRROSIS.....	65
5.2.- FORMACION DE GRUPOS EXPERIMENTALES.....	65
5.3.- OBTENCION DEL HIGADO.....	66
5.4.- ANALISIS BIOQUIMICO.....	67
5.5.- SEMIPURIFICACION DE COLAGENA.....	68
5.6.- ACTIVIDAD COLAGENOLITICA.....	69
5.7.- ANALISIS MORFOLOGICO.....	70
VI.- RESULTADOS.....	71
VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	87
VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

A.R.	Artritis reumatoide.
ADH	Alcohol deshidrogenasa.
ADN	Acido desoxi-ribonucleico.
ALDH	Aldehído deshidrogenasa.
ARNm	Acido ribonucleico mensajero.
ATP	Trifosfato de adenosina
C-terminal	Carboxilo terminal.
CBZ	Carbamato de benzimidazol
	Mebendazol.
CCL ₄	Tetracloruro de carbono.
CO ₂	Bioxido de carbono.
EDTA	Acido etilen diamino
	tetracético.
FACIT	Colágenas asociadas a fibrillas
	con triples hélices
	interrumpidas.
GTP	Trifosfato de guanosina.
gt	Gramos de tejido
gth	Gramos de tejido humedo.
Hom	Tejido homogenizado.
IL-1	Interleucina 1.
INF γ	Interferon gama.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
MEOS	Sistema de oxidación microsomal
	del etanol.
mgClg/gt	Miligramos de colágena por
	gramos de tejido.
NAD ⁺	Nicotinamida adenin
	dinucléotido.
NADP	Nicotinamida adenin
	dinucléotido fosfato.
N-terminal	Amino terminal.
OH-Pro	Hidroxiprolina.
R.E.	Reticulo endoplasmático.
R.E.R.	Reticulo endoplasmático rugoso.
SAMe	S-adenosil metionina.
TGF- β	Facto de crecimiento
	transformante beta.
T.H.	Tejido humedo.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
T.S.	Tejido seco
VLDL	Lipoproteínas de muy baja
	densidad.

I.- RESUMEN

La cirrosis hepática representa actualmente un gran problema de salud a nivel mundial, sus causas son muy diversas y van desde padecimientos congénitos, defectos metabólicos, enfermedades infecciosas hasta la ingesta crónica de alcohol, siendo esta última la que presenta una mayor incidencia a nivel mundial.

En México se calcula que existen aproximadamente 18, 000 casos (basados en estadísticas de 1992) nuevos por año, representa una de las 10 primeras causas de muerte en individuos de entre 35 y 54 años de edad y en las necropsias practicadas independientemente de la causa de la muerte se observa hasta un 77.7% de cirrosis hepática.

Esta enfermedad es un padecimiento crónico, de instalación insidiosa, el cuál habitualmente no presenta manifestaciones clínicas claras hasta después de mucho tiempo, por lo que el diagnóstico se realiza cuando el paciente ha progresado a un estadio que es irreversible. En efecto, se ha demostrado que una vez producida la cirrosis en grado considerable la evolución natural de la misma es seguir progresando hasta conducir a la muerte, independientemente de que se descontinúe la agresión que representa la ingesta de alcohol, habitualmente por sangrado esofágico y/o insuficiencia hepática.

Fisiopatológicamente la cirrosis hepática se caracteriza por un incremento en la síntesis, secreción y depósito de matriz extracelular en el hígado, produciendo una fibrosis cuyo componente principal es la colágena. Además, se presenta un desarreglo en la arquitectura normal del hígado produciéndose los llamados nódulos de regeneración y alterando profundamente el metabolismo de los hepatocitos.

En la actualidad no existe un tratamiento que solucione de fondo esta enfermedad y por lo tanto la terapéutica empleada está encaminada más bien a disminuir los síntomas que se presentan, tanto hemodinámicos como funcionales. Experimentalmente se ha empleado una gran variedad de sustancias capaces de alterar el curso del depósito de las fibras de colágena en el hígado en un intento por modificar el curso natural de la enfermedad. Desafortunadamente, las drogas con mayor efectividad son también las que presentan mas problemas colaterales por lo que su aplicación se ha visto limitada.

En el laboratorio se ha evaluado desde hace tiempo el uso del Mebendazol, un medicamento que ha sido utilizado como antihelmíntico de amplio espectro y que presenta una gran afinidad por tubulina, proteína que es el principal componente de los microtúbulos, estructuras que participan en una gran proporción en la secreción de proteínas de matriz extracelular, y básicamente de colágena. Este fármaco presenta varias características farmacocinéticas y farmacodinámicas distintas a las de otros que

han sido estudiados, su absorción intestinal es mínima, y se dirige al hígado representando por ello una ventaja dado que la porción que es absorbida va directamente al órgano lesionado, en este caso el hígado, por lo que no presenta depósito en los tejidos, es de eliminación rápida y ha sido ampliamente usado en parasitosis a grandes dosis y por periodos muy prolongados.

Datos iniciales nos han demostrado que este compuesto es efectivo en el tratamiento de la cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono en las ratas (el modelo más parecido en mamíferos inferiores descartando a los primates, histológica y funcionalmente a la ingesta crónica de alcohol).

Para tratar de aclarar la disminución en la concentración de colágena en el modelo anteriormente descrito se plantearon una serie de experimentos, pues consideramos que el efecto antimicrotubular no explica totalmente la mejoría clínica e histológica observada. Por otra parte, resulta interesante la administración del fármaco simultáneamente con el agresor.

En el presente trabajo se evaluó la acción del mebendazol sobre la concentración de colágena, la proporción de tres de los diferentes tipos genéticos de la misma (I, III y IV) que son los principalmente afectados en el desarrollo del padecimiento, la solubilidad de la matriz extracelular y el efecto sobre la enzima encargada de degradar específicamente a la colágena, la colagenasa, tanto en su forma de proenzima como la presente de manera activa en homogenados de hígado de ratas sometidas simultáneamente al agresor (tetracloruro de carbono) y al fármaco (mebendazol).

Los animales se dividieron en tres grupos: a) controles no se les administro algún tratamiento, b) animales a los que se les indujo cirrosis con tetracloruro de carbono simultáneamente a la administración de mebendazol, y c) aquellos a los que solo se les desarrollo cirrosis hepática. Se hicieron mediciones a las 0, 5, 10, 15 y 20 inyecciones de CCl_4 , los resultados obtenidos muestran que existe una mayor concentración de colágena determinada por cuantificación de hidroxiprolina. En los animales del grupo c conforme se inducía la cirrosis, las determinaciones se realizaron partiendo de tres muestras tratadas de forma distinta (homogenado, tejido seco y tejido húmedo) no observándose diferencias significativas con respecto a la forma de manejar el tejido inicial. Los resultados a nivel histológico muestran claras diferencias entre los grupos experimentales observándose una mayor lesión y depósito de fibras de colágena en los animales agredidos que en aquellos tratados de forma simultánea, las diferencias son mayores conforme se avanza en la inducción y la distribución de las fibras es también diferente en ambos grupos.

Debido a estas diferencias histológicas se realizó la evaluación de la solubilidad de la colágena, dado que las diferencias morfológicas parecen ser más aparentes que las encontradas bioquímicamente; debido al método de evaluación podríamos estar

mediendo fragmentos de colágena que en realidad no se encontraban estructurados. Los resultados nos muestran que efectivamente el grupo tratado solo con CCl₄ presenta una mayor proporción de colágena insoluble.

El análisis de la proporción de los diferentes tipos genéticos de colágena presentes en el hígado se realizó mediante densitometrías de la fracción soluble de la matriz extracelular purificada y observamos un incremento inicial, en la proporción de la colágena tipo III extraída con incubaciones cortas en el grupo de tratamiento simultáneo y una menor proporción de colágena tipo I, estos efectos tienden a igualarse en el transcurso del tratamiento. La mayor diferencia observada es con respecto a la colágena de tipo IV, un componente importante de las membranas basales. Aunque representa una pequeña cantidad de la colágena total podría estar significando un esfuerzo del organismo por reconstituir la arquitectura normal del hígado en lugar de llenar espacios con colágenas I y III.

Los resultados de la actividad colagenolítica no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos salvo a las 5 inyecciones en el grupo simultáneo y a la 10 inyecciones en el grupo CCl₄, en las dos últimas determinaciones los resultados fueron similares, por lo que quizás no representen mayor ventaja en las cirrosis plenamente establecidas.

Con los resultados anteriores consideramos que el uso del mebendazol, probablemente asociado a otros fármacos que presentan diferentes mecanismos de acción podría ser una alternativa terapéutica viable en el tratamiento de la cirrosis hepática.

II. INTRODUCCION.

2.1 ETANOL

Las enfermedades causadas por la ingesta de bebidas alcohólicas representan un problema de salud pública a nivel mundial. Desde los primeros estudios epidemiológicos de Jolliffe y Jellinek en 1941 y más recientemente con Popham en 1975 ⁽¹⁾ se ha encontrado una relación directa entre el consumo de alcohol per cápita y la mortalidad por cirrosis hepática de origen alcohólico. Una investigación retrospectiva realizada por Pequignaut y col., ⁽²⁾ en biopsias hepáticas de pacientes que ingerían alcohol en cantidades variables también mostró una relación lineal entre la ingesta de alcohol individualizada y el riesgo de desarrollar cirrosis. Sin embargo, un reporte de Hislop y col., en 1983 no coincide con estos resultados debido a que solo del 10 al 20% de las personas que abusan en el consumo de alcohol desarrollan cirrosis. Con respecto al sexo, Pares y col. en 1986 observaron que la abstinencia en la ingesta de alcohol después de un periodo de alcoholismo crónico puede progresar a cirrosis en una alta proporción en mujeres (4 de cada 7) pero no necesariamente en hombres (0 de cada 7); además, el desarrollo de la enfermedad en ellas tarda en presentarse la mitad del tiempo de lo que se llevaría en el hombre. ⁽³⁾

Uno de los estudios a más largo plazo es el realizado por Marbet en 1987. ⁽⁴⁾ (basado en los datos de Sorensen en 1984), el tiempo de duración del seguimiento fue de 3 a 12 años, los pacientes

consumieron alcohol en un promedio de 50 gr., diarios por más de un año, el número de pacientes fue de 241 y los criterios utilizados para decidir si el paciente había desarrollado cirrosis incluyeron información clínica, bioquímica e histopatológica. Solo el 23% de los pacientes que sobrevivieron al estudio desarrollaron cirrosis en un periodo de 8.1 años, para los pacientes que no concluyeron el estudio el promedio en el desarrollo de la enfermedad fue de 4.3 años. El 68% presentaron hepatitis alcohólica severa y de éstos el 27% desarrolló cirrosis.

En México la cirrosis hepática por alcohol está dentro de las 10 primeras causas de muerte en personas mayores de 15 años. Estadísticas realizadas por la S.S.A. en 1986 mostraron que el 77.7% de los fallecimientos presentaron cirrosis hepática. En la población total es la primera causa de defunciones en personas con edades entre los 35 y 54 años. Para 1992 fueron 18 000 los casos presentados, igualmente relacionados a la cirrosis asociada al consumo de alcohol. También mencionan que en el país hay 200 alcohólicos por cada cirrótico; esto significa que existen aproximadamente 3 millones y medio de personas dependientes del alcohol en la actualidad. Las elevadas tasas de mortalidad por cirrosis hepática se presentan en la ciudad de México y en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Estado de México. Estadísticamente, el padecimiento se relaciona al consumo de pulque y deficiencias nutricionales.⁽⁵⁾

El patrón de consumo de alcohol es variable entre las diferentes poblaciones; sin embargo, se encontró una prevalencia de cirrosis dos veces mayor en España e Italia que en Canadá y Estados Unidos. La mortalidad por este padecimiento y el consumo per cápita mostró una correlación significativa de 0.86 ($p < 0.01$).⁽⁶⁾

Existen muchos factores que contribuyen al consumo del alcohol como el estrés y los problemas socio-económicos, los cuales conllevan a beber y presentar niveles de alcohol en la sangre superiores a 0.16%. La intoxicación alcohólica puede llegar a producir el 50% de los accidentes no fatales, así como ser causa directa de muerte en estas personas.^(7,8)

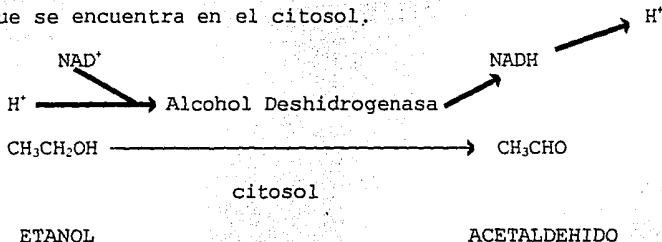
El abuso en la ingesta de alcohol afecta a varios órganos. El más susceptible es el hígado debido a que es el responsable de la oxidación del etanol. Los metabolitos que se generan durante esta reacción son los más potentes agentes tóxicos; las bebidas alcohólicas también contienen otros compuestos que contribuyen a la toxicidad.

Los mecanismos por los cuales el alcohol causa daño hepático son controversiales y aún no existe alguna explicación completa a los problemas básicos relacionados al desarrollo y progresión de la cirrosis hepática.

El etanol se difunde fácilmente a través de las membranas; esto es favorecido por el tamaño pequeño de la molécula, su débil carga eléctrica, así como su polaridad. La absorción difiere de acuerdo

al tipo de bebida alcohólica ingerida y puede realizarse en el estómago y/o intestino. La velocidad con que se metaboliza en el organismo varía de acuerdo a la cantidad y tipo de alimentos que se consuman, ya que los carbohidratos son más inhibidores de la absorción del etanol que las proteínas. Por estudios farmacocinéticos se sabe que 1 hora después de la ingestión de alcohol aproximadamente el 90% es absorbido, de éste solo del 2 al 10% comienza a eliminarse por la piel, pulmón y riñón y el 75% es metabolizado en el hígado.⁽⁹⁾ Una vez en este órgano, específicamente en los hepatocitos, existen 3 sistemas capaces de oxidar el etanol enzimáticamente a acetaldehído. Este metabolito es de 10 a 30 veces más tóxico que el etanol mismo; posteriormente es convertido a acetato, el cual será liberado a la circulación y rápidamente metabolizado por tejido extrahepático a bióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O).⁽¹⁰⁾

Dichos sistemas son: A). Sistema de Alcohol Deshidrogenasa (ADH) que se encuentra en el citosol.



Esta vía normalmente metaboliza compuestos como alcoholes primarios, secundarios y aromáticos, así como esteroides los cuales

son deshidrogenados. Además, oxida a los ácidos grasos; el etanol es principalmente oxidado por esta ruta. Como se observa la reacción requiere de la enzima alcohol deshidrogenasa que a su vez utiliza nicotinamida adenín dinucleótido (NAD) y así se produce acetaldehído que posteriormente por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) producirá CO_2 y H_2O .⁽¹¹⁾

Dos factores modulan el metabolismo del alcohol indirectamente aumentando la producción de acetaldehído: 1) las isoenzimas determinadas genéticamente tanto de ADH como ALDH con actividades catalíticas diferentes y 2) modificaciones de la actividad enzimática inducida por el alcohol mismo ó por daño en el hígado.

En el humano existen hasta la fecha 20 diferentes isoenzimas de alcohol deshidrogenasa codificadas por al menos 5 genes diferentes. Los pesos moleculares de estas isoenzimas son similares pero la secuencia de aminoácidos no, y, por lo tanto, en la estructura primaria no hay similitud. Para su clasificación se han dividido en tres diferentes tipos basados en las diferencias en la cinética para metabolizar el etanol, la movilidad electroforética y la inhibición de su actividad por pirazole.⁽¹²⁾

Tabla 1

DIFERENTES ENZIMAS ADH GENETICAMENTE IDENTIFICADAS

GENE	ALELOS	SUBUNIDADES	CLASE
ADH 1	ADH 1	ALFA α	I
ADH 2	ADH 1-2	BETA 1 β_1	I
	ADH 2-2	BETA 2 β_2	I
	ADH 3-2	BETA 3 β_3	I
ADH 3	ADH 1-3	GAMA 1 γ_1	I
	ADH 2-3	GAMA 2 γ_2	I
ADH 4	ADH 4	PI π	II
ADH 5	ADH 5	X ξ	III

Todas la isoenzimas se parecen pues todas forman dímeros y los monómeros tienen un peso molecular aproximado de 40 Kd. La subunidad B_2 se encuentra ampliamente distribuida en aproximadamente el 85% de las poblaciones de japoneses y chinos, la forma B_3 se encuentra en el 25% de la raza negra de Norte América. La subunidad que presenta una mayor actividad para la oxidación del etanol es la ADH B_1 (ver tabla 1).^(13,14)

La frecuencia de varios fenotipos de ADH₃ en bebedores moderados es similar en diferentes poblaciones y parecería ser un factor de menor riesgo para el desarrollo de cirrosis.

El polimorfismo genético de las diferentes ADH podría explicar los diferentes grados de susceptibilidad de ciertos individuos, así como la eliminación más rápida o más lenta del alcohol en igual dosis ingerida. ^(15,16)

Como ya se mencionó anteriormente, el requerimiento de NAD^+ por esta vía genera un exceso de NADH en el citosol. Consecuentemente, la alteración del estado "redox" y el acetaldehído producido son responsables en gran parte de la toxicidad hepática causada por el etanol. Se ha propuesto que los componentes determinantes en la velocidad de oxidación son: ⁽¹⁷⁾

1.- La cantidad y actividad de las diferentes isoenzimas de ADH presentes en el hígado.

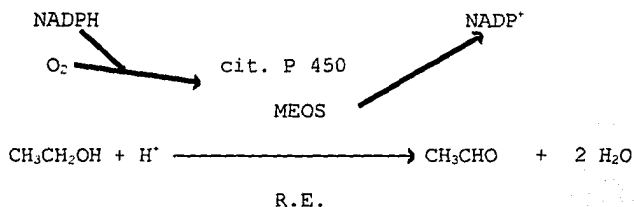
2.- La capacidad del hígado para regenerar NAD^+ del NADH producido de la reacción.

3.- La capacidad del hígado para oxidar el acetaldehído.

Aun no se conoce cual es el paso limitante de esta vía de oxidación. La tolerancia a grandes cantidades de etanol de alcohólicos crónicos es debida en parte a la adaptación del sistema nervioso y se ha asociado con un incremento a la velocidad de aclaramiento de etanol en la sangre. Existen controversias en relación a si la ADH es más activa o que si después de la ingesta su actividad disminuye, pero estas diferencias ocurren aún en ausencia de daño hepático. La explicación más aceptada es que la

variedad de ADH posiblemente juega papeles diferentes en el metabolismo del etanol que todavía se desconocen.^(15,17)

B). Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) se encuentra en el retículo endoplásmico (R.E.).



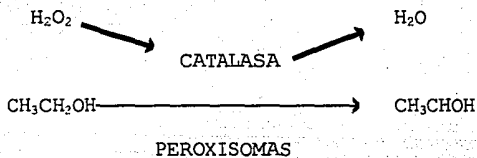
Este sistema es capaz de metabolizar el etanol en presencia de oxígeno y nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH) resultando acetaldehído, NADP⁺ y agua, en condiciones normales se ha demostrado que este sistema contribuye con la oxidación del 10% del etanol, mientras que en ingestas crónicas existen^(9,17) controversias en la cantidad que se metaboliza ya que un estudio en ratas que fueron expuestas a la administración prolongada de etanol se encontró una proliferación del R.E., sugiriendo esta ruta como responsable de la oxidación del etanol. Este sistema se ha podido separar del sistema de ADH y catalasa usando cromatografía de intercambio iónico (DEAE celulosa).⁽¹⁸⁾

Lieber propone que esta vía es la más importante en la oxidación del etanol en altas concentraciones en el organismo. También Nomura y col.,^(19,20) realizaron experimentos con babunes a los cuales se

les administró etanol y se encontró un incremento en la actividad del sistema MEOS. Los efectos adversos de la proliferación microsomal son:

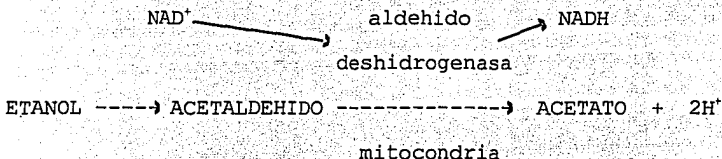
- 1.- Aumento en la oxidación del etanol y por lo tanto producción de acetaldehído.
- 2.- Promueve la peroxidación de lípidos a través de un incremento en la formación de radicales libres.
- 3.- Aumento del requerimiento de oxígeno, por lo que puede presentarse anoxia y zonas de hipoxia en el hígado.
- 4.- Afecta el metabolismo de drogas ya que puede favorecer o disminuir el metabolismo y/o potenciar la toxicidad de éstas.

C). Sistema de la catalasa que se encuentra en los peroxisomas.



Este sistema en presencia de agua oxigenada (H_2O_2) convierte el etanol en acetaldehído y agua; contribuye al metabolismo de alcohol en ingestas agudas o crónicas. Además, existen algunos datos en donde se demuestra que puede incrementar su actividad si existe una gran ingesta de etanol. Esta vía actúa para eliminar los iones superóxido y peróxido de hidrógeno que se forman durante el metabolismo normal.

Una vez que el etanol ha sido oxidado por cualquiera de estas vías el 90% del acetaldehído formado es oxidado a acetato, primeramente en las mitocondrias del hígado por la acción de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) en presencia de NAD^+ y H_2O . La reacción es irreversible generando NADH .^(17,18,19)



También han reportado que la ALDH existe en dos clases diferentes una citosólica y otra mitocondrial, que muestran diferencias en la cinética de oxidación de aldehídos alifáticos de cadena corta y su localización subcelular. En la fracción citosólica se encuentran las isoenzimas ALDH_1 , ALDH_3 y ALDH_4 , en la fracción mitocondrial la ALDH_2 , esta última probablemente sea la responsable de la mayor oxidación del acetaldehído in vivo, ya que se realizó un estudio en ratas utilizando inhibidores de la forma mitocondrial y se obtuvo que con una inhibición del 25 % o menor la concentración de acetaldehído se incrementó considerablemente.^(12,15)

Se observó que las isoenzimas ALDH_1 y ALDH_2 son producto de 2 genes separados, las cuales presentan un 69% de homología en sus regiones codificadoras. Existe también polimorfismo en los genes de ALDH_1 en las poblaciones de japoneses, chinos e indios

sudamericanos. Aproximadamente entre el 25 al 50% de ellos no tienen la actividad de ALDH₂.⁽²¹⁾

El acetato producido también tiene efecto sobre el metabolismo hepático, afecta la lipogénesis, cetogénesis y glucogénesis. Los iones de hidrógeno liberados de la oxidación del etanol son utilizados en lugar de los generados por el ciclo del ácido cítrico, que provienen de la oxidación de los ácidos grasos y por lo tanto existe una acumulación de estos en el hígado. Los mecanismos por los que se origina hígado graso son:^(17,19)

- 1.- Disminución de la oxidación de lípidos en el hígado.
- 2.- Aumento de la lipogénesis.
- 3.- Disminución de la liberación de lipoproteínas del hígado.
- 4.- Aumento de la movilización de grasa periférica.
- 5.- Incremento de la toma de lípidos de la circulación.

El hígado tiene un papel importante en el proceso de coagulación sanguínea y fibrinolisis, pues todos los factores de coagulación, así como los factores regulatorios son sintetizados en este órgano. Un estudio mostró que pacientes con cirrosis estable presentan coagulación intravascular diseminada y niveles elevados de antígenos relacionados a fibrina y fibrinógeno en suero. Esto puede tener efectos inmunosupresores y anticoagulantes, complicando los desordenes asociados a esta enfermedad.⁽²²⁾

El hígado es el sitio en el que se eliminan los quilomicrones presentes en el plasma. Estas partículas contienen abundantes

ésteres de colesterol, provenientes de la dieta y al igual que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ejercen un efecto inhibitorio en la actividad de algunas enzimas como la 3 hidroxí-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGCóA reductasa), enzima hepática que participa en la biosíntesis del colesterol. En la membrana del hepatocito existe un receptor para lipoproteínas. Este reconoce a la apoproteína B presente en los restos de los quilomicrones; al activarse el receptor la partícula es captada y degradada por la célula hepática. Por lo tanto el hígado es el principal tejido para la eliminación de lipoproteínas. Se ha calculado que aproximadamente el 50% de éstas son captadas por esta vía, siendo un proceso importante en la regulación de la concentración de colesterol en el plasma. Cuando la síntesis de las apolipoproteínas requeridas para la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) es inferior a la disponibilidad de los ácidos grasos se ocasiona la acumulación de éstos.⁽²³⁾ La oxidación del etanol proporciona la energía para mantener las funciones celulares, pero también favorece la síntesis de ácidos grasos, debido a un aumento en la disponibilidad de NADH y un incremento en la actividad de la enzima fosfatidato fosfohidrolasa hepática. La actividad de esta enzima cambia de manera importante que la actividad de cualquier otra enzima en la vía de síntesis de los triglicéridos.

En pacientes con hepatitis alcohólica las partículas de lipoproteínas de muy baja densidad contienen estructuras similares

en tamaño y forma, pero análisis de apoproteínas específicas mostraron marcadas alteraciones en la composición y concentración de éstas en las lipoproteínas tanto de baja como de alta densidad, atribuibles a defectos en el metabolismo de las lipoproteínas.^(24,25,26)

La causa de estos cambios es multifactorial, e involucra diferencias tanto en la biosíntesis como en las enzimas y en el catabolismo de las lipoproteínas.

El etanol altera la fluidez de la membrana neural, lo cual puede cambiar la permeabilidad para iones, la actividad enzimática, así como la transmisión sináptica, lo que explicaría los efectos como hipotermia, sedación y cambios en la actividad locomotora.⁽²⁷⁾ Drogas y agentes químicos pueden tener influencia sobre las proteínas de membrana o indirectamente poseer algún efecto sobre los lípidos y fluidificarla.⁽²⁸⁾

En el hígado, el incremento en el consumo de oxígeno puede producir hipoxia, predominantemente en la región lobular pericentral en donde la tensión de oxígeno es menor. Altas concentraciones de etanol producen vasoconstricción hepática causando un aumento de la presión portal. Consecuentemente, la oxigenación en los sinusoides decrece y hay una reducción de la actividad de citocromos mitocondriales, por lo que el daño hepático observado es consecuencia, al menos en parte, de alteraciones

microcirculatorias y una mayor demanda de oxígeno ocasionada por la vasoconstricción.⁽²⁹⁾

Se ha observado que los efectos oxidativos del etanol se incrementan conforme se disminuye la concentración de glutatión mitocondrial, llegando a ser letal para los hepatocitos.⁽³⁰⁾ El glutatión es un tripéptido que se encuentra en todas las células, contiene un grupo tiol y glutamil hidrato.

La enzima glutatión peroxidasa utiliza al glutatión como sustrato. Esta enzima se encuentra compartimentalizada en el citosol y mitocondrias, se sintetiza en estas últimas y un sistema de transporte dependiente de ATP la conduce al citosol.

La función del glutatión es destruir a los radicales libres del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos que se forman durante la oxidación de lípidos y otros compuestos como el etanol. También funciona como coenzima de ciertas reacciones enzimáticas y está involucrado en el transporte de aminoácidos.⁽³¹⁾

La polaridad celular y la diferenciación de las funciones pueden estar influenciadas por moléculas de adhesión sobre la superficie celular, proteínas transmembranales (como elementos del citoesqueleto) o constituyentes específicos de matriz extracelular que genera la adhesión célula-célula ó célula-matriz. Por lo que, la barrera que forma la membrana plasmática en regiones discretas es vital para el funcionamiento del hepatocito y la polaridad de las células epiteliales. In situ, el hepatocito contiene tres

dominios en la membrana plasmática: dominio apical, es el que forma el borde de los canaliculos biliares; dominio lateral, el cual forma los bordes adyacentes al hepatocito y el dominio de la cara que está en contacto con los sinusoides.⁽³²⁾

El etanol tiene efectos inhibitorios tanto en el desarrollo de la polaridad de los hepatocitos como en la comunicación célula-célula. El por qué el etanol no tiene el mismo efecto en varios tipos celulares no está claro. Sin embargo, la exposición crónica de los hepatocitos al etanol produce el desarrollo de estructuras semejantes a canaliculos y una disminución en la comunicación intercelular.⁽³³⁾

El entendimiento de la patogénesis de la enfermedad es una razón para la búsqueda de terapias efectivas ya que la pérdida de la función hepática es el factor limitante en la sobrevivencia de los pacientes con cirrosis.

2.2 TETRACLORURO DE CARBONO (CCl₄)

El mecanismo de formación de radicales libres durante la intoxicación aguda ó crónica de etanol no está totalmente definido. Sin embargo, se sabe que las células de Kupffer pueden activarse y producir iones superóxido. La producción de radicales por las células fagocitarias es una de los mecanismos involucrados en la actividad microbicida de estas células. El etanol puede modificar

estos efectos y/o producir iones superóxido en el lapso de 3 horas, contribuyendo a la inmunosupresión en pacientes alcohólicos.⁽³⁴⁾

En animales de experimentación la fibrosis hepática se puede producir por: trauma, suturas, introducción local de sustancias irritantes, alteraciones nutricionales como dietas bajas en colina, metionina y proteínas, administración de agentes tóxicos como tetracloruro de carbono, ligadura del conducto biliar ó daño inmunológico. El método más utilizado para la inducción de cirrosis hepática es el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl₄). Se ha demostrado que éste es un hepatotóxico fuerte y metabólicamente es reducido por el citocromo P-450 a radicales triclorometilo como un intermediario reactivo.⁽³⁵⁾ Además el daño que se produce es muy semejante al que se observa en el humano como consecuencia de la ingesta crónica de alcohol.

El tetracloruro de carbono es el modelo más estudiado de biotransformación para la iniciación de radicales libres. Estos radicales son químicamente muy reactivos y pueden ser formados por radiaciones electromagnéticas o por reacciones de oxidoreducción en las cuales pueden estar involucradas enzimas o metales.

El CCl₄ es un hepatotóxico y nefrotóxico plenamente comprobado ya que se ha visto que causa necrosis centrolobulillar, generación de hígado graso, iniciación de la peroxidación de lípidos, inhibición de la síntesis de proteínas y se une covalentemente a metabolitos de lípidos. Se sospecha que también es carcinogénico.

Existe otro reporte que menciona que el daño producido por el CCl_4 altera el sistema regulatorio de Ca^{++} reflejando un aumento en la concentración de calcio citosólico en los hepatocitos de la rata, el cual es precedido por liberación de la enzima glutamina-pirúvico-transaminasa en el medio. Las alteraciones en la homeostasis celular de calcio puede ser un evento importante para inducir el daño por este compuesto.

Se ha sugerido que la peroxidación de lípidos puede ser una consecuencia del daño celular. Inicialmente radicales tales como $O^{\cdot-}$ y H_2O_2 pueden ser metabolizados por varias enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, inhibiendo la producción de radicales libres más activos. Una vez que la peroxidación de lípidos se ha iniciado, los antioxidantes endógenos interfieren con la propagación de la cadena ya que éstos son más fácilmente oxidados que los ácidos grasos poli-insaturados.⁽³⁶⁾ El daño de la membrana lisosomal con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas es un paso consecutivo a la peroxidación de lípidos, esto produce pérdida de la actividad de algunas enzimas como son: glucosa 6 fosfatasa, NADPH-citocromo c reductasa, citocromo P-450 y UDP glucuronil-transferasa.⁽³⁷⁾

2.3 CIRROSIS HEPATICA

La cirrosis fue definida en 1976 por la Asociación Internacional para el Estudio del Hígado como: "La reconstrucción alterada del

Clinicamente, la cirrosis comienza con la pérdida del apetito y debilidad generalizada. Los signos de impotencia funcional tardan en desarrollarse, por lo que la enfermedad no puede ser detectada originalmente. El daño inicial producido por el alcohol, como la esteatosis, puede ser reversible y generalmente es asintomático. La esteatosis está caracterizada por la acumulación de triglicéridos en forma de pequeñas gotas en los hepatocitos y algunas veces puede llevar a la ruptura de la membrana celular. En algunos casos, en esta etapa no se determina huella de algún daño; sin embargo, si se continúa ingiriendo alcohol la progresión de la enfermedad puede conducir a dos caminos: A) el desarrollo de hepatitis alcohólica en cuyo caso el hígado de 30% de los pacientes que se abstienen de bebidas alcohólicas podrá regenerarse y por ende sobrevivirán, mientras que el 70% restante progresará a cirrosis y B) el desarrollo a cirrosis hepática, estado en el cual aún si deja de ingerir alcohol conllevará a la muerte. La mortalidad en la cirrosis está asociada a: la presencia de hepatitis, hepatocitos gigantes y una marcada acumulación de colágena en los espacios de Disse, así como la capilarización de los sinusoides.⁽³⁸⁾

Los primeros estudios histopatológicos de la cirrosis hepática describieron células mesenquimatosas e inflamatorias como características de esta enfermedad. Actualmente se conoce más este padecimiento el cual es sumamente complejo. La respuesta normal del hígado al daño celular es la regeneración; en este caso, el

parénquima y los elementos del estroma son reemplazados en proporciones normales, conservando así su arquitectura y manteniendo la relación entre ellos. Esta respuesta celular normalmente involucra la producción y secreción de mediadores solubles o citocinas, sin embargo, la producción aberrante de éstos puede llevar a una alteración irreversible de la arquitectura tisular pues estimulan acumulación de tejido cicatricial en el parénquima. La obstrucción de las raicillas intrahepáticas de la vena porta, causadas por la cicatriz fibrosa o por la expansión de nódulos de regeneración, provocan hipertensión portal siendo ésta una de las complicaciones más serias. Se presenta en un 90% de los casos de cirrosis hepática y también puede generarse por una obstrucción neoplásica de la vena porta, por trombosis y/o insuficiencia cardíaca prolongada. Este aumento de presión entre los sinusoides hepáticos incrementa las anastomosis entre la vena porta y la arteria hepática y también hay formación de vías venosas colaterales entre las que se destacan las del plexo esofaríngeo, estas vías se sobrecargan y forman várices pudiendo éstas llegar a romperse y producir una hemorragia masiva que suele causar la muerte.

La hipertensión sinusoidal origina un incremento de la trasudación aunado a la formación de linfa dentro de la cavidad abdominal la cual se va incrementando, pudiendo llegarse a acumular varios litros de este líquido intraperitoneal, lo que constituye la

denominada ascitis. El líquido ascítico contiene proteínas (principalmente albúmina), glucosa, sodio y potasio en concentraciones prácticamente iguales a las de la sangre.

En la hepatitis alcohólica la lesión histológica básica es el edema celular. Esta lesión se presenta particularmente en la zona 3 del lóbulo (la más alejada de la vena central) y es más pronunciada en la vena hepática, zona en que la concentración de oxígeno es menor. Existen estudios que demuestran que la hipoxia interviene de manera fundamental en la producción de necrosis hepática inducida por alcohol.⁽⁴⁰⁾ La presencia de esta muerte celular puede estar asociada con fibrosis, esteatosis y/o colestasis. El alcohólico crónico casi siempre empieza por presentar hígado graso, pudiendo derivar éste en necrosis y una fibrosis posterior.^(12,39)

Los cambios morfológicos macroscópicos de la cirrosis se inician primeramente con un crecimiento del órgano, siendo éste de aspecto liso, de color amarillo y evidentemente graso. Los hepatocitos pueden estar hinchados y presentar cuerpos de Mallory en el citoplasma. Gradualmente disminuye el volumen del hígado hasta volverse nodular de color rojizo debido a la congestión y con presencia de cicatrización difusa. Inicialmente las cicatrices son de aproximadamente 1mm de diámetro. Posteriormente se incrementan desde 0.5 hasta 1.0cm de diámetro, éstas están constituidas preponderantemente por colágena.⁽⁴¹⁾

La regeneración comienza alrededor de las zonas portales y acaba extendiéndose hasta conectar triadas portales vecinas, hay necrosis unicelular que origina un infiltrado local de neutrófilos. Cuando estos cambios comprometen a todo el lóbulo, así como a su armazón reticular subyacente, no puede haber regeneración; sin embargo, las células hepáticas adyacentes pueden proliferar y producir nódulos de elementos celulares que carecen de una función normal en la secreción y excreción de bilis. En el estadio final el hígado tiene un color más pardo, no hay cuerpos de Mallory (inclusiones citoplásmicas), la actividad regenerativa decrece, y por lo tanto la cicatrización es más intensa, predominando el tejido conjuntivo, principalmente bandas de colágena.

2.4 FIBROSIS

La fibrosis se presenta cuando el parénquima es dañado de forma crónica. Inicialmente, el proceso de regeneración se activa; posteriormente una alteración en la regulación de éste, producirá estados patológicos. Este proceso está relacionado con el desarrollo de la respuesta inflamatoria mediada por citocinas las cuales interaccionan con diferentes células, como las de Kupffer y /o Ito. Estas últimas desempeñan un papel importante en el proceso fibrogénico. ^(10,12,42)

En la fibrosis del hígado el grosor y longitud de las fibras pueden limitar la distensibilidad de los canales vasculares a nivel

de sinusoides, en la vena porta y/o la arteria hepática, causando incremento en la resistencia del flujo sanguíneo. Una hipótesis con relación al incremento de fibras de colágena es que la fibrosis no solamente incrementa la resistencia del flujo sanguíneo sino que también produce cambios fenotípicos directos en las células adyacentes.

La fibrosis involucra remodelación de la matriz extracelular con degradación de las proteínas de esta matriz que han sido recientemente sintetizadas, esto se ha comprobado mediante estudios de marcaje metabólico. Esta degradación es mediada por proteinasas específicas siendo el grupo principal el de las metaloproteasas las cuales son activas a pH neutro y contienen un catión divalente en su sitio activo.

El término de tejido conjuntivo se emplea frecuentemente para designar a la matriz extracelular y a las células que ahí se encuentran tales como fibroblastos, macrófagos y células cebadas. La cantidad de macromoléculas que lo conforman, así como los diferentes tipos celulares es variable, dependiendo de la organización y función del tejido. En términos generales, esta matriz está constituida por una gran diversidad de proteínas y polisacáridos que son secretados localmente y ensamblados dentro de una malla en el espacio extracelular. Anteriormente se pensaba que servía principalmente para estabilizar físicamente las estructuras y era de función inerte. Actualmente se sabe que es una región

activa y compleja la cual regula la interacción de las células con su medio ambiente. También tiene influencia en las funciones de la célula como su desarrollo, migración, proliferación, orientación y metabolismo. El entendimiento de esta organización aun no está completa. (43,44)

El depósito de matriz extracelular en los espacios subendoteliales que tiene significancia patológica para el hígado se ha enfocado a las células de los sinusoides, debido a que estas células se hallan involucradas en la producción y secreción de mediadores solubles ó citocinas y una alteración en la regulación de ella conduce a una alteración irreversible de la arquitectura tisular. Actualmente se conocen varios factores solubles como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-B) el cual es el más caracterizado como factor profibrogénico. Con efectos antifibrogénicos se encuentran los glucocorticoides como la dexametasona, el interferón gama y el factor de necrosis tumoral (TNF). Este último parece estar limitado solo a células no parenquimatosas y sus acciones incluyen: supresión de la síntesis de ADN en hepatocitos y estimulación de fibrogénesis en lipocitos, así como la modulación para almacenar ácido retinóico en los mismos. (45,46)

Los hepatocitos y las células no parenquimatosas tienen marcada heterogeneidad en su morfología, potencial bioquímico proliferativo y función en las diferentes zonas en que se localizan. En la zona 1

del lobulillo hepático (fig 1) las células son pequeñas, intermedias en la zona 2 y grandes en la zona 3. Igualmente, existe variedad en la morfología de las mitocondrias, retículo endoplásmico y gránulos de glucógeno. Una explicación a estas diferencias es que existen distintas concentraciones de oxígeno, sustratos, cofactores y hormonas que producen una adaptación de los sinusoides al microambiente. Se considera que alrededor de las triadas portales existen células precursoras ó células jóvenes mientras que alrededor de las venas centrales hay células terminales diferenciadas ó células seniles.⁽⁴⁷⁾

El componente celular más ampliamente distribuido en ésta matriz son los fibroblastos y las dos principales clases de macromoléculas presentes en la misma son la colágena y los glicosaminoglucanos, los cuales están unidos covalentemente a proteínas formando proteoglucanos. También se encuentran la elastina, la fibronectina y la laminina. Esta última solamente constituyendo la membrana basal. Se ha sugerido que cambios en la estructura de los carbohidratos de los glicosaminoglucanos pueden jugar un papel importante en el crecimiento y diferenciación celular.^(48,49,50)

La laminina es una glucoproteína de 800 Kd constituida por tres subunidades peptídicas unidas por puentes disulfuro formando una cruz, que establece interacciones no covalentes con la entactina también conocida como nidogeno que es una molécula con forma de campana. En la membrana basal también se localiza la fibronectina



	ZONA 1		ZONA 2	ZONA 3
TIPO CELULAR	CELULA MADRE	CELULAS EN TRANSICION	MADURACION PARENQUIMA	HEPATOCITOS DIFERENCIADOS
TAMAÑO CELULAR	7-15um	15-20um	30-40um	30-40um
TIPO DE COLAGENA	IV,V	IV, III	III,VI	III,I,VI
PROTEINAS DE ADHESION	LAMININA	LAMININA Y FIBRONECTINA	FIBRONECTINA	FIBRONECTINA
PROTEOGLICANOS	HEPARAN SULFATO	HEPARAN SULFATO Y HEPARINA	HEPARAN Y CONDROITIN SULFATO HEPARINA	HEPARINA Y DERMATAN SULFATO

(HEPATOLOGY. 15 (6):1199. 1992)

FIGURA I. PV = VENA PORTA, HA = ARTERIA HEPATICA, CV = VENA CENTRAL y BV = DUCTO BILIAR.

que puede estar en dos formas: soluble e insoluble, en particular en el hígado. La laminina se localiza en los espacios de Disse probablemente asociada a fibronectina del plasma que se encuentra en la matriz extracelular. Existe un reporte en el que se demuestra que la laminina modula la producción de albúmina cuando se adiciona en forma soluble a hepatocitos en cultivo, pero no cuando es aplicada como sustrato insoluble adherido a placas de plástico.⁽⁵¹⁾

La matriz en el espacio de Disse cambia en cantidad y composición, conforme aumenta la longitud de las triadas portales, encontrándose un incremento de la colágena tipo IV, laminina y heparán sulfato. Cerca de la vena central la matriz está compuesta enteramente por colágena fibrilar, fibronectina y proteoglicanos producidos por células mesenquimatosas.⁽⁴⁷⁾

La tenascina es una proteína que se encuentra asociada a células de Ito y en el espacio de Disse a fibras de colágena; es una glicoproteína hexamérica de múltiples dominios. Su estructura consta de 6 brazos unidos por puentes disulfuro y es capaz de unir proteoglucanos y fibronectina. Su función exacta y el tipo de células que la producen se desconoce, pero se cree que son las células de Ito las responsables de su síntesis, debido a que éste es el principal tipo celular, encargado de proveer la matriz extracelular durante la fibrogénesis hepática.⁽⁵²⁾

2.5 COLAGENA

La colágena es la proteína más abundante de la matriz extracelular ya que constituye aproximadamente el 25% de las proteínas totales de los mamíferos. Está constituida por una familia de proteínas, cada una de ellas compuesta de subunidades polipeptídicas con ligeras variaciones en la secuencia de aminoácidos. Todas ellas forman una triple hélice que es la característica central de las moléculas colagénicas. La estructura helicoidal es debida a que cada una las tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas alfa (α) sufren un giro de 1/2 vuelta hacia la izquierda y posteriormente la molécula con el entrecruzamiento de las tres cadenas tendrá un giro en sentido contrario describiendosele como una superhélice derecha, de aproximadamente 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro. Cada cadena está constituida por cerca de 1 000 aminoácidos. Algunos de ellos proporcionan estabilidad a la molécula tal como la prolina y la hidroxiprolina mientras que otros como la glicina permiten los movimientos por su tamaño pequeño.

Existen otras proteínas que tienen algunos dominios semejantes a los de esta familia como son: Clq, acetilcolinesterasa, cong lutina, proteínas surfactantes y algunas más que participan en la estructuración de la matriz extracelular. Las dos primeras se

encuentran en una mayor proporción en el organismo, mientras que de las demás su concentración tisular es mínima.⁽⁵³⁾

Hasta el momento han sido identificados y caracterizados 13 diferentes tipos de colágena y se sabe que requieren de por lo menos 25 genes diferentes para su síntesis (cada molécula de colágena madura se halla constituida por varias cadenas por lo que se requiere mas de un gen para su formación). Los tipos I, II, III, IV y V son los más abundantes, los tres primeros son los principales componentes del tejido conjuntivo. Existe una clasificación de estas proteínas basada en la organización de las fibras, por lo que el grupo formador de fibras y fibrillas lo constituyen las colágenas tipos I, II, III, V y XI, las cuales tienen una periodicidad característica de 67 nm de longitud, y proveen soporte estructural al esqueleto, piel, vasos sanguíneos, nervios, intestino y la cápsula de algunos órganos.^(53,54)

El tipo I es el más común y constituye el 90% de toda la colágena del cuerpo humano. Puede formar fibras con un diámetro entre 100 a 500 nm dependiendo de su localización, a diferencia del tipo III en el cual el diámetro es de 60 nm. El tipo I es un heterodímero compuesto de 2 cadenas alfa 1 α (I) idénticas y 1 cadena alfa 2 α 2(I). Se han reportado pequeñas cantidades de homotrímero α 1(I). Los tipos II y III (fig.II) son homotrímeros representados como α 1(II); y α 1(III); la composición del tipo

TABLA II

TIPOS DE COLAGENA GENETICAMENTE DIFERENTES

TIPO	CADENAS CONSTITUYE	LOCUS EN EL GEN	COMPOSICION DE LA CADENA	ESTRUCTURA SUPRAMOLECULAR
I	1(I) 2(I)	COL 1A1 COL 1A2	1(I) 2(I) 1(I) 3	FIBRAS DE 67 nm
II	1(II)	COL 2A1	1(II) 3	FIBRAS DE 67 nm
III	1(III)	COL 3A1	1(III) 3	FIBRAS DE 67 nm
IV	1(IV) 2(IV) 3(IV) 4(IV) 5(IV)	COL 4A1 COL 4A2 COL 4A3 COL 4A4 COL 4A5	1(IV) 2 1(IV)	MALLA TRIDIMEN- SIONAL EN MEM- BRANA BASAL
V	1(V) 2(V) 3(V)	COL 5A1 COL 5A2 COL 5A3	1(V) 2(V) 1(V) 2(V) 3(V)	FIBRAS DE 67 nm
VI	1(VI) 2(VI) 3(VI)	COL 6A1 COL 6A2 COL 6A3	1(VI) 2(VI) 3(VI)	MALLA MICRO- FIBRILAR (100nm BANDA)
VII	1(VII)	COL 7A1	1(VII) 3	FIBRA DE ANCLAJE
VIII	1(VIII)	COL 8A1	DESCONOCIDA	
IX	1(IX) 2(IX) 3(IX)	COL 9A1 COL 9A2 COL 9A3	1(IX) 2(IX) 3(IX)	BANDAS DE FIBRAS ASOCIA- DAS LATERALMENTE
X	1(X)	COL 10A1	1(X) 3	DESCONOCIDA
XI	1(XI) 2(XI) 3(XI)	COL 11A1 COL 11A2 COL 11A3	1(XI) 2(XI) 3(XI)	FIBRAS DE 67nm
XII	1(XII)	COL 12A1	1(XII) 3	¿ASOCIADA A FIBRAS?
XIII	1(XIII)	COL 13A1	DESCONOCIDA	DESCONOCIDA

V es variable; la más común es $\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)$ pero también se han reportado $\alpha 1(V)_3$ y $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$. En el tipo XI la forma predominante es $\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$, se ha identificado a la cadena $\alpha 1(XI)$ como constituyente del tipo V lo cual ha demostrado las interacciones supramoleculares entre los diferentes tipos como, tipo I y III, tipo I y V, tipo II y XI. Existe la hipótesis de que estas interacciones regulan la formación y crecimiento de las fibras.⁽⁵⁴⁾

Se ha reportado que los tipos V y XI retienen una porción globular en la región del aminoterminal de la molécula madura, lo cual puede influir en el desarrollo de la fibrogénesis. En el caso del tipo IV se ha sugerido que el dominio carboxilo-terminal previene la formación de fibras en bandas y que la región pequeña no helicoidal le permite tener flexibilidad y asociarse con el tipo VII para formar una estructura en forma de malla en la membrana basal, la cual se ha podido observar por inmunofluorescencia en forma continua a todo lo largo de los sinusoides en el hígado.⁽⁴³⁾

Los tipos IV, VI, VII, VIII y X constituyen el grupo de colágenas que no forman fibras. Estas son muy heterogéneas tanto en su función como en su estructura y constituyen diferentes matrices extracelulares como membrana basal, membranas en los ojos, epitelios vasculares, etc.

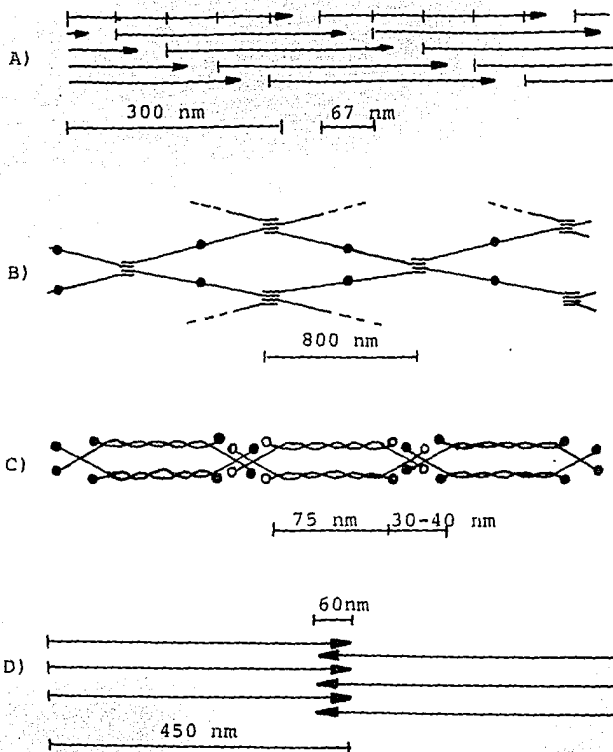


FIGURA II. Modelos de la Asociación de las Macromoléculas de los Diferentes Tipos de Colágena.

- A) Formación de fibras de colágena tipos I, II, III y V.
- B) Forma de mallas de la colágena tipo IV.
- C) Microfibrillas de colágena tipo VI.
- D) Estructuras diméricas en antiparalelo, colágena tipo VII.

Las colágenas tipos IX y XII son llamadas colágenas asociadas a fibrillas con triples hélices interrumpidas (FACIT). El tipo IX es expresado en cartilago y constituye del 1 al 10% del total de la colágena en este tejido. Contiene tres dominios cortos helicoidales llamados Col-1, Col-2 y Col-3 de 115, 339 y 137 aminoácidos respectivamente además de 2 dominios no helicoidales denominados NC-3 y NC-2. La interacción con la colágena de tipo II es estabilizada por enlaces covalentes intermoleculares.

El tipo XII se encuentra como homotrímero con un peso molecular de 220 000 dal. aproximadamente, tiene solo dos dominios helicoidales de 152 y 103 aminoácidos interrumpidos por un dominio NC-2.

El tipo XIII fue descrito mediante estudios realizados con cDNA y consta de 3 dominios helicoidales y 4 dominios no colagénicos, Aún no ha sido aislado y se localiza en piel (foliculos de pelo), epidermis, mucosa de intestino, hueso, músculo estriado y cartilago.

2.5.1 BIOQUIMICA

Una de las características bioquímicas de la colágena es la estructura de la proteína formada por tres cadenas denominadas alfa (α). Cada una de ellas tiene una alta concentración de glicina, prolina e hidroxiprolina. Siendo la glicina el aminoácido más

pequeño que existe, éste puede ocupar el interior de la triple hélice además de ocupar generalmente la tercera posición en la secuencia de los aminoácidos; tanto la hidroxiprolina como la hidroxilisina no son incorporados como tales a la cadena polipeptídica durante la síntesis sino que, los residuos de prolina y lisina son hidroxilados en el retículo endoplásmico (RE) antes de que las procadenas α formen la molécula precursora llamada procolágena (PRO). Esta última es glicosilada antes de que la proteína sea secretada por exocitosis dentro del espacio extracelular. La cantidad de carbohidratos varía entre los diferentes tipos de colágena, generalmente son oligosacaridos de cadena corta (dos residuos de azúcares) que están unidos covalentemente al hidroxilo de la hidroxilisina; no contienen ácido siálico y su función aún no es muy clara.

Como ya mencionamos, la colágena es sintetizada originalmente en forma de procolágena la cual presenta dos extensiones peptídicas de las que se conocen al menos dos funciones: guiar a la molécula dentro de la célula y prevenir la formación de las fibras de colágena intracelularmente. Estas regiones son removidas una vez que la colágena ha sido secretada al espacio extracelular. En ciertas enfermedades la proteólisis de la procolágena es incompleta por lo que la formación de las fibras es bloqueada produciendo piel frágil y articulaciones hipermóviles. Después de que las fibras se

TABLA III

SINTESIS, PROCESAMIENTO, DEPOSITO Y
ESTABILIZACION DE LA COLAGENA.

- A.- TRANSCRIPCION DE LOS GENES DE LAS DIFERENTE CADENAS DE PROCOLAGENA.
- B.- TRADUCCION DEL ARNm PARA CADA CADENA DE PROCOLAGENA.
- C.- MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE PROCOLAGENA.
- 1.- ELIMINACION DE LA SECUENCIA "SEÑAL"
REQUIERE DE LA ENZIMA PEPTIDASA Y DE LA SEÑAL NH₂ TERMINAL.
 - 2.- HIDROXILACION DE LOS RESIDUOS DE PROLINA Y LISINA EN LAS CADENAS PRO NACIENTES Y EN LAS PRO-CADENAS LIBRES EN EL LUMEN DEL R.E.R.
REQUIERE DE LAS ENZIMAS PROLIL 4-HIDROXILASA
PROLIL 3-HIDROXILASA
LISIL HIDROXILASA
COFACTORES COMO O₂, CETOGLUTARATO, ACIDO ASCORBICO Y Fe²⁺
 - 3.- GLICOSILACION DE LOS RESIDUOS DE HIDROXILISINA EN LAS CADENAS LIBRES PRO EN EL R.E.R.
REQUIERE DE LAS ENZIMAS GALACTOSIL-TRANSFERASA
GLUCOSIL-TRANSFERASA
COFACTORES COMO Mn²⁺ Y UDP-AZUCARES
 - 4.- GLICOSILACION DE RESIDUOS DE ASPARAGINA EN LA EXTENSION COOH TERMINAL.
REQUIERE DE LAS ENZIMAS GLUCOSIL-TRANSFERASA
MANOSIL-TRANSFERASA
COFACTORES COMO UPD-GLUCOSAMINA Y GDP-MANOSA
 - 5.- FORMACION DE ENLACES DISULFURO INTERCADENA EN LA PORCION CARBOXILO TERMINAL DE LOS PROPEPTIDOS.
 - 6.- FORMACION DE LA TRIPLE HELICE.
 - 7.- LAS MOLECULAS DE PROCOLAGENA SON TRANSPORTADAS EN LAS VESICULAS DEL R.E.R. A EL COMPLEJO DE GOLGI.
REQUIERE DE ENERGIA
 - 8.- SECRECION DE LA PROTEINA. LAS MOLECULAS DE PROCOLAGENA SON ACUMULADAS EN GRANULOS SECRETORES SOBRE LA SUPERFICIE DEL COMPLEJO DE GOLGI Y ESTOS SON TRANSPORTADOS A LA SUPERFICIE DE LA CELULA, DONDE LA PROCOLAGENA ES LIBERADA AL ESPACIO EXTRACELULAR.
REQUIERE DE ENERGIA Y MICROTUBULOS INTACTOS

9.- LAS MOLECULAS DE PROCOLAGENA SON CONVERTIDAS A COLAGENA EN EL ESPACIO EXTRACELULAR.

REQUIERE DE LAS ENZIMAS PROCOLAGENA-N-PEPTIDASA
PROCOLAGENA-C-PEPTIDASA
COFACTORES COMO Ca^{++} Y Zn^{++}

D.- LAS MOLECULAS DE COLAGENA SUFREN ESPONTANEAMENTE FIBRINOGENESIS. CADA MOLECULA SE ASOCIA DIAGONALMENTE DESPLAZANDOSE 1/4 DE LA LONGITUD DE LA MOLECULA.
REQUIERE DE LA CONVERSION DE LA PROCOLAGENA A COLAGENA Y DE UNA CONCENTRACION FISIOLOGICA DE SALES E IONES

E.- FORMACION DE ENLACES INTERMOLECULARES DERIVADOS DE LOS RESIDUOS DE LISINA.
REQUIERE DE LA ENZIMA LISIL-OXIDASA
COFACTORES COMO Cu^{++} Y O_2

(AM. J. Pathol. 98 (1): 234.1980)

han formado en el espacio extracelular, ciertos residuos de lisina e hidroxilisina son desaminados por la lisil oxidasa produciéndose grupos aldehídos, estos a su vez forman enlaces covalentes con otros grupos de lisina e hidroxilisina generando enlaces cruzados muy estables.

La formación de las bandas de fibras de colágena es un fenómeno multifacético que involucra interacciones específicas entre los dominios helicoidales de moléculas idénticas, por lo que los dominios no helicoidales laterales que interfieren con la agregación son removidos por propeptidasas específicas. Tanto para las terminaciones de las moléculas como para el tipo de colágena, la concentración de estas enzimas en el tejido está determinada por su biosíntesis, velocidad de secreción, vida media y por activadores e inhibidores exógenos. Estudios in vitro de la formación de fibras han demostrado que éste es un proceso complejo posterior a varios pasos de proteólisis, iniciándose con la prenucleación, etapa en la que ocurren cambios conformacionales dependientes de temperatura en los telopéptidos. Posteriormente, existe la formación de dímeros que son moléculas agregadas lateralmente que tienen un desplazamiento de 4 D (4x67.5nm) por lo que el amino terminal de una molécula se sobrepone al extremo carboxilo de otra.⁽⁵³⁾ La formación de la estructura de la fibra depende del tipo de colágena y puede ser modulado por glicosilaciones postraduccionales. La regulación de los diferentes

tipos genéticos de colágena, grosores de las fibras así como su complejidad no está muy claro. Los factores que pueden determinar el diámetro y longitud de las fibras y/o resistencia a la degradación pueden estar en función de la matriz extracelular en su conjunto. Además, hay que considerar que este fenómeno se realiza in vivo en una célula que es capaz de sintetizar simultáneamente varios tipos diferentes de colágena.⁽⁵⁵⁾

No se ha podido demostrar que la concentración elevada de prolina libre induzca la síntesis de colágena,⁽¹⁷⁾ en tanto que si se ha encontrado que se incrementa el lactato y el acetaldehído en la síntesis de esta proteína in vivo en un sistema de cultivo de miofibroblastos.⁽⁵⁶⁾

2.6 COLAGENASA

El proceso de degradación de la colágena se efectúa por medio de una enzima específica denominada colagenasa. La primera demostración de su existencia fue hecha por Gross y Lapiere en 1962, y se purificó de Clostridium histolyticum. Posteriormente se demostró que se encuentra presente en diversos tejidos tanto de anfibios como de mamíferos. En el hombre se ha localizado en concentraciones alteradas en varias patologías como artritis reumatoide y tumores invasivos.⁽⁵⁷⁾ En la actualidad se han descrito 4 clases de proteasas (endopeptidasas) que intervienen en la degradación de la matriz extracelular e interactúan durante el

proceso de desarrollo, crecimiento y cicatrización; entre este grupo de enzimas se encuentra la colagenasa. Todas las colagenas ó proteínas semejantes a colágena son susceptibles a proteólisis por la colagenasa obtenida de Clostridium, aunque con diferentes eficiencias.

El grupo I denominado Serina-Proteasas, comprende enzimas que degradan estructuras de glicoproteínas y pueden activar algunas metaloproteasas de matriz. Aquí se encuentran incluidas: los activadores de plasminógeno, plasmina, elastasa, trombina, tripsina, quimiotripsina y catepsina G y E. La plasmina puede activar a la colagenasa latente al igual que la catepsina G que además degrada a la colágena desnaturalizada.

El grupo II denominado Cisteína-Proteasas, está representado por enzimas de origen lisosómico como catepsina B y puede degradar colágena y activar a la colagenasa.

El grupo III, son las Aspártico-Proteasas e incluye a la catepsina D y a la pepsina, las cuales pueden degradar a la colágena desnaturalizada.

El grupo IV, está compuesto por las llamadas Metaloproteasas de Matriz (MMPs) las cuales a su vez se subdividen en los siguientes subgrupos:

- MMP-1 Compuesto por colagenasas intersticiales.
- MMP-2 Formado por las gelatinasas.
- MMP-3 Comprende principalmente a la estromelisin.

MMP-4 Engloba a las telopeptidasas.

MMP-5 Agrupa endopeptidasas que degradan colágena en un punto a 3/4 partes del amino-terminal.

MMP-6 Conjunta a las metaloproteinasas ácidas.

MMP-7 Caracterizado por las enzimas que digieren otros componentes de matriz extracelular.

Las características generales de las metaloproteasas del subgrupo I son: su mayor actividad se efectúa a un pH= 7.0, requieren iones como Zn^{+2} y/o Ca^{+2} para su actividad, por consiguiente son inhibidas por agentes quelantes como EDTA, no son inactivadas por inhibidores de serina, cisteína ó aspártico, degradan los componentes de matriz extracelular y son secretadas por fibroblastos en forma de proenzima ó zimógeno. Por ende, otras enzimas como la tripsina pueden activarlas y en su activación se pierden de 10 a 12 kd. de peso molecular.

Específicamente las MMP-1 son colagenasas que degradan las colágenas llamadas intersticiales (tipos I, II y III) en un solo punto de las cadenas polipeptídicas en la región de la triple hélice de la molécula. El enlace peptídico que corta es Gly--(Ileu ó Leu), y se localiza en el residuo 772-773 a 3/4 del amino terminal. Una excepción es la colágena tipo X la cual tiene dos sitios sensibles, los residuos 142-143 y el 470-471.

Las MMP-1 se han localizado en fuentes muy variables como: tejido gingival e hígado en humano, hueso en ratón, colon en conejo

y en cultivos celulares de fibroblastos, macrófagos, monocitos, neutrófilos, células tumorales, etc.

Este grupo de enzimas son sintetizadas como proenzimas de 54 092 dal, y pueden ser secretadas de dos formas, como proenzima de 52 000 dal ó en una forma glicosilada de 55 000 dal. La activación de la pro-MMP-1 puede ser llevada a cabo mediante tripsina, por incubación con agentes caotrópicos, o con compuestos organomercuriales (AMPA 4-aminofenil-mercuril acetato), por acción de activadores tisulares no enzimáticos y por procesos de autoactivación. Todos dan como resultado una enzima estable de 42 000 dal.

Entre los principales estimuladores de la síntesis de MMP-1 están los agentes químicos como: colchicina, concanavalina A, citocalasina B, cristales de hidroxapatita y tiofluoperacina, también citocinas como: interferones alfa, beta y gama, interleucina 1 y TNF, factores de crecimiento como EGF, PDGF, proteínas de choque térmico y colágenas como el tipo I, II y III.

Las enzimas del grupo MMP-2 llamadas gelatinasas son altamente específicas para degradar colágena fibrilar desnaturalizada (tipos I, II y III), también reconocen a la colágena nativa tipos IV, V, VII y IX, además tienen actividad sobre fibronectina y elastina.

2.7 MICROTUBULOS

La secreción de la colágena se lleva a cabo a través del complejo de Golgi y depende del sistema microtubular para su excreción a la matriz extracelular. Como su nombre lo indica, este sistema está compuesto por microtúbulos los cuales son complejos formados por agregados de una proteína denominada tubulina y presenta un arreglo de sus subunidades de forma helicoidal en tandem, juega un papel muy importante en actividades celulares tales como mitosis, transporte de vesículas intracelulares, organización y posición de organelos membranales. Los microtúbulos no son estructuras inertes, por el contrario tienen como característica su comportamiento dinámico en el cual hay un rápido intercambio de subunidades entre polímeros y tubulina soluble.⁽⁴³⁾

La tubulina es una proteína que une trifosfato de guanosina (GTP) en dos sitios específicos. En el sitio E se realiza la hidrólisis del enlace GTP; esta activación reduce la afinidad tubulina-tubulina. Debido a que existe un rango estable de concentración de ésta solo los microtúbulos con GTP-cap pueden unir nuevas subunidades. El segundo sitio llamado N no intercambia nucleótidos. Estudios realizados por Oosawa y Kasai (1962) y posteriormente Mitchison y Kirschener (1984)⁽⁵⁹⁾ encontraron que existe un equilibrio entre la polimerización y la velocidad de crecimiento de los microtúbulos que puede variar entre los

diferentes microtúbulos generando un crecimiento rápido (+) ó lento (-).^(60,61)

El ensamble de los microtúbulos consta de dos fases: la nucleación y la elongación. En la primera se realiza la formación de oligómeros de tubulina. Esta se estabiliza por la subsecuente elongación que consiste en la adición gradual de monómeros a la molécula. En su regulación interviene la carga neta de la masa de polímeros ya que una disminución de la concentración de microtúbulos en solución producirá un incremento en la elongación de éstos, es decir, crecen y se disuelven completamente de manera constante. La tubulina soluble es re-utilizada; este comportamiento es llamado estabilidad dinámica. Se sabe que aproximadamente del 10 al 20% de los microtúbulos son intercambiables. Estudios realizados con microtúbulos citoplasmáticos por periodos prolongados de incubación con colchicina y nocodazol demostraron que estos fármacos se unen a las moléculas de tubulina causando el bloqueo del autoensamblaje y su dinámica es lenta al compararse con microtúbulos de cilios y flagelos. Por lo tanto, no todos los microtúbulos son iguales en su estabilidad dinámica produciéndose grupos de alta estabilidad.^(60,61,62)

En hepatocitos normales los microtúbulos no son abundantes, la tubulina comprende aproximadamente el 1% de la proteína soluble en el hepatocito y solo el 40% de ésta se ensambla. El contenido de

tubulina se incrementa en células de hígado en estado de regeneración.

Desde 1977 Cleveland y col.,⁽⁶³⁾ estudiaron la estabilidad dinámica de la tubulina y encontraron que en ella intervienen otras proteínas tales como Tau, MAP 2 y MAP 1. MAP 2 y Tau disminuyen el número de catástrofes (proceso de disolución de los microtúbulos) dentro de los centrómeros. Además, Tau puede ser fosforilada y desfosforilada; este proceso es dependiente de calcio y está regulado por calmodulina y protein cinasa. La interacción de los microtúbulos y los filamentos intermedios posiblemente es mediada por las MAPs.

La interacción de los microtúbulos con otros elementos del citoesqueleto y con organelos pueden interferir con la dinámica y estabilidad de éstos. Estudios realizados por Parczyk y col.,⁽⁶⁴⁾ (1989) sugieren que los microtúbulos son necesarios para la secreción eficiente de las proteínas y que los microfilamentos no intervienen en el transporte de proteínas de membrana recientemente sintetizadas. Los autores proponen dos posibles mecanismos para explicar la exocitosis que se realiza a través de los microtúbulos, 1) los microtúbulos sirven como rieles los cuales guían a las proteínas hacia su destino y 2) los microtúbulos están involucrados en la organización estructural del complejo de Golgi; la desorganización de éste resultaría en una inhibición en el transporte de proteínas.⁽⁶⁰⁾

2.8 TERAPIAS EMPLEADAS PARA LA FIBROSIS HEPATICA

Existe una gran variedad de medicamentos que se emplean en la terapia de la fibrosis hepática, basado en las diferentes causas por las que esta se genera; por ejemplo: la hemacromatosis es tratada con agentes quelantes, la producida por hepatitis B se trata con agentes antivirales, en el caso de la hepatitis crónica activa autoinmune se utiliza una terapia inmunosupresora, etc.

Debido a que en el tejido fibrótico hepático el principal constituyente es la colágena tipo I se han utilizado terapias que puedan interferir específicamente con la biosíntesis de la proteína, pero la existencia de otras moléculas en menor proporción como laminina ó proteínas del endotelio sinusoidal pueden no hacer eficaz la estrategia empleada, ya que los puntos más importantes en la evaluación de las terapias son la efectividad y la especificidad del medicamento administrado.

2.8.1 COLCHICINA.

Entre los agentes terapéuticos más empleados se encuentra la colchicina, la cual inhibe la polimerización de los microtúbulos. Estos son requeridos por la colágena para su secreción extracelular. Se ha reportado que la colchicina puede inhibir la fibrosis, estimular la secreción de colagenasa, así como de otras proteínas,^(65,66) tener efectos antiinflamatorios y producir inhibición del polimorfismo de los leucocitos.⁽⁶⁷⁾

La principal indicación terapéutica de la colchicina es en el tratamiento agudo de gota y aunque se ha empleado en otros trastornos inflamatorios su eficacia es dudosa.⁽⁶⁸⁾ En pacientes con escleroderma la administración a dosis toleradas no produce inhibición de la síntesis ni incrementa la degradación de la colágena en este estado fibrótico.⁽⁶⁹⁾ Sin embargo, Harris y Krane encontraron que en cultivos de células sinoviales el fármaco si estimula la síntesis de novo de colagenasa.⁽⁷⁰⁾ Por lo anterior parece ser que la dosis a la que se administra es muy importante ya que no es tan efectiva a dosis bajas y un incremento desmedido puede producir serias complicaciones.

Se han tratado pacientes con este fármaco por periodos crónicos pero no se han demostrado mejorías importantes de la fibrosis en los análisis histológicos de biopsias hepáticas, ni la mortalidad a largo plazo ha disminuido sensiblemente. Los efectos secundarios producidos por el medicamento pueden ser desde diarrea, náusea, epistaxis, hemorragia esofágica debido a lo irritante del medicamento en un inicio y posteriormente úlcera epigástrica, hasta granulomatosis, anemia aplásica y miopatía.⁽⁷¹⁾

2.8.2 GLUCOCORTICOIDES E INHIBIDORES DE PROLIL 4 HIDROXILASA Y LISIL HIDROXILASA.

Otra estrategia terapéutica que se ha seguido es el empleo de glucocorticoides como la dexametasona, la cual disminuye

selectivamente la síntesis de colágena en modelos experimentales.

⁽⁷²⁾ Al parecer, el mecanismo de acción es disminuir los niveles de ARNm de la colágena tipo I, al menos en cultivo de hepatocitos y en cultivo primario de fibroblastos. También disminuye las modificaciones postraduccionales de los péptidos de procolágena y hace decrecer la actividad de las enzimas prolil hidroxilasa y lisil hidroxilasa.

En el tratamiento de la fibrosis también se ha empleado la inhibición de las enzimas que se requieren para la formación y estabilización de la triple hélice de colágena. Estas utilizan iones fierro, oxígeno molecular, 2-oxiglutarato y ascorbato para llevar acabo su función que es la hidroxilación de los residuos de prolina.⁽⁷³⁾

Se ha desarrollado otro grupo de inhibidores análogos al alfa cetoglutarato y ascorbato, como el etil-3-4-dihidroxi benzoato el cual es hidrofóbico por lo que es capaz de penetrar la membrana celular y por lo tanto disminuir la actividad de esta enzima, la estabilidad de la triple hélice, la síntesis y secreción de las colágenas tipos I y III y aparentemente no tiene efectos tóxicos en los modelos animales que se han probado hasta el momento. Este fármaco parece ser una buena opción terapéutica aunque requiere de mayores estudios.⁽⁷⁴⁾

La terapia con glucocorticoides ha sido empleada en el tratamiento de enfermedades crónicas del hígado como cirrosis

biliar primaria y hepatitis crónica autoinmune.⁽⁷⁵⁾ Desafortunadamente, la administración a tiempos prolongados ha producido efectos colaterales indeseables como osteoporosis; además de los efectos conocidos causados por este tipo de medicamento (síndrome de Cushing, etc.).

La deficiencia crónica de lisil-hidroxilasa produce hipotonía congénita, cutis laxa, piel frágil, hemorragias en cicatrices y arqueamiento del paladar.

2.8.3 ANALOGOS DE PROLINA.

El empleo de los análogos de prolina en la terapia antifibrótica con el fin de incorporarlos a la cadena polipeptídica, ha sido para alterar la estructura y función de la colágena. El principal problema es la especificidad del compuesto ya que se incorpora a todas las proteínas una vez administrado en forma sistémica.⁽⁷⁶⁾

Por otra parte, para la formación de la triple hélice es necesario remover las extensiones amino y carboxilo del propeptido, por lo que se ha intentado la utilización de agentes que bloqueen la ruptura de éstas; sin embargo, se observó que el grupo amino terminal libre es necesario pero no suficiente para inhibir la conversión de procolágena en colágena; además, no se ha reportado el empleo de esta estrategia en modelos de fibrosis.⁽⁷⁷⁾

1.8.4 PROSTAGLANDINAS Y ACIDO RETINOICO.

Las prostaglandinas tienen diversos efectos intracelulares, entre ellos se han reportado que estos compuestos incrementan los niveles de AMPc intracelular, el cual aumenta la degradación de la colágena dentro de la célula. Sin embargo, la amplia gama de actividades que pueden producirse como: incremento del flujo sanguíneo hepático, alteraciones de la fluidez de la membrana, cambios en el sistema hormonal de glucagón e insulina, así como la inhibición de la liberación de factores inflamatorios por los macrófagos ha impedido su utilización en el tratamiento de la fibrosis hepática.⁽⁷⁸⁾

La acción del ácido retinoico es variable ya que se ha observado que se puede incrementar la síntesis de colágena tipo I, pero si la matriz es de colágena tipo IV el aumento es en el tipo III y decrece el tipo I, por lo que se ha sugerido que altos niveles de retinoico pueden producir fibrosis hepática. Por estos motivos este tratamiento no es recomendable por el momento.⁽⁷⁹⁾

2.8.5 MALOTILATO, D-PENICILAMINA E INTERFERON GAMA.

Las acciones farmacológicas del malotilato incluyen un incremento de las proteínas hepáticas, alteración en la relación de ADN y ARN, en la actividad del citocromo c, y de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, inducción del citocromo b5 (sin afectar al citocromo P-450). Aun cuando altera todos estos parámetros, ha

demostrado tener efecto protector contra la inflamación y fibrogénesis, además de que suprime la síntesis de colágenas, así como su acumulación en ratas tratadas con CCl_4 .⁽⁸⁰⁾ Sin embargo, otros reportes indican que no puede prevenir la esteatosis ni disminuir la concentración de hidroxiprolina en animales de experimentación tratados con CCl_4 y etanol. Por lo tanto, posiblemente el malotilato inhiba el metabolismo del CCl_4 , impidiendo la formación de agentes tóxicos como los radicales libres.

A pesar de los datos contradictorios se ha probado el medicamento en humanos y los resultados obtenidos han mostrado que el compuesto afecta tanto la albúmina sérica como la concentración de proteínas totales en pacientes cirróticos, pero no se ha visto que sea capaz de disminuir la fibrogénesis en estos pacientes.⁽⁸¹⁾

El inteferón gama ($\text{INF } \gamma$) fue empleado en 1972 para el tratamiento de osteosarcoma, debido a su efecto anti-proliferativo sobre muchos tipos celulares incluyendo fibroblastos, como este tipo celular es el responsable de la mayor producción de colágena, se pensó en su uso como un tratamiento alternativo.

Estudios con el $\text{INF } \gamma$ demostraron que inhibía la producción de colágena independientemente de su efecto antiproliferativo en cultivo de fibroblastos, también se observó que afectaba la expresión de fibronectina. Aunque los datos anteriores indicaban un

efecto positivo, la administración en animales causó serias complicaciones, pues el INF y interacciona con muchas otras citocinas y varios tipos celulares. Ahora se sabe que el INF y puede modular moléculas multifuncionales como IL-1, TNF alfa y prostaglandinas. (82)

Se ha empleado la D-penicilamina en la enfermedad de Wilson con efectos favorables, dado que el padecimiento es debido a un incremento de la concentración de cobre circulante y el fármaco actúa como agente aglutinante. Además, impide la maduración de la colágena debido a que interfiere con la formación de enlaces entrecruzados que le dan estabilidad a la molécula de colágena y también puede incrementar la solubilidad de esta proteína. Sin embargo, se ha reportado que una vez suspendido el compuesto aumenta el entrecruzamiento de las cadenas de colágena produciéndose fibrosis más severas. Además, en modelos animales de fibrosis producida por otras causas no ha demostrado tener actividad específica sobre el órgano fibrótico.

2.8.6 S-ADENOSIL METIONINA. (SAME)

También se ha intentado emplear el S-Adenosil metionina conocido como SAME, un compuesto el cual puede actuar como donador de grupos metilo en las reacciones de transmetilación. Esta molécula se encuentra distribuida de forma natural en todos los tejidos y

fluidos del organismo. La liberación ó donación de los grupos metilo conlleva a la activación de la ruta de tras-sulfuración para la generación de glutatión, siendo éste el principal antioxidante en el organismo para la detoxificación de varios compuestos.

La administración de SAME en forma de sal se ha estudiado en presencia de varias enfermedades crónicas del hígado como cirrosis hepática alcohólica, no alcohólica y colestasis, observandose un re-establecimiento de la función hepática.⁽⁸³⁾

Un estudio con pacientes cirróticos observaron que existía una disminución de la actividad de la enzima S-adenosil metionina sintetasa, la cual transforma a la metionina en S-adenosil metionina y este proceso se efectúa en el hígado. Por lo tanto, se intentó administrar el compuesto como tratamiento esperando atenuar la fibrogénesis. El efecto obtenido fue una mejoría en los parámetros de funcionamiento hepático, pero no disminución de la fibrosis, concluyendo que el glutatión hepático es derivado de la transulfuración del SAM el cual se disminuye por el daño hepático y por lo tanto, el incremento del glutatión por la administración exógena de SAME previene la inactivación de la enzima SAME sintetasa disminuyendo la presencia del agente hepatotóxico.⁽⁸⁴⁾ Por ésto se ha reportado que SAME previene y/o evita la hepatotoxicidad debida a agentes químicos como drogas (paracetamol), alcohol, esteroides, etc.

En cuanto a los efectos adversos solo se ha reportado ocasionalmente efectos gastrointestinales en dosis por arriba de 1.6g diarios. (85)

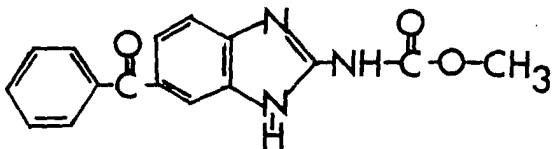
Todos los fármacos empleados hasta la fecha han proporcionado terapias alternativas que mejoran ó alivian algunas de las complicaciones producidas por la cirrosis hepática. Desafortunadamente, la poca especificidad de los medicamento administrados, así como su toxicidad han impedido que se obtenga el tratamiento que logre detener la fibrosis ó revertir el proceso cicatricial en los pacientes, para la erradicación de las enfermedades fibróticas.

2.9 MEBENDAZOL

2.9.1 CARACTERISTICAS.

El mebendazol es un fármaco que se desarrolló para el tratamiento de infecciones por vermes redondos, como resultado de las investigaciones efectuadas por Brugmans y col., en Bélgica en 1971. Su nombre químico es metil-N-(5-benzoil-2-benzimidazoil) carbamato. Es un polvo amorfo amarillo, muy poco soluble en agua, soluble en ácido fórmico, benzadehido, dimetil sulfóxido, de sabor desagradable y punto de fusión de 300° C. No es higroscópico y es estable al aire.

Su fórmula desarrollada es:



Fue aprobado como antihelmíntico de amplio espectro por la Food and Drug Administration (F.D.A.) en 1974, para emplearse en el tratamiento de infecciones únicas ó mixtas producidas por Ascaris lumbricoides, Enterobius vermicularis, Trichuris trichuria y Necator americanus. Actualmente se emplea como un agente eficaz contra nemátodos, céstodos y tremátodos en diferentes estados de madurez. Compuestos semejantes al mebendazol tienen actividad fungicida y antineoplásica.^(86,87)

2.9.2 MECANISMO DE ACCION

Inicialmente Van Den Bossche y col.⁽⁸⁸⁾ demostraron que la administración del mebendazol inducía la desaparición de los microtúbulos citoplasmáticos de los céstodos y nemátodos produciendose cambios degenerativos en las células, inhibiendo así la captación de glucosa de manera irreversible.⁽⁸⁸⁾ El mecanismo de acción del medicamento involucra la destrucción de los microtúbulos lo cual conlleva a la disminución de glucógeno almacenado y por

ende, a la reducción en la formación de trifosfato de adenosina (ATP), existiendo también alteraciones en la morfología ultraestructural las cuales se presentan en los gránulos secretorios, observándose un bloqueo en su transporte del aparato de Golgi al citoplasma. La acumulación de los mismos genera un citoplasma autolítico que libera enzimas que degradan al epitelio del parásito, aunado todo esto al decremento de energía necesaria para la reproducción y sobrevivencia del helminto. La inmovilización y muerte del parásito ocurre lentamente y la depuración del aparato gastrointestinal del huésped será completo después de tres a diez días de tratamiento.

Otros estudios han confirmado que el medicamento causa cambios degradativos en el tegumento y en las células del intestino del parásito, produciendo alteraciones bioquímicas en la ingesta de glucosa y alanina,⁽⁸⁹⁾ reducción de glucógeno, disminución de la síntesis de trifosfato de adenosina⁽⁹⁰⁾ al igual que una menor actividad enzimática en las ATPasas de sodio, potasio y magnesio.⁽⁹¹⁾

Asimismo, se está ensayando el mebendazol como un agente alternativo contra protozoarios ya que las terapias empleadas actualmente, aun cuando son eficientes, su uso es limitado por los efectos secundarios indeseables, como el caso del metronidazol el cual puede ser carcinógeno.⁽⁹²⁾

Se ha estudiado ampliamente el mecanismo de acción antihelmíntica de los benzimidazoles y todos los reportes concuerdan en que la principal vía es la inhibición de los microtúbulos por la unión del compuesto a la tubulina. La efectividad de los benzimidazoles es explicada por la relación estructura-actividad de varios derivados. Las dos sustituciones que presenta el mebendazol le confieren la mayor actividad; estas son el grupo carbamato (NH-CO₂-CH₃) en la posición 2 y el sustituyente benzoi- en la posición 5. Por su hidrofobicidad y tamaño, ambos potencian la actividad de éste entre todos los benzimidazoles.⁽⁸⁶⁾

La cinética de interacción del mebendazol y la tubulina también ha sido investigada encontrándose en experimentos in vitro que concentraciones menores de 10 μ M inhiben el equilibrio dinámico entre los microtúbulos. El sitio de unión del compuesto al dímero de tubulina es el mismo que el de la colchicina. Esto se ha demostrado por ensayos de inhibición por competencia con colchicina tritiada, aunque el sitio preciso de unión no ha sido identificado. En estudios de la interacción de la colchicina a la tubulina se ha observado que la constante de asociación de colchicina-tubulina esta entre 1×10^{-4} M a 1.8×10^{-5} M. Esta afinidad es dependiente de la fuente de tubulina: la obtenida de cerebro de mamíferos es de 1 a 2×10^{-5} M. La temperatura óptima de reacción es a 37° C, en estas condiciones se involucran enlaces no covalentes. Esto produce cambios conformacionales y la formación de complejos

colchicina-tubulina irreversibles. Estudios de unión al equilibrio demuestran una estequiometría de 0.2 a 0.7 equivalentes molares de colchicina tritiada por mol de tubulina. En comparación, el complejo mebendazol-tubulina también es dependiente de la temperatura. Sin embargo, éste es mayor a 4° C y es rápidamente reversible a 37° C. Se ha determinado que la disociación del complejo es de $1.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para la tubulina de los helmintos, lo cual difiere para la tubulina de mamíferos (2.7 min^{-1}). La unión de mebendazol tritiado a tubulina de mamífero es reversible y posee una constante de afinidad de un orden de magnitud menor que la calculada para la unión con tubulina de helminto.⁽⁸⁷⁾ También se ha demostrado que la unión del medicamento a la tubulina de parásitos no se ve afectada por la concentración de calcio ó la relación calcio/calmodulina.⁽⁹³⁾

Debido a que se ha reportado que en algunas especies los parásitos son resistentes a los benzimidazoles, el estudio de la interacción con la tubulina se ha ampliado. Se sabe que las subunidades alfa y beta de la tubulina pertenecen a una familia de proteínas que constan de múltiples isoformas que varían en organismos y tejidos aun en células del mismo organismo. La tubulina nativa de cerebro de mamífero contiene 22 % de alfa hélice, 30 % de beta plegada y 48 % de forma globular. Un cambio en la temperatura produce alteraciones conformacionales que pueden repercutir en la efectividad de los medicamentos. Las poblaciones

heterogéneas de isoformas de tubulina pueden generar modificaciones pos-traduccionales, así como cambios en la expresión de numerosos genes para la proteína. Estos cambios sugieren una diversidad de función para los microtúbulos. Estudios realizados con anticuerpos mostraron que el número de isoformas de tubulina, la movilidad electroforética y el patrón de expresión de las proteínas fue diferente en tres tejidos de Ascaris suum, ya que las isoformas encontradas en el intestino fueron diferentes a las de la pared del músculo ó a las del tracto reproductivo del parásito.⁽⁹⁴⁾

Por lo anterior se ha propuesto que una modificación en la secuencia de amino ácidos de las isoformas específicas de beta-tubulina sea la responsable de la afinidad a los benzimidazoles.⁽⁹⁴⁾ Probablemente también existan mutaciones puntuales que varíen la estructura de la beta-tubulina e interfieran con la interacción de la droga.⁽⁹²⁾ Además, la baja constante de disociación del complejo con la tubulina de nemátodos,⁽⁹³⁾ como es el caso de Caenorhabditis elegans, produce una resistencia a los benzimidazoles debida a una deleción en el gen de beta tubulina lo cual genera un proteína termolábil.⁽⁹⁵⁾

2.9.3 FARMACOCINETICA

El mebendazol fue sintetizado para funcionar como antiparasitario por lo que su solubilidad en agua es muy baja (0.05 - 0.10 %), la absorción del medicamento por el paciente es mínima (

menos del 10 %) aun cuando se puede aumentar la solubilidad por la naturaleza química del jugo gástrico (pH ácido). Además el epitelio intestinal funciona como una barrera lipóide impidiendo su fácil acceso. El efecto principal es intraluminal. La cinética en el proceso de absorción es de difusión simple por lo que no se satura el proceso; la concentración en el plasma es de 0.4 a 4.8 ug/ml.⁽⁹⁰⁾

En una análisis de biotransformación del mebendazol usando un sistema aislado de yeyuno de rata, se encontró que el medicamento se absorbe en el intestino y puede ser transformado en varios derivados, alfa-hidroxilo, glucurónico y 2-amino descarbamolizado. Estos fueron transportados hacia el lado seroso del intestino y pueden ser resecretados. Si se incrementa la actividad intestinal, el derivado descarbamolizado se eleva y a la vez se produce pérdida de la absorción, todos los derivados dejan de tener actividad antiparasitaria.⁽⁹⁶⁾

Pacientes infestados con Echinococcus fueron tratados con la droga por más de 4 años en dosis de 50 mg/Kg de peso, los resultados fueron favorables ya que el medicamento fue eficiente y bien tolerado.⁽⁹⁷⁾ Igualmente, se ha probado contra cisticercos en ratón, a la misma dosis, por vía intraperitoneal y resultó ser más efectivo produciendo la muerte de cisticercos maduros.⁽⁹⁸⁾

Por otra parte, en niños a los que se les administró mebendazol por vía oral con la dosis anteriormente mencionada se encontraron

niveles en plasma después de cuatro horas de 25.76 +
9.8 ng/ml.⁽⁹⁹⁾

En un reporte acerca del omeprazol, otro benzimidazol, se demostró que un derivado de éste, la N-acetilcisteína, es un producto final y además la reacción involucra al glutatión, el cuál es el principal antioxidante del organismo. Del metabolito de la droga se excretó aproximadamente el 10 % en la orina.⁽¹⁰⁰⁾ En cuanto a la toxicidad, el medicamento fue evaluado por vía oral en ratones, ratas y cobayos reportando una dosis LD50 de 1.28 g/kg y para conejos, perros y gatos fue de 0.64 g/kg. Estudios clínicos llevados a cabo en ovejas con dosis de 300mg/Kg no mostraron alteraciones. También se efectuaron estudios de fertilidad en ratas por periodos de 14 y 60 días antes y después de la gestación y durante la lactancia con dosis de 40 mg/Kg; igualmente, no se reportó alguna alteración en la mortalidad, embarazo, ingesta de alimento, número de descendientes, peso de las crías al nacer e incremento de peso de las mismas.⁽¹⁰¹⁾

En los tratamientos antiparasitarios se piensa que la selectividad de la toxicidad es el resultado de las diferencias entre la afinidad y capacidad de interacción del mebendazol - tubulina del helminto y mebendazol - tubulina del huésped.^(87, 92, 93, 94, 95)

III. ANTECEDENTES.

Como se mencionó, aún no existe un tratamiento adecuado para la cirrosis hepática, siendo este padecimiento una de las primeras causas de muerte en varios países. El estudio de una posible alternativa terapéutica para ésta enfermedad se basó en las propiedades del mebendazol, ya que aun cuando su administración generalmente ha sido en casos agudos, existen evidencias de su administración de manera crónica. Tal es el caso de pacientes con filariasis en el estado de Chiapas, a los cuales se les suministró una dosis de 2 g/día durante 12 meses, obteniéndose resultados favorables, sin presentar efectos secundarios.⁽¹⁰²⁾

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con este medicamento se han realizados varios estudios, tanto en animales de laboratorio, en especial con ratas, como en células en cultivo y en colaboración con el Hospital 20 de Noviembre se pudo establecer un protocolo de investigación con pacientes.

ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS.

Inicialmente se estableció un estudio con ratas en etapa de desarrollo a las que se les administró mebendazol por vía oral en dosis de 250 ppm en el alimento durante 150 días se demostró que el medicamento fue bien tolerado por los animales y no se observaron

alteraciones bioquímicas ni morfológicas en los diferentes órganos analizados. ⁽¹⁰³⁾

Posteriormente, se realizó un protocolo de inducción de cirrosis hepática con tetracloruro de carbono, con un esquema de inducción de cirrosis de 3 inyecciones cada semana durante 3 semanas, después se administró mebendazol durante 2, 3 y 6 semanas y se observó una reducción de la fibrosis producida, el contenido de colágena determinado por cuantificación de hidroxiprolina después del tratamiento mostró valores semejantes a los normales; en el estudio morfológico el grupo tratado solo con CCl₄ presentó fibrosis mientras que el tratado con mebendazol se encontró cierto desorden celular, presencia de infiltrado pero no fibras de colágena. ^(104, 105)

Después se realizó otro estudio en el cual la administración del mebendazol fue simultánea a la inducción de cirrosis hepática, se hicieron análisis bioquímicos de cuantificación de colágena durante el desarrollo de la cirrosis y se observó que en el grupo simultáneo se produjo un incremento gradual de la concentración de esta proteína sin obtener valores iguales a los obtenidos con el grupo CCl₄ (18.89 mg/gts v.s. 37.62 mg/gts respectivamente). ⁽¹⁰⁶⁾

ESTUDIOS REALIZADOS IN VITRO.

Para determinar si el mebendazol intervenía en la síntesis de colágena se realizó un estudio in vitro, con una línea celular

(fibroblastos) a la cual se le adicionó en el medio de cultivo mebendazol (5 a 20ug/ml) y mediante el uso de anticuerpos anti-colágena marcados con fluoresceina se pudo determinar que no se alteraba la síntesis de la proteína ya que se obtenía una acumulación de ésta en el citosol y debido a que si se interfiere con la formación de los microtúbulos se impidió secreción de la misma. ⁽¹⁰⁷⁾

En otro estudio se evaluó el efecto del medicamento en la actividad de colagenasa, para lo cual se adicionó mebendazol a cultivos tanto de fibroblastos como de macrófagos, a las concentraciones ya estudiadas. No se observó modificación en la actividad de la enzima en ambos cultivos, sin embargo, cuando el sobrenadante de los macrófagos a los cuales se les había adicionado mebendazol posteriormente se agregaba a los fibroblastos, se logró un incremento de la actividad de colagenasa, por lo tanto el medicamento activa a los macrófagos para producir factores que posteriormente estimulan a los fibroblastos para la producción de colagenasa. ⁽¹⁰⁸⁾

ESTUDIOS CLINICOS.

Con relación a la colaboración con el Hospital 20 de Noviembre se estableció un protocolo con pacientes cirróticos en estado terminal, a los cuales se les administró mebendazol (200 mg/día cinco días/semana), durante 9 meses. Los resultados fueron

favorables, se obtuvo una disminución en el contenido de colágena hepática y en los niveles séricos de prolina e hidroxiprolina, reducción de la colestasis, y un incremento en la concentración de hemoglobina.⁽¹⁰⁹⁾

Aún no se conoce el mecanismo por el cuál el mebendazol este modificando el establecimiento de la cirrosis hepática, pese a que los estudios previos podrían sugerir que se tiene un efecto antifibrosante, los estudios morfológicos muestran que existe una recuperación del hígado, pero en el análisis bioquímico no se puede demostrar ampliamente el efecto del medicamento.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVO DEL TRABAJO.

Debido a la variedad de factores involucrados en el desarrollo e instalación de la cirrosis hepática, no solo la cuantificación de colágena nos ayudaría a entender el mecanismo por el cual el mebendazol pudiera ser útil como una terapia para este padecimiento.

Como ya se mencionó, en las evaluaciones histológicas los cambios producidos en los animales tratados con el mebendazol, no pueden ser explicados solamente con la determinación total de colágena por medio de la cuantificación de hidroxiprolina, por lo que un estudio más detallado de la colágena que se produce durante

el desarrollo de la cirrosis, como cambios en las proporciones de las diferentes formas o tipos genéticos de esta proteína, podrían ayudar a explicar el efecto del medicamento, dado que, las propiedades físicas de cada tipo de colágena son diferentes y un cambio en la proporción, sobre todo de colágena tipo I, podría contrarrestar la fibrosis que caracteriza a ésta y otras enfermedades del tejido conjuntivo.

Las determinaciones bioquímicas reflejan un estado de complejidad diferente al que se observa por análisis morfológico, por lo que el mebendazol puede estar actuando no solo impidiendo la secreción de la colágena, sino también puede tener efecto sobre diversos tipos celulares cambiando así la producción de otras proteínas.

La hipótesis del presente trabajo es: "El mebendazol actúa no solo a nivel de secreción sino que también afecta la solubilidad y la distribución de los diferentes tipos de colágena".

Para comprobar la hipótesis anterior se plantea el siguiente objetivo:

Observar los cambios histológicos producidos por el medicamento al administrarse simultáneamente durante la inducción de la cirrosis hepática experimental producida por tetracloruro de carbono. Cuantificar colágena hepática durante la inducción de

cirrosis hepática experimental, y determinar los cambios en la solubilidad y proporción de los diferentes tipos de colágena involucrados en la cicatriz de la cirrosis hepática tratada con mebendazol.

V. MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron ratas machos de 6 semanas de edad de la cepa Sprague-Dowley y de peso corporal aproximado de 100g.

Los reactivos empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y del mejor grado disponible, siendo en su mayoría de grado analítico. El mebendazol fue adquirido comercialmente (Vermox); éste fue pulverizado y pesado para ajustar la dosis a 250 ppm, el fármaco fue mezclado en el alimento de los animales.

5.1 INDUCCION DE CIRROSIS

La cirrosis hepática fue inducida por medio de la administración por vía intraperitoneal de una dilución de tetracloruro de carbono (CCl_4) en aceite de oliva (1:7) en dosis de 0.2 ml 3 veces por semana.

5.2 FORMACIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.

Se generaron tres grupos de animales clasificados de la siguiente forma:

- A) Grupo control: animales que tenían alimentación normal sin ningún tratamiento
- B) Grupo simultáneo: grupo al cual se le administró mebendazol incorporado en el alimento (250ppm) y simultáneamente se le indujo cirrosis.
- C) Grupo con CCl₄: grupo que solamente recibió CCl₄.

De cada grupo se sacrificaron de 6 a 8 animales después de iniciado el tratamiento a cada uno de los siguientes tiempos.

- 1.- 10 días equivalentes a 5 inyecciones de CCl₄
- 2.- 22 " 10 "
- 3.- 35 " 15 "
- 4.- 45 " 20 "

5.3. OBTENCION DEL HÍGADO.

Cada animal fue anestesiado mediante inhalación de cloroformo; posteriormente se efectuó un corte transversal y se disecó por completo el hígado, se separó el lóbulo mayor y con éste se realizaron los estudios. Se seccionó en torno al ilio hepático para eliminar las venas y arterias de mayor calibre, las cuales contienen un alto porcentaje de colágena.

Posteriormente se hicieron cortes longitudinales de aproximadamente 2 mm de grosor. Dos de ellos se introdujeron en formalina neutra para posteriormente realizar el análisis

morfológico; el resto del tejido se fragmentó y se depositó en solución salina para más adelante obtener las muestras por triplicado para cada una de las evaluaciones.

5.4 Análisis Bioquímico.

En este análisis se llevó a cabo la determinación de hidroxiprolina en hidrolizados ácidos para la cuantificación de colágena, determinando así el grado de fibrosis presente en el hígado. Se partió de tres diferentes condiciones. Cada muestra fue de aproximadamente 200 mg de tejido fresco y fueron separadas de la siguiente forma: a) el tejido se deshidrató por incubación a 90° C en una estufa hasta peso constante (72 Hrs), b) el tejido se homogenizó con agua y después se deshidrató hasta peso constante a 90° C y c) el tejido húmedo directamente se sometió a la hidrólisis. Se empleó el método de J.F. Woessner Jr.⁽¹¹⁰⁾, Cada muestra fue hidrolizada en ampollitas de vidrio cerradas al vacío con ácido clorhídrico 6 N (HCl 6 N) e incubadas a 100° C por 48 Hrs. Posteriormente se filtraron las muestras para eliminar el carbón y se evaporaron a sequedad. Finalmente, se resuspendieron en 2 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7 y se tomaron las alícuotas apropiadas para la determinación colorimétrica.

La alícuota conveniente se ajustó a 2ml con agua, se adicionó 1 ml de solución de cloramina T 0.05 M y se incubó por 20 min., a temperatura ambiente. Después se adicionó 1ml de ácido perclórico

3.15 M, se agitó e incubó por 5 min., por último se agregó 1ml de p-dimetil amino benzaldehído, se agitó vigorosamente y la incubación se efectuó en baño maria a 60° C por 20 min. Se enfrió con agua corriente por 5 min. y se determinó la absorbancia.

Paralelamente con cada grupo de determinaciones problema se desarrolló una curva estándar de hidroxiprolina con una solución de 10ug/ml. La absorbancia a 557nm se midió en un fotocolorímetro (Spectronic 2 000 Bausch & lomb). fig. III

5.5 SEMI-PURIFICACION DE COLAGENA

Para realizar la semi-purificación de la proteína se partió de una muestra de 200 mg de tejido fresco. Esta se homogenizó en 2ml de agua bidestilada, la red conteniendo las fibras de matriz extracelular se separó por decantación y el material se puso a incubar con pepsina en ácido acético 0.05 M. En el caso de la digestión por 2 Hrs la concentración de pepsina fue de 100 ug/ml y para las 72 Hrs. fue de 10 ug/ml.

Inmediatamente las muestras se congelaron para ser liofilizadas y posteriormente se resuspendieron en 1.5 ml de amortiguador de corrida para electroforesis, agitandose fuertemente para solubilizar a las proteínas. A continuación las muestras se centrifugaron en una microfuga por 5 min., se recuperó el sobrenadante y se dializó contra una solución de ácido acético 0.01 M, por 24 Hrs, a 4° C.

CUANTIFICACION DE COLAGENA HEPATICA

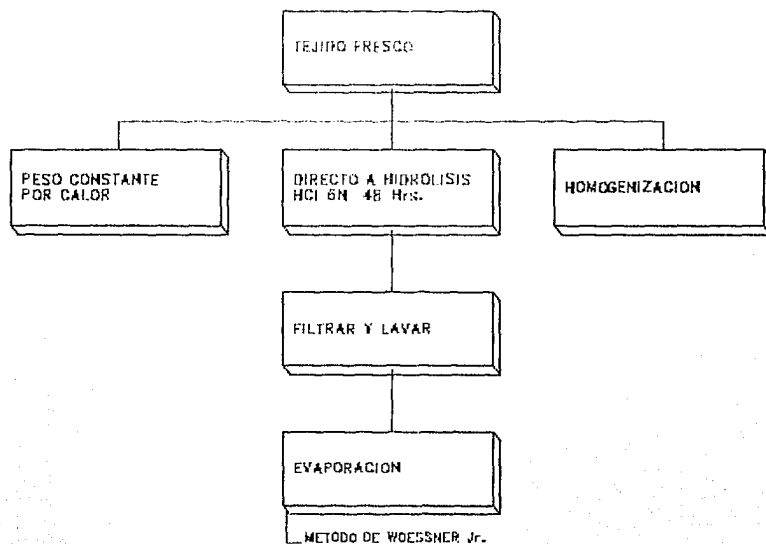


FIGURA III

El precipitado, así como alicuotas del sobrenadante, se sometieron a hidrólisis para la cuantificación de hidroxiprolina. Otras alicuotas del sobrenadante se utilizaron para realizar las electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % bajo las condiciones reportadas por Laemmli⁽¹¹¹⁾ ajustando la concentración de cada muestra para correr en cada carril una concentración aproximada de 15 ug de colágena y posteriormente realizar las densitometrias, obteniendo así la proporción de los diferentes tipos genéticos de colágena intersticial. Fig. IV

5.6 ACTIVIDAD COLAGENOLITICA

Para realizar esta determinación se empleó colágena marcada radiactivamente con tritio (560 000 cpm/mg Clg). La colágena se purificó previamente en el laboratorio a partir de piel de rata mediante precipitación diferencial con NaCl a pH neutro y posteriormente se marcó con anhídrido acético tritiado de acuerdo a la técnica reportada por Lefevre y col.⁽¹¹²⁾

Esta proteína se adsorbió a placas de plástico de 96 pozos por medio de una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH=9.6 dejándose secar al vacío. Después se lavó la placa con abundante agua destilada para eliminar los carbonatos.

Por otra parte, aproximadamente 200mg de la muestra de tejido fresco se homogenizaron con 2ml de agua destilada (muestras referidas como sin inhibidores) y otras muestras fueron

SOLUBILIDAD Y TIPOS DE COLAGENA

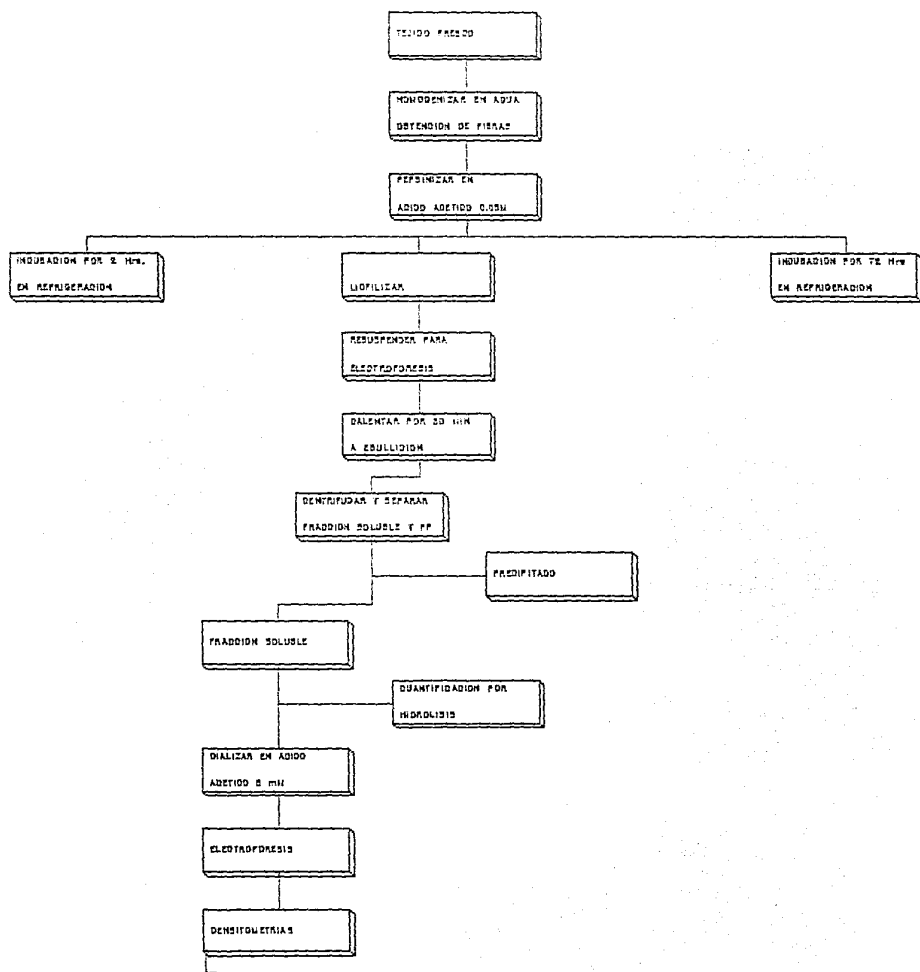


FIGURA IV

homogenizadas con 2 ml de una mezcla de inhibidores compuesta de EDTA 5mM, PMSF 5mM y N-etilmaleimida 0.5mM (concentración final). De éstos homogenados se colocaron 200 ul por pozo en la placa previamente tratada con colágena radiactiva y lavada, se adicionó una solución de Tris-HCl 50 mM pH=7.4, CaCl₂ 5mM concentración final, y en cada pozo se ajustaron los volúmenes a 250 ul. La temperatura de incubación fue de 30° C por 24 hrs.

Una vez terminada la incubación se tomaron 125 ul del sobrenadante y se le adicionaron 5ml de BRAY, para posteriormente determinar en un contador de centelleo (Beckman LS-1801) la cantidad de radiactividad (cpm) liberada por la colagenasa presente en el homogenado.

El control de la prueba (100% de liberación) fue colagenasa bacteriana en una concentración de 1.5 ug/ml en cada ensayo.

5.7 ANALISIS MORFOLOGICO

Como ya se mencionó, los fragmentos fueron fijados en formalina neutra inmediatamente después de la disección del hígado de cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales. Estos tejidos se mantuvieron en formalina neutra por 24 hrs., posteriormente se cambiaron a solución amortiguadora de fosfatos.

Se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes semifinos de 5 micras. Se tñeron con hematoxilina y eosina, así como con la

tinción tricrómica de Massón de acuerdo a las técnicas convencionales de histología.

VI.- RESULTADOS.

En el análisis histológico se puede observar un menor daño en los animales tratados con el medicamento, sin embargo la correlación con los datos bioquímicos, no es muy clara, existe una mayor lesión y fibrosis en los estadios avanzados y es mayor en el grupo con CCl_4 que en el tratado con CBZ. En la figura V se muestran cortes histológicos de hígados de ratas normales, se muestra el arreglo típico de los hepatocitos en forma de cordones; la colágena se observa sobre los espacios perivasculares, no se encuentran cambios morfológicos a las diferentes edades de los animales. En la fig. VI se presentan las histologías de los animales tratados simultáneamente con CBZ y CCl_4 , así como de los animales que solo recibieron 5 y 10 inyecciones de CCl_4 . La presencia de colágena se puede observar desde las 5 iny., en el grupo C (CCl_4), en donde es mas aparente y con una distribución intersticial y pericelular, mientras que en el grupo tratado simultáneamente es menor y casi exclusivamente perisinusoidal. Se observa un poco de esteatosis, de tal forma que a las 10 iny., el desorden celular y la formación de nódulos de regeneración en el grupo C (CCl_4) es muy clara. Las bandas fibróticas formadas

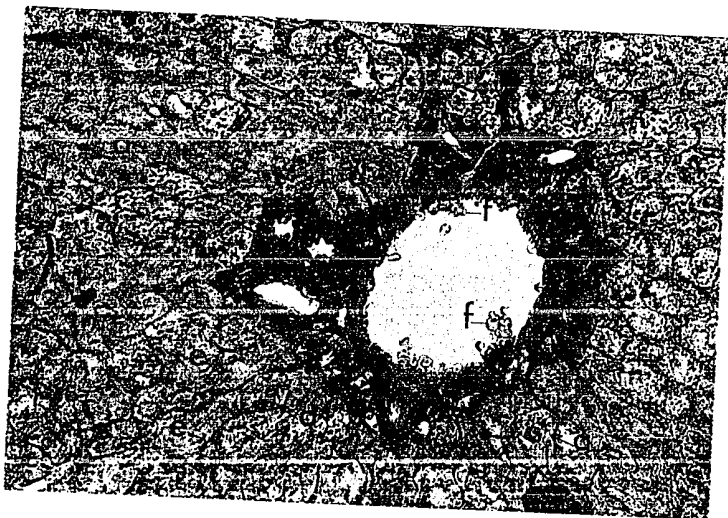
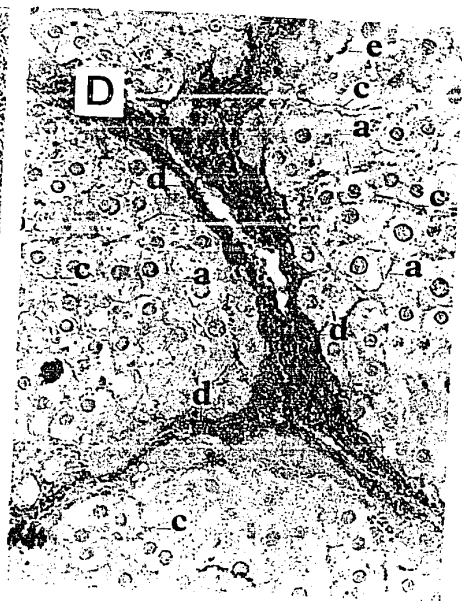
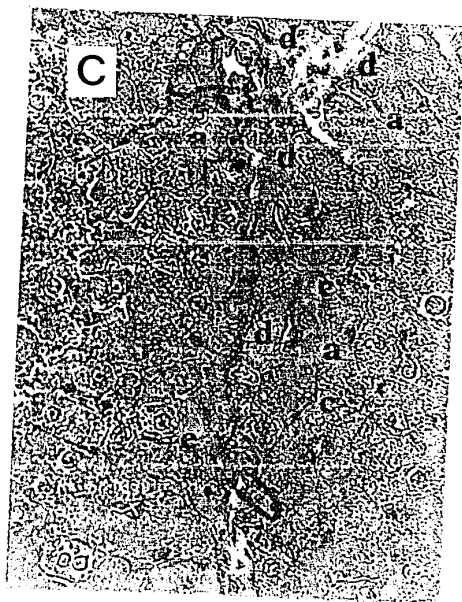
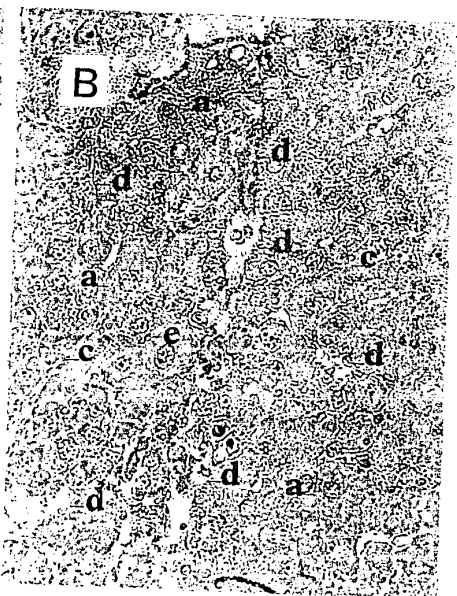
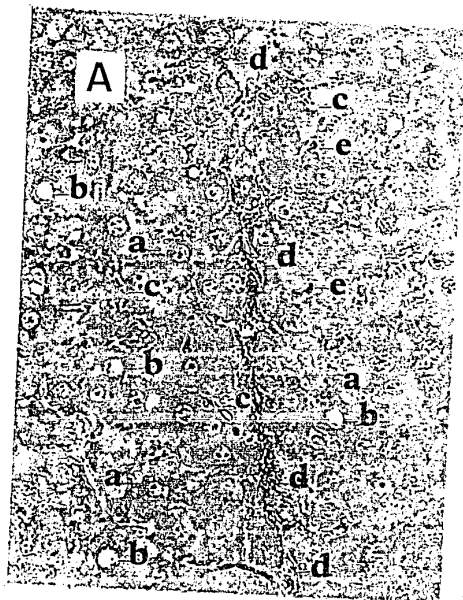


FIG. V. CORTE HISTOLOGICO DE HIGADO DE RATA.
Alimentación normal, sin ningún tratamiento. Aumento 500 X.
a) hepatocitos, b) arteria hepática, c) sinusoides,
d) colágena, e) células de Kupffer, f) eritrocitos.

FIG. VI. CORTES HISTOLOGICOS DE HIGADOS DE RATAS.

A) y C) animales tratados simultáneamente con CBZ y CCl₄, 5 y 10 iny, respectivamente. B) 5 iny. y D) 10 iny animales tratados solamente con CCl₄. Aumento de 500 X.

a) hepatocitos, b) esteatosis, c) sinusoides,
d) colágena, e) células de Kupffer, f) eritrocitos.



principalmente por colágena son muy acentuadas y van de un espacio vascular a otro. En comparación, el grupo tratado con CBZ y CCl_4 presenta una menor cantidad de fibrosis y no se observan aún los nódulos de regeneración.

En la fig. VII se muestran las microfotografías a un aumento de 500 X de los animales tratados simultáneamente con mebendazol y CCl_4 ; y la de los animales tratados solamente con CCl_4 a las 15 y 20 inyecciones. En estas etapas la diferencia es muy clara, tanto en la cantidad como en la distribución de las bandas de colágena, la disposición no es igual y por lo tanto el desarreglo de los cordones de hepatocitos y la necrosis celular son mucho mas acentuados en el grupo de CCl_4 comparado con el grupo tratado simultáneamente. A las 20 iny., el grupo C (CCl_4) presenta cariorrexis, la colágena es abundante, con formación de nódulos de regeneración y total destrucción celular, mientras que en el grupo B la cantidad aparente de colágena es menor, existen nódulos de regeneración, en algunas zonas hay esteatosis pero aún se mantiene el orden celular, lo cual puede favorecer el funcionamiento del órgano.

La cuantificación de colágena mediante la determinación de hidroxiprolina en hidrolizados ácidos de tejido está representada en la tabla IV, tabla V y fig. VIII. Como puede observarse la concentración de colágena en los animales controles es de 1.83 mg/gth., y conforme se induce la cirrosis se obtiene un incremento

FIG. VII. CORTES HISTOLOGICOS DE HIGADOS DE RATA.

A) y C) animales tratados simultáneamente con CBZ y CCl₄, 15 y 20 inyecciones respectivamente. B) 15 iny. y D) 20 iny. animales que solo recibieron CCl₄.

Aumento de 500 X. a) hepatocitos, b) vena hepática, c) sinusoides, d) colágena, e) células de Kupffer, f) eritrocitos, g) fibroblastos, h) cariorexis.



INCREMENTO EN LA CONCENTRACION DE COLAGENA HEPATICA
EN RATAS TRATADAS CON MEBENDAZOL DURANTE LA INDUCCION DE CIRROSIS

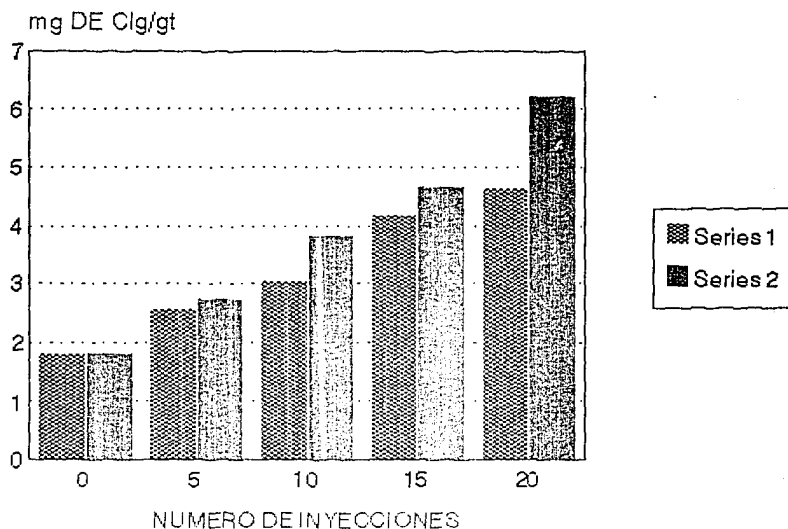


FIGURA VIII. Incremento en la concentración de colágena hepática- (mg de Clg/gt) miligramos de colágena por gramo de tejido húmedo. Serie 1= Animales tratados simultáneamente con CCl_4 y Mebendazol. Serie 2= Animales que solo recibieron CCl_4 . Las determinaciones se realizan por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

en la concentración de esta proteína. No hay diferencia significativa utilizando la prueba estadística de t de student, entre las determinaciones de tejido seco, tejido húmedo y homogenado de cada uno de los grupos en cada uno de los tiempos de tratamiento. Sin embargo, en el grupo tratado solamente con CCl₄ se observa una ligera dispersión de los datos.

Desde las 5 iny. se puede notar en ambos grupos de tratamiento una tendencia a un incremento en la concentración de colágena de 2.57 mgClg/gth (miligramos de colágena/gramos de tejido húmedo) (40 %) para los animales tratados simultáneamente y 2.74 mgClg/gth (49 %) para los que solo recibieron CCl₄. En esta etapa las pruebas estadísticas no son significativas. Las diferencias entre los dos grupos son más claras con las siguientes inyecciones, ya que en el grupo C (CCl₄) la elevación de la concentración fue de 3.85 mgClg/gth y 4.69 mgClg/gth que representan el 110 % y del 156 % (10 y 15 iny.) más que en el grupo control, mientras que en el grupo B (CBZ + CCl₄) el aumento solo fue de 3.05 mgClg/gth y 4.20 mgClg/gth que constituyen el 66 % y 129 % (10 y 15 iny.). Sin embargo, solo a las 10 inyecciones de tratamiento las pruebas estadísticas fueron significativas (P menor de 0.001.)

CUANTIFICACION DE COLAGENA HEPATICA*.

	T.H. ^a	HOM. ^b	T.S. ^c
CONTROL	1.94 ± 0.35	1.65 ± 0.30	1.91 ± 0.55
5 INY.			
CCL ₄ + CBZ	2.48 ± 0.47	2.43 ± 0.74	2.81 ± 0.46
CCL ₄	2.77 ± 0.34	2.69 ± 1.00	2.77 ± 0.89
10 INY			
CCL ₄ + CBZ	3.10 ± 0.67	2.89 ± 1.10	3.16 ± 1.38
CCL ₄	3.90 ± 1.30	3.85 ± 1.43	3.79 ± 1.08
15 INY			
CCL ₄ + CBZ	4.24 ± 0.73	3.97 ± 0.46	4.39 ± 0.29
CCL ₄	4.34 ± 0.95	4.56 ± 0.86	5.18 ± 0.60
20 INY			
CCL ₄ + CBZ	4.65 ± 0.09	4.40 ± 0.99	4.92 ± 0.62
CCL ₄	6.63 ± 2.72	5.85 ± 1.66	6.20 ± 1.65

TABLA IV. Cuantificación de la colágena hepática por determinación de hidroxiprolina de hidrolizados ácidos de tejido. mgClg/gt = miligramo de colágena/gramo de tejido húmedo, T.H.^a = determinación en tejido húmedo, Hom^b = determinación en tejido homogenizado, T.S.^c = determinación en tejido seco. CBZ = carbamato de benzimidazol (mebendazol), CCL₄ = tetracloruro de carbono. Las determinaciones se realizaron por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

INCREMENTO EN EL PORCIENTO DE COLAGENA HEPATICA

GRUPO CONTROL	1.83 mgClg/gth = 100%	
	CBZ + CCL ₄	CCL ₄
5 INY.	2.57 mgClg/gth= 140 %	2.74 mgClg/gth= 149 %
10 INY.	3.05 mgClg/gth= 166 %	3.85 mgClg/gth= 210 %
15 INY.	4.20 mgClg/gth= 229 %	4.69 mgClg/gth= 256 %
20 INY.	4.66 mgClg/gth= 254 %	6.24 mgClg/gth= 340 %

TABLA V. Incremento en el porciento de colágena hepática. mgClg/gth = miligramos de colágena/gramo de tejido húmedo. Datos promediados de las tres determinaciones anteriores. CBZ = carbamato de benzimidazol (mebendazol), CCL₄ = tetracloruro de carbono.

Definitivamente a las 20 iny. se alcanza el máximo incremento, 240 % más de colágena para el grupo de CCl₄, que corresponden a 6.24 mgClg/gth y 4.66 mgClg/gth siendo el 154 % para el grupo simultáneo. También a este tiempo el análisis estadístico no fue significativo debido a la dispersión de los datos.

El análisis de la solubilidad de la colágena extraída se muestra en la tabla VI. Para esta determinación se incubó la matriz con pepsina durante dos horas, debido a que la colágena tipo IV es sensible a la pepsina por periodos prolongados (fig. IX) y setenta y dos horas para obtener el máximo de solubilización de colágenas tipo I y III (fig. X).

Como podrá advertirse, el grupo control tiene un 63 % de colágena que puede ser solubilizada y por lo tanto un 37 % de proteína insoluble, esta última fracción es colágena que no es sensible a la extracción con pepsina por estar altamente entrecruzada o por interacción con otras proteínas de la matriz extracelular.

Conforme se induce la cirrosis hepática, estas proporciones se modifican pues a las 5 inyecciones hay un incremento entre el 70% y 83 % de solubilidad tanto en el grupo tratado simultáneamente, como el que solo recibió CCl₄. Por lo tanto, la colágena que no se solubiliza disminuye entre el 16 % y 29 %. Estas diferencias no son estadísticamente significativas por la prueba de t de student. Sin embargo, este efecto se modifica a las 10 iny, en

PORCIENTO DE SOLUBILIDAD DE LA COLÁGENA HEPÁTICA
INCUBACION DE 2 HRS. CON PEPSINA

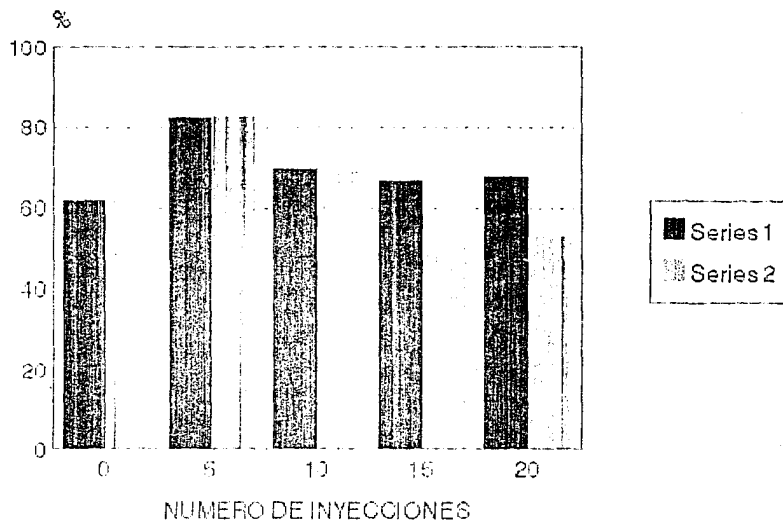


FIGURA IX. Porcentaje de solubilidad de la colágena hepática con - tiempo de incubación de 2 hrs; con pepsina en ácido acético 0.05M. Serie 1 = Animales tratados simultáneamente con CCl_4 y mebendazol. Serie 2 = Animales tratados solamente con CCl_4 . Las determinaciones se realizaron por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

PORCIENTO DE SOLUBILIDAD DE LA COLAGENA HEPATICA
INCUBACION DE 72 HRS. CON PEPSINA

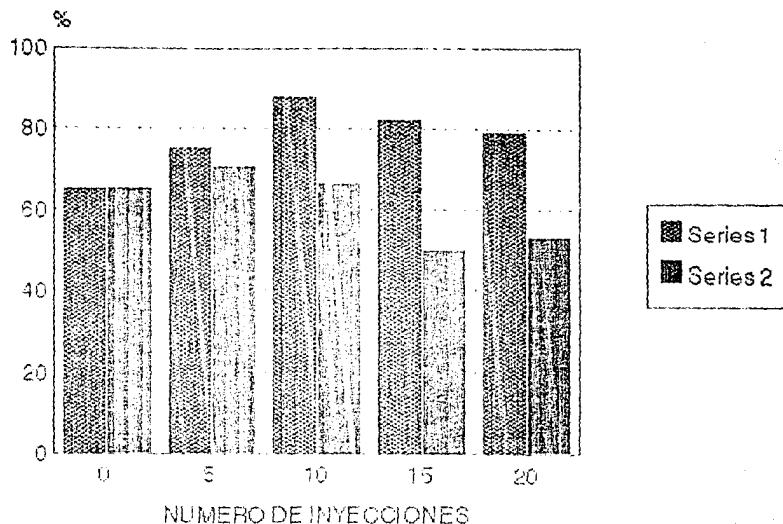


FIGURA X. Porcentaje de solubilidad de la colágena hepática con -
tiempo de incubación de 72 hrs; con pepsina en ácido -
acético 0.05 M. Serie 1 = Animales tratados simultáneamente con CCl_4 y Mebendazol. Serie 2 = Animales tratados solamente con CCl_4 . Las determinaciones se realizaron por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

COLAGENA HEPATICA SOLUBLE E INSOLUBLE

CONTROL		SOL.	INSOL.	72 Hrs.	SOL.	INSOL.
2 Hrs.		62.0	38.0		65.6	34.4
		CCl ₄ + CBZ		CCl ₄		
5 INY.						
	2 Hrs.	83.1	16.9		83.2	16.8
	72 Hrs.	75.6	24.4		70.9	29.1
10 INY.						
	2 Hrs.	69.9	30.1		69.5	30.5
	72 Hrs.	87.9**	12.1**		66.8	33.2
15 INY.						
	2 Hrs.	66.9	33.1		50.4	49.6
	72 Hrs.	82.6**	10.6**		65.7	43.4
20 INY.						
	2 Hrs.	68.2	31.8		53.5	46.5
	72 Hrs.	79.5*	20.5*		54.7	45.3

TABLA VI. Colagena hepatica soluble e insoluble después de la incubación con pepsina. Datos expresados en %. Incubación con pepsina en ácido acético 0.05M. CBZ = carbamato de benzimidazol (mebendazol), CCl₄ = tetracloruro de carbono, * = P menor de 0.005 ** = P menor de 0.001. Las determinaciones se realizaron por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

ambos grupos, tanto en las muestras incubadas por 2 hrs, con pepsina, siendo de 69% la colágena soluble y 31% la fracción no

disgregada, como la incubación a 72 hrs, en donde en el grupo tratado simultáneamente con mebendazol se incrementa la solubilidad al 87.9% y solo el 12% es fracción no soluble, mientras que el grupo tratado solamente con CCl₄ presenta en la fracción soluble un 66% y de fracción no soluble un 33%. Estas diferencias si son altamente significativas ya que tienen un valor de P menor de 0.001. Los animales con tratamiento simultáneo mantienen la solubilidad en los siguientes tiempos y la fracción no disgregable a las 15 y 20 inyecciones es del 10% y 20 % respectivamente, la cual siempre es menor a la que se encuentra en los animales controles. Con respecto al grupo cirrótico, se aprecia una disminución en la proporción de la colágena soluble entre el 66 %, a las 15 inyecciones, llegando hasta 54 % a las 20 inyecciones. El análisis estadístico a las 15 y 20 inyecciones muestra una significancia de P menor de 0.001 y P menor de 0.005 respectivamente.

Para determinar los diferentes tipos de colágena, como se mencionó en Materiales y Métodos, se semipurificó la matriz extracelular, se degradó con pepsina y posteriormente se sometió a electroforesis. Como se muestra en la fig. XI, en el carril 1 se encuentra un patrón de colágena tipo I purificada de piel de rata, la cual posteriormente se marcó con anhídrido acético tritiado para el ensayo de colagenasa. También se puede observar la colágena hepática de las ratas del grupo control en los

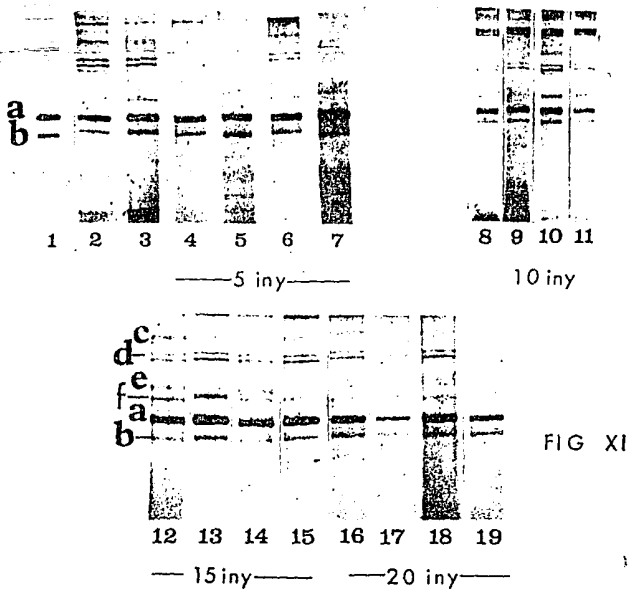


FIG XI

Fig. XI. Colágena purificada de higado de rata. Las muestras fueron incubadas 2 y 72 hrs. con pepsina en ácido acético 0.05M. El gel se tiño con azul de coomassie. a) Cadena alfa 1 de la colágena tipo I [α_1 (I)]. b) Cadena alfa 2 de la colágena tipo I [α_2 (I)]. c) Asociación Gamma de la colágena tipo I [α_1 (I)₂, α_2 (I)]. d) Asociación Beta de la colágena tipo I [α_1 (I)₂; y α_1 (I) α_2 (I)]. e) Cadena alfa de la colágena tipo IV [α_1 (IV)]. f) Cadena alfa de la colágena tipo III [α_1 (III)].

1) Control puro de colágena. 2) 2hr. y 3) 72 hrs. Normal.
 4), 8), 12) y 16) 2 hrs de incubación de animales tratados simultáneamente.
 6), 10), 14) y 18) 72 hrs de incubación de animales tratados simultáneamente.
 5), 9), 13) y 17) 2 hrs de incubación de animales tratados solo con CCl₄.
 7), 11), 15) y 19) 72 hrs de incubación de animales tratados solo con CCl₄.

carriles 2 y 3 los cuales representan la incubación de 2 y 72 hrs., con pepsina respectivamente.

Los patrones electroforeticos de colágena hepática de ratas tratadas con 5 inyecciones se muestran en los carriles del 4 al 7; con 10 inyecciones de tratamiento en los carriles del 8 al 11; los patrones del 12 al 15 son con 15 inyecciones y del 16 al 20 están las electroforesis de los animales tratados con 20 inyecciones. En todos los tiempos de tratamiento, el orden de las muestras es inicialmente de 2 hrs., con pepsina tanto para los animales tratados con CBZ y CCl₄ (carriles 4, 8, 12 y 16) como para los tratados solamente con CCl₄ (carriles 5, 9, 13 y 17). A continuación se observan las muestras con 72 hrs., de incubación con pepsina, igualmente para los animales tratados con CBZ y CCl₄, los carriles 6, 10, 14 y 18 mientras que para los tratados solamente con CCl₄, se localizan en el 7, 11, 15 y 19.

Posteriormente se efectuaron las densitometrias y se analizaron las áreas bajo las curvas para determinar los porcentajes de los diferentes tipos genéticos de la proteína. Estos datos se presentan en la tabla VII; en la fig. XII se encuentran graficados los resultados correspondientes a la incubación con pepsina durante 2 hrs; para las 72 Hrs. de incubación los resultados se muestran en la fig. XIII.

DENSITOMETRIAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENA
 INCUBACION DE 2 HRS. CON PEPSINA

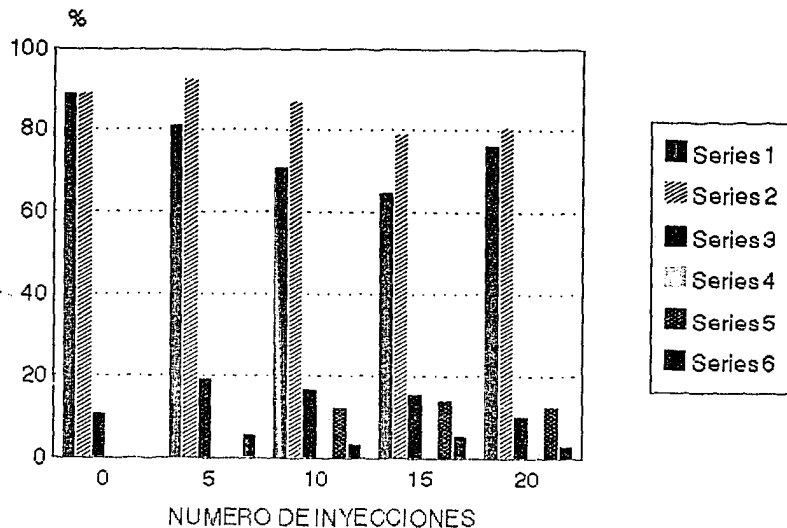


FIGURA XII. Densitometrías de los diferentes tipos de colágena hepática - (%), con tiempo de incubación de 2 hrs; con pepsina. Serie 1 = Colágena I de animales tratados simultáneamente. Serie 2 = Colágena I de animales tratados solo con CCl_4 . Serie 3 = Colágena - III de animales tratados simultáneamente. Serie 4 = Colágena III de animales tratados solo con CCl_4 . Serie 5 = Colágena IV de animales tratados simultáneamente. Serie 6 = Colágena IV de animales tratados solo con CCl_4 . Las determinaciones se realizaron - por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

DENSITOMETRIAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENA
 INCUBACION DE 72 HRS. CON PEPSINA

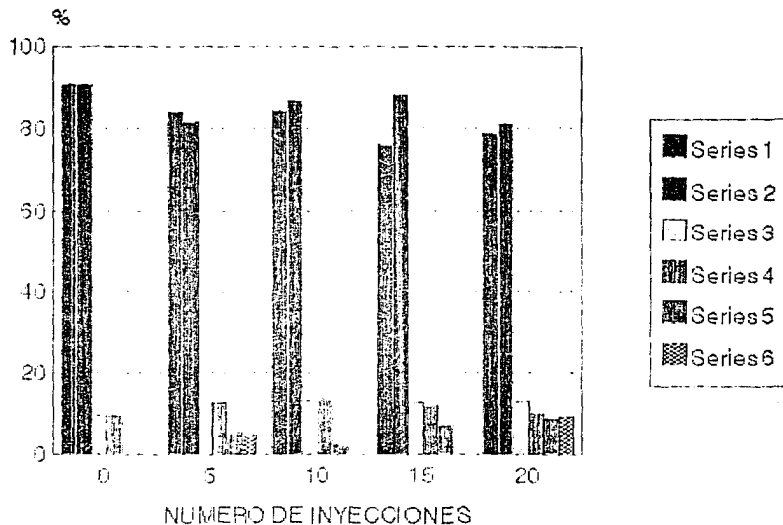


FIGURA XIII. Densitometrías de los diferentes tipos de colágena hepática - (%), con tiempo de incubación de 72 hrs; con pepsina. Serie 1 = Colágena I de animales tratados simultáneamente. Serie 2 = Colágena I de animales tratados solamente con CCl_4 . Serie 3 = Colágena III de animales tratados simultáneamente. Serie 4 = Colágena-III de animales tratados solo con CCl_4 . Serie 5 = Colágena IV de animales tratados simultáneamente. Serie 6 = Colágena IV de animales tratados solo con CCl_4 . Las determinaciones se realizaron por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

Como se puede observar, en el grupo control solo se encuentra colágena tipo I en un 90 % y tipo III en un 10 % tanto a las dos como a las setenta y dos horas de digestión.

Durante la inducción de la cirrosis hepática los tipos y la concentración de la colágena se modifica. En el grupo con tratamiento simultáneo la colágena tipo IV se encuentra incrementada hasta un 14 % (2 hrs., a las 15 iny.), con excepción de las 2 hrs. a las 5 iny., en las que no se pudo determinar (ND), a diferencia del grupo tratado solamente con CCl₄ el cual mostró un aumento máximo de este tipo de colágena de un 8.9 % a las 20 iny.

También la concentración de colágena tipo III se alteró. Inicialmente, en el grupo B (CBZ + CCl₄) se presenta un ligero incremento de 9.2 % a 10.9 % y después alrededor del 12 % el cual se mantiene hasta las 20 iny. Un efecto contrario se observa en el grupo tratado solamente con CCl₄ en donde hay un incremento de 9.2 % a 12.4 %; en el siguiente tiempo a 13.3 % y, finalmente, a las 20 iny. hay una disminución hasta un 9.8 %.

DENSITOMETRIAS DE LOS DIFERENTES TIPOS

DE COLAGENA HEPATICA (%)

	2 Hrs. CON PEPSINA			72 Hrs. CON PEPSINA		
	I	III	IV	I	III	IV
CONTROL	89.15	10.85	ND	90.73	9.27	ND
5 INY.						
CCl ₄ + CBZ	80.93	19.07	ND	84.01	10.98	5.01
CCl ₄	92.61	3.45	5.62	81.62	12.48	4.50
10 INY.						
CCl ₄ + CBZ	71.24	16.76	12.47	84.57	12.99	2.45
CCl ₄	86.95	9.93	3.46	86.75	13.30	ND
15 INY.						
CCl ₄ + CBZ	64.85	15.70	14.42	75.90	12.57	6.86
CCl ₄	79.14	15.07	5.23	87.92	12.08	ND
20 INY.						
CCl ₄ + CBZ	76.55	10.20	12.68	78.81	12.72	8.47
CCl ₄	80.55	6.22	3.26	81.14	9.89	8.97

TABLA VII. Densitometrías de los diferentes tipos de colágena hepática, datos expresados en porciento (%). CBZ = carbamato de benzimidazol, CCl₄ = tetracloruro de carbono, ND = no detectado. Las determinaciones se realizaron por duplicado en grupos mínimos de 6 animales.

Con respecto al ensayo de la actividad colagenolítica en los homogenados de tejidos, los resultados preliminares están expresados en cpm de la radiactividad liberada al medio por la actividad enzimática (tabla VIII). Como puede observarse, en los animales tratados simultáneamente, los homogenados con inhibidores a las 5 inyecciones presentan una mayor actividad de hasta el 100%, mientras que en el grupo tratado con CCl₄, este aumento no fue tan notable (Control $4,466.1 \pm 507.9$ cpm, tratado con CBZ $8,546.8 \pm 1296.0$ cpm. y CCl₄ $5,919.7 \pm 1401.1$ cpm).

En cambio en los homogenados sin inhibidores aparentemente en el grupo con tratamiento simultáneo los animales no presentaron alteración en la actividad de la enzima excepto a las 20 inyecciones en las que se observa un ligero decremento. En el grupo que solo recibió CCl₄, los homogenados a las 10 inyecciones presentan una elevación de la actividad colagenolítica de $3,747.99 \pm 577.9$ cpm a $6,830.46 \pm 1208.4$ cpm y posteriormente disminuye a $3,625.3 \pm 525.4$ cpm.

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN HOMOGENADOS DE HIGADOS
DE RATAS CIRROTICOS Y TRATADAS SIMULTÁNEAMENTE CON CBZ

GRUPO CONTROL

CON INHIBIDORES 4, 255.9 ± 665.5 cpm

SIN INHIBIDORES 4, 466.1 ± 507.9 cpm

CBZ + CCl₄

CCl₄

5 INY.

CON INHIBIDORES 3,888.1 ± 437.8 cpm 3,747.9 ± 577.9 cpm

SIN INHIBIDORES 8,546.8 ± 1296.0 cpm 5,919.7 ± 1401.1 cpm

10 INY.

CON INHIBIDORES 3,520.3 ± 665.5 cpm 6,830.4 ± 1208.4 cpm

SIN INHIBIDORES 3,695.4 ± 718.0 cpm 4,045.7 ± 858.1 cpm

15 INY.

CON INHIBIDORES 3,607.8 ± 385.3 cpm 3,625.3 ± 472.8 cpm

SIN INHIBIDORES 4,493.7 ± 1103.3 cpm 3,625.3 ± 525.4 cpm

20 INY.

CON INHIBIDORES 3,152.5 ± 472.8 cpm 4,466.1 ± 928.2 cpm

SIN INHIBIDORES 3,625.3 ± 525.4 cpm 3,345.1 ± 735.5 cpm

TABLA VIII. Actividad colagenolítica de hígados de ratas cirróticas y tratadas simultáneamente con CBZ. cpm = cuentas por minuto, CBZ = carbamato de benzimidazol (mebendazol), CCl₄ = tetracloruro de carbono. Las determinaciones se realizaron por triplicado en grupos mínimos de 6 animales.

VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

La cirrosis hepática producida por el consumo de alcohol es uno de los padecimientos que genera un gran número de defunciones a nivel mundial, aun cuando la cantidad y tipo de bebidas alcohólicas es muy variable entre las diferentes poblaciones. Como ya se mencionó, en México la cantidad de personas que ingieren alcohol en cantidades considerables es de aproximadamente 3 y medio millones; por lo tanto, el estudio de la enfermedad es importante ya que una vez establecida la cirrosis hepática las terapias empleadas en la actualidad no han sido satisfactorias. Algunos medicamentos tienen una absorción intestinal elevada pero la actividad específica hacia el hígado es muy escasa, por lo que se producen una gran cantidad de efectos secundarios indeseables, otros presentan acumulación en diferentes órganos llegando a producir daño en los mismos.

El establecimiento de la cirrosis hepática es un proceso complejo que involucra muchos factores, células y componentes del tejido conjuntivo, los cuales interactúan generando señales intercelulares que a su vez inician la síntesis de mediadores y proteínas en un intento de reparar el daño sufrido. Cuantitativamente, la principal de las proteínas producidas es la colágena, a la que analizamos específicamente en este trabajo durante la administración simultánea de carbamato de benzimidazol y la inducción de cirrosis hepática experimental.

La colágena, se modificó tanto en concentración como en la proporción de varios de sus tipos genéticos, debido a la administración del medicamento probado. Se observó claramente desde un punto de vista histológico una menor lesión en los animales tratados con mebendazol. Sin embargo, las diferencias en los niveles de colágena cuantificados mediante la determinación de hidroxiprolina no fueron significativas (Tabla IV). Esto puede deberse a que en el método bioquímico utilizado no se puede discernir entre la colágena que está formando las fibras de la que se encuentra ya sea en pequeños péptidos o en proceso de degradación, la cual en el padecimiento no está constituyendo la fibrosis causante del padecimiento y además, la dispersión de los datos puede estar influenciada por la variabilidad biológica de los animales.

Sin embargo, la solubilidad de la colágena semipurificada, la cual desde las 10 inyecciones se modificó de manera significativa, así como, los tipos genéticos de colágena y por ende de la matriz extracelular se alteró por dicho fármaco. Estos datos concuerdan con el análisis histológico que muestra una tendencia a un menor incremento en el depósito de las fibras, como puede observarse en las fig. V, VI, VII y IX el incremento de proteína no es de la misma magnitud en los animales tratados con mebendazol. Posiblemente esta droga pueda tener diferentes efectos.

Existen reportes en donde se muestra que la administración del CBZ en forma crónica con dosis de 250 ppm en el alimento de los animales controles no produjo alteraciones bioquímicas ni morfológicas.⁽¹⁰³⁾ Además, recientemente se reportó su administración por más de 4 años a una dosis de 50 mg/Kg de peso corporal en pacientes con infecciones con Echinococcus granulosus observándose buenos resultados. Asimismo, fue bien tolerado por los pacientes.⁽⁹⁷⁾ Esto nos muestra un alto índice de seguridad en el uso del mebendazol para ser empleado como una terapia crónica. Los resultados obtenidos mediante la cuantificación de colágena usando la estimación de hidroxiprolina en hidrolizados ácidos, demuestra que la inducción de cirrosis con CCl₄, el cual se ha reportado que es un agente hepatotóxico, incrementa la concentración de colágena hasta 240%, mientras que en el grupo tratado simultáneamente con el CBZ el aumento de la proteína fue únicamente de 154 % sobre la concentración del grupo control. Esta diferencia puede deberse a que cuando se produce el daño en el hígado se inicia un proceso de regeneración. La progresión de la lesión generará una reparación, esto es, la sustitución de parénquima por fibrosis lo cual conduce a un incremento de tejido cicatricial en especial de colágena. En el grupo al que se le administró el medicamento la elevación de la proteína fue menor y esto podría explicarse de diferentes maneras. A) Probablemente el fármaco puede afectar la secreción de la colágena ya que esta proteína requiere del sistema microtubular

para su secreción a la matriz extracelular y está ampliamente reportado que el compuesto tiene gran afinidad por la tubulina a la cual se le une impidiendo así la formación de microtúbulos.⁽¹¹³⁾ B) El fármaco de alguna manera induce un mayor catabolismo de la colágena. C) Puede actuar impidiendo una lesión a los hepatocitos y por lo tanto habrá una menor destrucción de tejido hepático.

Con respecto a esta última hipótesis se conoce que durante el proceso de regeneración y cicatrización que se efectúa en el hígado como en el caso de la ingesta de alcohol que conlleva a la cirrosis se cambian y/o se modifican los componentes de la matriz extracelular, ya que se ha reportado que el etanol produce defectos en el funcionamiento de los hepatocitos por alteración en los fosfolípidos y proteínas de membrana, así como en los elementos del citoesqueleto de estas células.⁽³²⁾ Otro estudio realizado en macrófagos postula que el etanol produce un incremento en Ca^{++} y esto contribuye a la producción de iones superóxido, generando un aumento en el inositol 1,4,5-trifosfato y por lo tanto liberación de Ca^{++} intracelular.⁽³⁴⁾

Todos estos constituyentes producen un padecimiento de origen multifactorial, por lo que el efecto de la administración del mebendazol no solo afectó la secreción de la colágena que se establece en la matriz extracelular sino también la solubilidad de ésta como puede observarse en la tabla VI y en las figuras IX y X dicha proteína se extrajo a lo largo de la inducción de cirrosis y

también en el grupo con tratamiento, este parámetro se incrementa inicialmente en ambos grupos, lo cual puede deberse a que se trata de una colágena extraída que ha sido recientemente sintetizada. Después, conforme se desarrolla la cirrosis esta proteína tiende a establecerse en la matriz extracelular, en el caso del grupo que solamente recibió CCl₄, este parámetro disminuye hasta obtenerse un 54 % soluble y por ende 46 % de proteína insoluble. Sin embargo, en el grupo tratado con CBZ siempre fue mayor el porcentaje de solubilidad de la colágena, por lo que la fracción no disgregable fue siempre menor, en comparación a la proteína extraída de los grupos control y cirrótico. La comparación de la extracción de 2 y 72 horas también demuestra la gran insolubilidad de la colágena en las ratas cirróticas comparadas a las que recibieron tratamiento, puesto que la incubación durante 3 días prácticamente no logró extraer una mayor cantidad de proteína en las muestras del grupo cirrótico. También se observa una disminución de la solubilidad de ésta en este grupo después de las 10 iny; a pesar del efecto, todavía a las 20 iny. este parámetro es superior (79%) al grupo control. Además hay que considerar que estos porcentos están calculados tomando en cuenta al total de la colágena la cual esta incrementada hasta en un 154 % en el tratado y 240% en el grupo cirrótico. Estadísticamente existen diferencias entre los grupos con relación a este parámetro. Durante la obtención de las fibras de colágena se puede observar que la apariencia física de estas no

era similar, ya que en el grupo cirrótico tenían aspecto de fibrillas cortas que fácilmente sedimentaban, en comparación con el grupo bajo tratamiento simultáneo en el que las fibras semejan fibras y fibrillas largas que tendían a formar una malla. Este tipo de asociación podría deberse a la interacción con otras proteínas de matriz extracelular no estudiadas en el presente trabajo.

La insolubilidad de la colágena puede estar influenciada por la maduración de la proteína la cual posee un número mayor de enlaces entrecruzados o bien, estar asociada a otros componentes de matriz extracelular que pueden afectar la estructuración de la proteína.

Otro parámetro alterado es el que corresponde a los diferentes tipos de colágena intersticial (I, III, IV), el hígado normal de las ratas tiene una concentración de colágena de 1.83 mg/gth y de esta proteína los tipos que se presentan son I y III, principalmente. Existe una pequeña proporción de la colágena tipo IV la cual constituye parte de la membrana basal, debido a su escasa presencia en este trabajo no se pudo cuantificar en el grupo control este tipo de colágena. Como puede observarse en la tabla VII y figs. XII y XIII, en un estado fibrótico la concentración de colágena se incrementa y además la relación de los tipos se modifica, así que los tres tipos de colágena se pudieron determinar durante la inducción de la cirrosis en los dos grupos con y sin tratamiento.

Existen reportes que indican que en hígados de humanos y de ratas fibróticos sí detectan los tres tipos de colágena por métodos de hibridación in situ.⁽¹¹⁴⁾ De los resultados que se presentan en la cuantificación densitométrica (tabla VII) la digestión de dos horas con pepsina tenía la intención de poder determinar la colágena tipo IV ya que ésta es susceptible a degradación por la enzima en periodos prolongados como de 72 hrs. Como se puede observar, a este tiempo se disminuye la cantidad proporcional de colágena tipo IV por degradación de la misma e incremento en la solubilización de los otros dos tipos determinados, esto se corrobora en los grupos a las 10 y 15

inyecciones. Las digestiones a tiempos largos se realizaron para solubilizar al máximo la colágena principalmente los tipos I y III. No obstante, del grupo cirrótico solo se determinó colágena tipo IV a las 2 hrs; de incubación con pepsina, con un porcentaje no mayor de 5.62 y con la incubación a las 72 hrs, solo fue posible detectar a las 5 iny., (4.50 %) y a las 20 iny. (8.97%). A diferencia del grupo tratado simultáneamente en el cual se detectó tanto a las 2 hrs; como a las 72 hrs; tipo IV durante la inducción de cirrosis, excepto a las 5 inyecciones con 2 hrs; de incubación.

En el grupo simultáneo la determinación del tipo IV de colágena a las 15 iny., con 2 hrs., se encontró hasta de 14.42 %, tal vez ésta colágena se encuentra protegida por el resto de la matriz extracelular impidiendo su degradación y modificando por tanto, la

misma. Este mismo efecto puede observarse en la colágena tipo III la cual se eleva del mismo modo en el grupo con el medicamento. Hay que recordar que estas determinaciones fueron realizadas en la fracción soluble, la cual fue mayor en el grupo tratado simultáneamente con mebendazol. Mientras que en el grupo tratado solamente con CCl₄, después de las 10 inyecciones aproximadamente la mitad de la colágena se encuentra de forma insoluble. Por el contrario, con relación al tipo I de colágena se puede apreciar una tendencia a disminuir, en comparación con el grupo cirrótico tanto a las 10, 15 y 20 iny. de tratamiento, de tal forma que aunque las histologías muestren la presencia de cicatrices formadas principalmente por colágena en el grupo tratado con mebendazol, ésta no está en la misma concentración ni se encuentra estructurada igual al grupo cirrótico ya que las proporciones de los tipos genéticos son diferentes variando la matriz extracelular. Esta es más soluble y posiblemente más susceptible a degradación y/o reabsorción en el órgano. Este efecto probablemente sea producido por el mebendazol. Existe la hipótesis de que la irreversibilidad del estado fibrótico en el estado cirrótico pueda estar influenciada por las proporciones de los tipos de colágena ya que hay un incremento del tipo I el cual genera proteína menos laxa y por ende más rígida. Si el medicamento varió la proporción de éstos tipos de colágena la estructuración de la matriz se modificó por

consecuencia aumentado la posibilidad de la reversibilidad de la fibrosis.

Con relación a la actividad colagenolítica se realizó un estudio preliminar debido a que existe la posibilidad de que el mebendazol influya en algunas enzimas y puesto que las metaloproteasas pueden ser activadas y destruir a la colágena que se encuentre diferentemente estructurada.

Como se puede observar, en el inicio del tratamiento existe un incremento de la actividad colagenolítica, quizás debido a que en los homogenados con inhibidores se impidió que se degradara la enzima, que se inactivara por interferencia con otras enzimas ó proteínas, ó bien en el momento de la extracción pudo ser activada la colagenasa teniendo una mayor actividad. Sin embargo, solo se presenta a las 5 iny. lo cual concuerda con las observaciones histológicas en las que se presenta un infiltrado celular, en su mayoría macrófagos. Así que el mebendazol probablemente estimule a éstas células para la producción inicial de colagenasa. Finalmente, la actividad enzimática en el resto del tratamiento no mostró diferencias significativas.

Por estos estudios iniciales consideramos que aunque no podemos descartar completamente una mayor producción de colagenasa mediada por el fármaco, nuestros resultados apuntan a que la disminución de la fibrosis observada en las histologías es debida a una mayor susceptibilidad de la colágena que se encuentra en una forma

diferente en los grupos control, tratado con CBZ y los que solo recibieron CCL₄. Esta diferencia en la estructuración se traduce en una mayor solubilidad de la proteína, lo que podría representar o bien una menor estructuración en las fibras de colágena o una asociación con otras moléculas de la matriz extracelular que la hicieran más resistente a la degradación.

La proteína estudiada, la cual es el principal componente en este padecimiento, se modificó debido a la administración del medicamento probado, ya que se interfirió con la secreción de colágena y se sugiere que la biosíntesis de ella, así como los tipos I, III y IV, y por ende la matriz extracelular se alteraron.

De los datos anteriormente expuestos se concluye que:

- El mebendazol es capaz de modificar el desarrollo de la cirrosis hepática experimental inducida por tetracloruro de carbono desde el punto de vista histológico, disminuyendo la formación de fibrosis hepática.
- El medicamento usado simultáneamente en este modelo, presenta una tendencia a disminuir el contenido hepático de colágena al determinarse ésta bioquímicamente, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas, aun cuando se observa la mejoría histológica anteriormente anotada.
- El fármaco también incrementa la solubilidad de la colágena que se encuentra en las cicatrices, por lo que esto podría ser un posible mecanismo por el cual se observe una menor lesión hepática.

Tal vez debido a una mayor susceptibilidad de la colágena para ser degradada.

- El mebendazol además altera las proporciones de los diferentes tipos de colágena presentes en el hígado, lo cual repercute en la formación de una matriz extracelular distinta. Aun cuando no sabemos exactamente el significado que esto podría tener en el desarrollo de la fibrosis.

- La actividad colagenolítica presente en los homogenados hepáticos no mostró ninguna variación importante en el presente modelo.

Como se hizo referencia, el mecanismo de acción del SAME es generar glutatión evitando así la permanencia de iones ó radicales libres que puedan producir daño. Al incrementar éste antioxidante se favorece el funcionamiento hepático, pero no se observa modificación en la concentración de colágena, la cual es importante por su incremento durante la regeneración y cicatrización del parénquima. Por lo tanto se podría intentar el empleo de terapias combinadas entre fármacos que disminuyeran la fibrosis y/o estimularan la funcionalidad hepática como una alternativa favorable.

El Mebendazol puede ser una buena elección quizás combinado con otros medicamentos como el SAME ya que como puede observarse en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se está modificando la solubilidad, la cantidad, la proporción y posiblemente la

estructura de la colágena durante la administración simultánea del medicamento y la inducción de cirrosis hepática.

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Popham R.E., Schmidt W. y De Lint L. The prevention of alcoholism: epidemiological studies of the effects of government control measures. *Br. J. Addicts.* 70: 125-144. 1975
- 2.- Pequignaut G., Tuyns A.J. y Berta J.L. Ascitic cirrhosis in relation to alcohol consumption. *Int. J. Epidemiol.* 7: 113-120. 1978
- 3.- Pares A., Caballeria J., Bruguera M. y col. Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. *J. Hepatol.* 2: 33 - 42. 1986
- 4.- Marbet U.A., Branchi L., Mevry V. y Stalder G.A. Long term histological evaluation of the natural history and prognostic factors of alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 4: 364-372. 1987
- 5.- Narro J.R. Características epidemiológicas de la mortalidad por cirrosis hepática. *Salud Pública de México.* 34 (4): 378-405. 1992
- 6.- Israel Y., Orrego H., Schmidt W., y col. Trauma in cirrhosis: An indicator of the pattern of alcohol in different societies. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15 (3): 433-437. 1991
- 7.- Pohorecky L. A. Stress and alcohol interaction: An update of human research. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15 (3): 438-459. 1991
- 8.- Sorensen T. I. A. Alcohol and liver injury: dose-related or permissive effect?. *Liver.* 9: 189-197. 1989
- 9.- Geokas M.C., Lieber C.S., French S.M. y col. Ethanol, the liver and the gastrointestinal tract. *Ann. Intern. Med.* 95 (2): 198-221. 1981
- 10.- Robbins S.L.: Hígado y vías biliares en: *Patología estructural y funcional.* Ed. Interamericana S.A. 951-1019. 1975
- 11.- Lieber C.S. Alcohol, protein metabolism and liver injury. *Gastroenterology.* 79: 373-390. 1980
- 12.- Arias I.M., Jakoby W.B., Popper H., y col. The liver biology and pathobiology. 2º Ed. Raven Press-New York. cap. 67. 1988
- 13.- Tehg Y.S., Jehan S. y Lei-Injo L.E. Human alcohol dehydrogenase ADH 2 and indians of west Malaysia. *Hum. Genet.* 53: 87-90. 1979

14.- Harada S. Misawa S. Agarwal D.P. y col. Liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the Japanese: Isoenzyme variation and its possible role in alcohol intoxication. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 8-15. 1980

15.- Bosron W.F. y Li T.K. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenase and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology.* 6: 502-510. 1986

16.- Bosron W.F., Li T.K. y Vallee B.L. New molecular forms of human liver alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of ADH_{INDIANAPOLIS}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 5784-5788. 1980

17.- Lieber C.S. Alcohol and the liver: 1984 up-date. *Hepatology.* 4: 1243-1260. 1984

18.- Lieber C.S. and De Carli L.M. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 245: 2505-2512. 1970

19.- Lieber C.S. Metabolism and metabolic effects of alcohol. *Med. Clin. North. Am.* 68: 3-31. 1984

20.- Nomura F., Pi Karainen P., Jauhonen P. y col. Effect of ethanol administration on the metabolism of ethanol in baboons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227: 78-83. 1983

21.- Teng Y. S. Human liver aldehyde dehydrogenase in Chinese and Asiatic Indians: gene deletion and its possible implication in alcohol metabolism. *Biochem. Genet.* 19: 107-114. 1981

22.- Kruskal J.B., Robson S.C., Franks J.J. y col. Elevated fibrin-related and fibrinogen-related antigens in patients with liver disease. *Hepatology.* 16 (4): 920 - 923. 1992

23.- Sabesin S.M., Bertram P.D. y Freeman M.R. Lipoprotein disturbances in liver disease. In: *Advances in internal medicine*. vol. 25. Ed. Strollerman: 117-141. Year Book, New York. 1979

24.- Hernández-Muñoz R., Glender W., Diaz-Muñoz M., y col. Alterations of ATP levels and of energy parameters in the blood of alcoholic and nonalcoholic patients with liver damage. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15 (3): 500 - 503. 1991

25.- Ragland J.B., Bertram P.D. y Sabesin S.M. Identification of nascent density lipoproteins containing arginine-rich protein in human plasma. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 80: 81-88. 1978

26.- Tada N., Nestel P.J., Fidge N. y col. Abnormal apolipoprotein composition in alcoholic hepatitis. *Biochim. Biophys. Acta.* 664: 207-220. 1981

27.- Gandhi C.R. y Ross D.H. Influence of ethanol on calcium, inositol phospholipid and intracellular signalling mechanisms. *Experientia.* 45: 407 - 413. 1989

28.- Schachter D. Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. *Hepatology* 4: 140-151. 1984

29.- Oshita M., Sato N., Yoshihara H., y col. Ethanol-induced vasoconstriction causes focal hepatocellular injury in the isolated perfused rat liver. *Hepatology.* 16 (4):1007 - 1013. 1992

30.- Hirano T., Kaplowitz N., Tsukamoto H., y col. Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology.* 16 (6): 1423 - 1427. 1992

31.- Meister A. Roles and function of glutathione. *Biochemical Society Transactions.* 10: 78 - 85. 1982

32.- Diehl A M.M.D. Alcohol-related trafficking accidents. *Hepatology.* 15 (5): 964 - 966. 1992

33.- Hashieh I.A. Sylvie M. y Gerolami A. Effects of ethanol on intercellular Communication and polarization of hepatocytes in short-term culture. *Hepatology.* 15 (5): 751 - 756. 1992

34.- Bautista A.P. y Spitzer J.J. Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by in situ perfused rat liver. *Hepatology* 15 (5): 892 - 898. 1992

35.- Murray M. y Farrell G.C. Different effects of carbon tetrachloride toxicity and cirrhosis on substrate binding to rat hepatic microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 33 (4): 687 - 689. 1984

36.- Younes M. y Siegers C.P. Interrelation between lipid peroxidation and hepatotoxic events. *Biochem. Pharmacol.* 33 (13): 2001 - 2003. 1984

37.- Castillo T., Koop D.R., Kamimura S., y col. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology*. 16 (4): 992 - 996. 1992

38.- Orrego H., Blake J.E., Blendis L.M. y col. Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*. 92: 208-214. 1987

39.- Hecht Y., Levy V.G. Cirrosis en: Carli J., Ribet A., Paraf A. Cap. V. Tratado de enfermedades del aparato digestivo I. enfermedades del hígado, páncreas y vías biliares. Ed. Toray-Masson. 1979

40.- Israel Y. y Orrego H. Hypermetabolic state and hypoxic liver damage. In: Galanger M. y col. Recent developments in alcoholism. vol. 2. New York. Plenum. 119-33. 1984

41.- Rojkind M. y Martínez-Palomo A. Increase in type I and III colagens in human alcoholic liver cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73: 539 - 543. 1976

42.- Parola M., Leonarduzzi G., Biasi F., y col. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*. 16 (4): 1014 - 1021. 1992

43.- Bissell D.M., Friedman S.L., Maher J.J. y Roll F.J. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology* 11 (3): 488 - 498. 1990

44.- DiPersio C.M. Jackson D.A. y Zaret K.S. Extracellular matrix regulation of hepatic transcription factors is dependent on cell structure. *Hepatology*. 15 (6): 1207 - 1210. 1992 (ref5)

45.- Davis B.H. y Vucic A. Modulation of vitamin A metabolism during hepatic and intestinal cell culture. *Biochim. Biophys. Acta*. 1010: 318 - 324. 1989

46.- Diehl A.M., Yang S.Q., Cote P. y Wand G.S. Chronic ethanol consumption disturbs G-Protein expression and inhibits cyclic AMP-dependent signalin in regenerating rat liver. *Hepatology*. 16 (5): 1212 - 1219. 1992

47.- Reid L.M., Florino A.S., Sigal S.H. y col. Extracelular matrix gradients in the space of Disse: relevance to liver biology. *Hepatology*. 15 (6): 1198 - 1203. 1992

48.- Caterson B., Christner J.E., Baker J.R. y col. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against of connective tissue proteoglycans. Fed. Proc. 44: 386 - 393. 1985

49.- Friedman S.L. y Arthur M.J.P. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium: direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. J. Clin. Invest. 84: 1780 - 1785. 1989

50.- Choe I., Aycock R.S., Raghow R. y col. An hepatic fibrogenic factor stimulates the synthesis of types I, III and V procollagens in cultured cells. J. Biol. Chem. 262: 5408 - 5413. 1987

51.- Bissell D.M., Arenson D.M., Maher J.J. y col. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel: evidence for a functionally significant subendothelial matrixin normal rat liver. J. Clin. Invst. 79: 801 - 812. 1987

52.- Eyken P.V., Geerts A., De Bleser P., y col. Localization and cellular source of the extracellular matrix protein tenascin in normal and fibrotic rat liver. Hepatology. 15 (5): 909 - 916. 1992

53.- Vuorio E. y Crombrugge B. The family of collagen genes. Ann. Rev. Biochem. 59: 837 - 72. 1990

54.- Fleischmajer R., Perlish J.S., Burgeson R.E. y col., Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 580: 161 - 175. 1990

55.- Burgeson R.E. New collagens, new concepts. Ann. Rev. Cell. Biol. 4: 551 - 577. 1988

56.- Holt K., Bennett M. y Chojkier M., Acetaldehyde stimulates collagen and non collagen protein production by human fibroblats. Hepatology 4 (5): 843 - 848. 1984

57.- Harper E. Collagenases. Ann. Rev. Biochem. 49 : 1063 - 1078. 1980.

58.- Emonard H. y Grimaud J.A. Matrix metalloproteinases. A review. Cell. Mol. Biol. 36 (2): 131 - 153. 1990

59.- Mitchison T.J., y Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. Nature 312: 237 - 242. 1984

60.- Gelfand V.I. Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. Annu. Rev. Cell Biol. 7: 93 - 116. 1991

61.- Vallee R.B. y Shpetner H.S. Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 909 - 932. 1990

62.- Olmsted J.B. y Boris G. Microtubules. *Ann Rev. Biochem.* 42: 507 - 540. 1973

63.- Cleveland D.W., Hwo S.Y. y Kirschner M.W. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubules assembly. *J. Mol. Biol.* 116: 227 - 247. 1977

64.- Parczyk K., Haase W. y Kondor-Koch C. Microtubules are involved in the secretion of proteins at the apical cell surface of the polarized epithelial cell, madin-darby canine kidney. *J. Biol. Chem.* 264 (28): 16837 - 16846. 1989

65.- Gordon S., Werb Z. Secretion of macrophage neutral proteinase is enhanced by colchicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 872 - 876. 1976

66.- Saucan L. y Palade G.E. Differential colchicine effects on the transport of membrane and secretory proteins in rat hepatocytes in vivo: bipolar secretion of albumin. *Hepatology.* 15 (4): 714 - 721. 1992

67.- Dinarello C.A., Chusid M.J., Fauci A.S. y col. Effects of prophylactic colchicine therapy on leukocyte function in patients with familiar mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 19: 618 - 622. 1976

68.- Gutadauria M., Diamond H. y Kaplan D. Colchicine in the treatment of scleroderma. *J. Rheum.* 4: 272 - 276. 1977

69.- Harris E.D. y Hoffman G.S. Colchicine: effects upon urinary hydroxyproline excretion in patients with scleroderma. *Metabolism.* 24: 529 - 535. 1975

70.- Harris E.D. y Krane S.M. Effects of colchicine on collagen in cultures of rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 14: 669 - 684. 1971

71.- Brenner D.A. y Alcorn J.M. Therapy for hepatic fibrosis. *Seminars in Liver Disease.* 10 (1): 75 - 83. 1990

72.- Oikarinen A.I., Uitto J. y Oikarinen J. Glucocorticoid action on connective tissue: from molecular mechanisms to clinical practice. *Med. Biol.* 68: 221 - 230. 1986

73.- Tschank G., Raghunath M., Günzler V., y col. Pyridinecarboxylates, the first mechanism-derived inhibitors for prolyl 4-hydroxylase, selectively suppress cellular hydroxyprolyl biosynthesis: Decrease in interstitial collagen and Clq secretion in cell culture. *Biochem J.* 248: 625 - 633. 1987

74.- Sasaki T., Majamaa K. y Uitto J. Reduction of collagen production in keloid fibroblast cultures by ethyl-3,4-dihydroxybenzoate: Inhibition of prolyl hydroxylase activity as a mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 262: 9397 - 9403. 1987

75.- Kirk A.P., Jain S., Pocock S. y col. Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B superface antigen negative chronic active hepatitis. *Gut.* 21: 78 - 83. 1980

76.- Rojkind M. Inhibition of liver fibrosis by L-azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. *J. Clin. Invest.* 52: 2451 - 2456. 1973

77.- Zaragoza E.J., Ryhänen L., Oikarinen A.I., y col. Inhibition of type II procollagen conversion by lysine derivatives and related compounds. Mapping of the inhibitory structural features. *Biochem. Pharmacol.* 35: 532 - 535. 1986

78.- Ruwart R.A. M.J. The effects of prostaglandins on the digestive system. In: Lee JB(Ed): *Prostaglandins*. New York, Elsevier/North Holland. 1982

79.- Davis B.H. Transforming growth factor beta responsiveness is modulated by the extracellular collagen matrix during hepatic Ito cell culture. *J. Cell. Physiol.* 136: 547 - 553. 1988

80.- Dumont J.M., Maignan M.F., Janin B., y col. Effects of malotilate on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in the rat. *J. Hepatol.* 3: 260 - 268. 1986

81.- Hirayana C. Kanai K. Effect of malotilate on serum albumin levels in patients with liver cirrhosis with special reference to the adjunctive therapeutic effect on albumin infusion. In: Oda T. Tygstrup N (Eds): *Hepatotropic Agents Malotilate: Proceedings of a symposium on malotilate held at the 7th World Congress of Gastroenterology*. Amsterdam, Excerpta Medica. 1983

82.- Solis-Herruzo J.A., Brenner D.A. y Chojkier M. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263: 5841 - 5845. 1988

83.- Corrales F., Cabrero C., Pajares M.A. y col. Inactivation and dissociation of S-adenosylmethionine synthetase by modification of sulfhydryl groups and its possible occurrence in cirrhosis. *Hepatology*. 11 (2):216- 222. 1990

84.- Corrales F., Gimenez A., Alvarez L., y col. S-adenosylmethionine treatment prevents carbon tetrachloride-induced S-adenosylmethionine synthetase inactivation and attenuates liver injury. *Hepatology*. 16 (4): 1022 - 1027. 1992

85.- Friedel H.A., Goa K.L. y Benfield P. S-adenosyl-L-methionine a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism. *Drugs*. 38 (3): 389-416. 1989

86.- Whittaker S.G. y Faustman E.M. Effects of benzimidazole analogs on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Tox. Appl. Pharm.* 113 : 144-151. 1992

87.- Russell G.J., Gill J.H. y Lacey E. Binding of (3 H) benzimidazole carbamates to mammalian brain tubulin and the mechanism of selective toxicity of the benzimidazole anthelmintics. *Biochim. Pharmacol.* 43 (5): 1095-1100. 1992

88.- Van Den Bossche, H. The molecular basic of anthelmintic action. In: *Biochemistry of parasites and host-parasite relationships*. New York. Elsevier-North Holland Publishings Com. 533 - 572. 1976.

88.- Jain M.K., Gupta S., Katiyar J.C. y col. Alterations in metabolic activity of *Cysticercus fasciolaris* on some anthelmintic treatments. *Indian. J. Exp. Biol. (India)*. 30 (4): 320 - 323. 1992

90.- Prieto J.G., Justel A., Del Estal J.L. y col. Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 C (3): 397 - 400. 1991

91.- Feng J.J., Xiao S.H., Guo H.F., y col. Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on alkaline phosphatase, acid phosphatase, and adenosine triphosphatase of *Echinococcus granulosus* cysts harbored in mice. *Chung. Kuo Yao Li Hsueh Pao (China)*. 13 (6): 497 - 501. 1992

92.- Morgan U.M., Reynoldson J.A. y Thompson C.A. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp in vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37 (2): 328 - 331. 1993

93.- Gill J. H y Lacey E. The kinetic of mebendazole binding to Haemonchus contortustubulin. Int. J. Paras. 22 (7): 939 - 946. 1992.

94.- Bughio N.I., Faubert G.M. y Prichard R.K. Identification of tubulin isoforms in different tissues of Ascaris suum using anti-tubulin monoclonal antibodies. Int. J. Parasitol. 21 (8): 913 - 918. 1991

95.- Russell G.J. y Lacey E. Temperature dependent binding of mebendazole to tubulin in benzimidazole-susceptible and resistant strains of Trichostrongylus colubriformis and Caenorhabditis elegans. Int. J. Parasitol. 21 (8): 927 - 934. 1991

96.- Gottman H., Kroker R. y Ungemach F.R. Investigacions on the biotransformation of mebendazole using an isolated perfused rat gut system. Xenobiotica. 21 (11): 1431 - 1439. 1991

97.- Rippmann K., Dietrich M. y Kern P. Long-term therapy of cystic liver echinococcosis with mebendazole. Med. Klin. 87 (7): 350. - 354. 1992

98.- Gupta S., Jain M.K., Katiyar J.C. y Maitra S.C. Substituted methyl benzimidazole carbamate: efficacy against experimental cysticercosis. Ann. Trop. Med. Parasitol. 86 (1): 51 - 57. 1992

99.- Toppare M.F., Gocmen A. y Kiper N. Plasma levels of mebendazole in children with hydatid disease. Ann. Trop. Paediatr. 12 (4): 441 - 443. 1992

100.- Weidolf L., Karlsson K.E., y Nilsson I. A metabolic rout of omeprazole involving conjugation with glutathione identified in the rat. Drug Metab. Dispos. Biol Fate Chem. 20 (2): 262 - 267. 1992

101.- Van Den Bossche H. Biochemical effects of the anthelmintic-drug mebendazole. In. comparative biochemistry of parasites. (Van Den Bossche H. ed.) Academic Press. Inc. New York. 139 - 157. 1972.

102.- Rivas-Alcalá A.R. Greene, B.M. y Taylor H.R. 12 Month follow-up of mebendazole therapy for onchocerciasis. Lance. Nov. 7: 1043. 1981

103.- Morales B. y Diaz de LeónL. La administración crónica de mebendazole y sus efectos en diferentes órganos corporales de la rata. Tesis para obtener el título de Bióloga. Fac. Ciencias. Universidad Nacional Autonoma de México. 1984.

104.- Santamaría P. y Díaz de León L. Efecto del mebendazole sobre la síntesis de colágena en la cirrosis hepática experimental. Tesis para obtener el título de Bióloga. Fac. Ciencias. Esc. de Biología, Universidad Veracruzana. 1984.

106.- Páez A y Díaz de León L. Mebendazol y cirrosis hepática experimental. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Esc. Nal. Est. Prof. Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. 1986.

107.- Soto H., Massó F. y Díaz de León L. The effects of the Mebendazole on collagen biosynthesis and secretion in human derived fibroblast cultures. Biochem. Pharmacol. Enviado.

108.- Rosas LP. y Díaz de León L. Efecto del carbamato de benzimidazol (CBZ) sobre la liberación de colagenasa y cooperatividad inmunológica de células mononucleares y fibroblastos. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Esc. Nal. Est. Prof. Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. 1988.

109.- Díaz de León L., Massó F. y Ocampo O. Factores involucrados en el daño hepático causado por alcohol. En: Alcoholismo Visión Integral. Ed. Trillas. 189 - 203. 1986.

110.- Woessner J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportion of this iminoacid. Arch. Biochem. Biophys. 93: 440 - 447. 1961.

111.- Laemmli U.K., Nature 227: 680. 1970.

112.- Lefevere M.F., Slegers G.A. y Claeys A.E. Evaluation of a rapid, sensitive and specific assay for the determination of collagenolytic activity in biological sample. Clin. Chimica. Acta. 92: 167 - 175. 1979.

113.- Bartlett M.S., Edlind T.D., Durkin M.M., y col. Antimicrotubule benzimidazoles inhibit in vitro growth of Pneumocystis carinii. Antimicrob. Agents Chemother. April. 36 (4): 779-82. 1992.

114.- Clement B., Rescan P.Y., Baffet G., y col. Hepatocytes may produce laminin in fibrotic liver in a primary culture. Hepatology 8: 794 - 803. 1988.