



Leg. 11

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

LA ADMINISTRACION CRONICA DE MEBENDAZOLE Y SUS
EFECTOS EN DIFERENTES ORGANOS CORPORALES DE
LA RATA.

T E S I S

Que para obtener el Título de
B I O L O G O
P r e s e n t a

BLANCA LILIA MORALES SANCHEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Pag.
Introducción y Antecedentes -----	1
Objetivos -----	50
Materiales y Métodos -----	54
Resultados -----	64
Discusión y Conclusiones -----	72
Bibliografía -----	78

INTRODUCCION

El mebendazole es un fármaco que ha sido utilizado como antihelmínico de amplio espectro en tratamientos subagudos (1), aunque no ha sido utilizado en tratamientos crónicos en el hombre. La droga está diseñada por la naturaleza de su uso, para una absorción intestinal pobre que clínicamente representa una ventaja terapéutica, minimizando los efectos secundarios que pudieran presentarse (1,2,5,6). Otra de las características del mebendazole y que es relevante para los propósitos de este estudio, es el mecanismo de acción que presenta este compuesto y que corresponde al tipo de las drogas antimicrotubulares como: colchicina, vinblastina, griseofulvina y podofilotoxina entre otras (1,3,4,7,8).

Para ubicar el contexto del presente trabajo inicialmente se hará referencia a la colchicina que es un fármaco que está relacionado directamente al posible uso de mebendazole en tratamientos crónicos de enfermedades fibrosantes.

COLCHICINA

La colchicina, es un alcaloide natural que se obtiene de la planta Colchicum autumnale (Fig. 1). Contiene 3 anillos en su molécula: un anillo aromático con tres grupos metoxilo, otro anillo con un aminoácido primario acetilado y un anillo tropleno, con un grupo metoxilo. Por hidrólisis par-

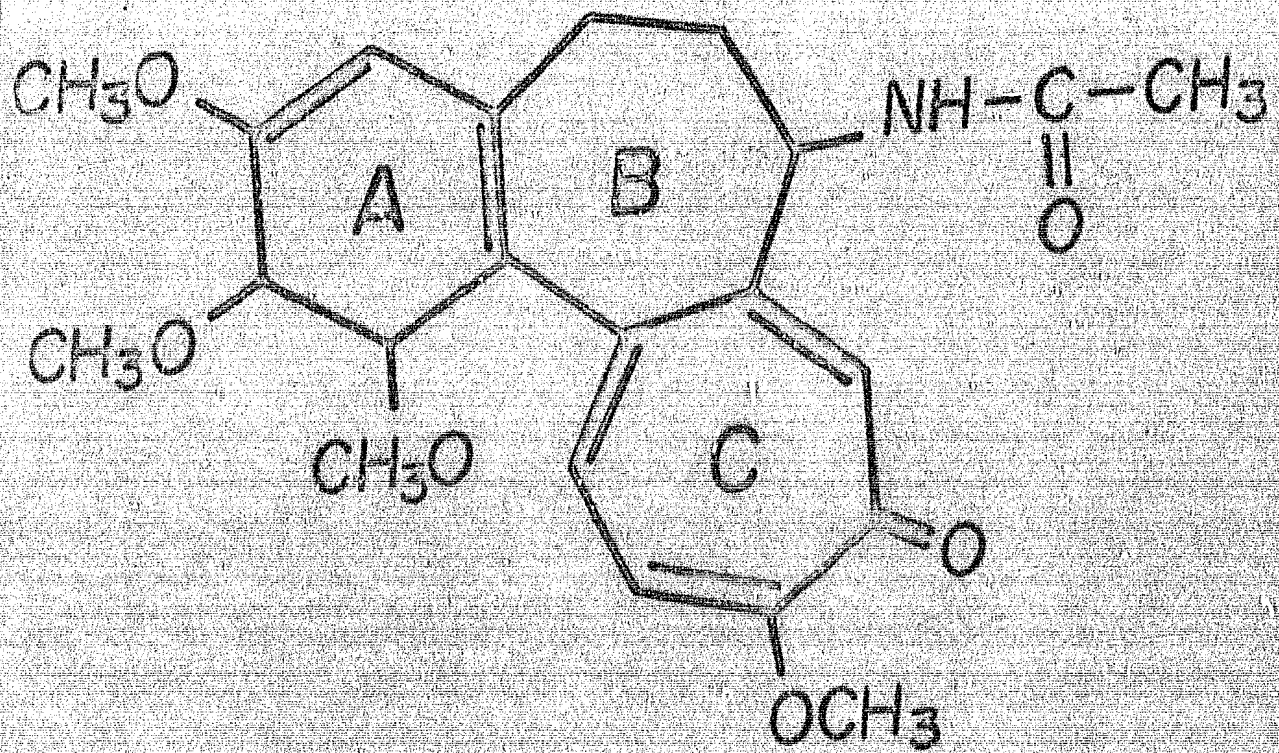


Fig. 1. Fórmula Estructural de la Colchicina

cial de la colchicina se pierde el grupo metilo en la posición 10. Con una mayor hidrólisis se elimina el grupo acetilado y se obtiene el ácido trimetil-colchicina.

La colchicina es altamente fotosensible y cuando se expone a la luz ultravioleta se forma un número de esteroisómeros denominados lumicolchicinas que han perdido su actividad antimicrotubular (8). La colchicina produce un tipo característico de inhibición mitótica, obteniéndose una condensación de cromosomas en forma desarreglada y anormal en el huso acromático de la metafase durante la mitosis (8,9). La actividad antimicrotubular de la colchicina, así como muchos otros efectos biológicos tales como: alteración de la forma celular e interacción con el movimiento de varios tipos celulares, son debidos a su interferencia con el ensamblaje de microtúbulos. La inhibición de la formación de microtúbulos se explica por la afinidad de unión a tubulina que en forma de dímeros proteicos es el elemento estructural que componen los microtúbulos.

MICROTUBULOS

A continuación se señalan las características y funciones de los microtúbulos en relación a los estudios realizados con colchicina. El microtúbulo es un componente subcelular encontrado únicamente en células eucariontes. Su estructura se define como la de un cilindro recto, con un diámetro de $240 \pm 20 \text{ \AA}$ y con una columna de 140 \AA en el corazón del tubo.

La pared del cilindro presenta un grosor de 50 Å y se ha observado que se divide en distintos protofilamentos compuestos de subunidades globulares. Estas características son aplicables a la mayoría de los microtúbulos existentes, aunque se han reportado variaciones en las dimensiones de -- distintos microtúbulos, encontrándose diámetros de 180-340 Å en algunos casos. En el lumen de túbulos en neuronas, células sanguíneas y flagelos se han observado elementos centrales densos. En el aparato mitótico se han encontrado túbulos asociados a puente de entrecruzamiento y brazos.

DISTRIBUCION

Se les asoció después de los años 50 con la conformación de estructuras intracelulares (al introducir al gluteraldehído como fijador) y se postuló su importancia funcional entre la gran variedad de los fenómenos de células eucarióticas. Los microtúbulos presentan un arreglo observado universalmente de 9 + 2 en cilios, flagelos, en algunas colas de espermias, así como también en axones móviles y aparatos orales de varios protozoarios (8). Los centriolos y cuerpos basales tienen también este arreglo característico. Así mismo, los encontramos formando la trama fibrosa del huso mitótico y meiótico. Se han observado en dendritas y neuritas de células neuronales y también en extensiones citoplasmáticas de varias células de tejidos en cultivo.

FUNCION

Los microtúbulos están asociados a diversas funciones:

- I) Movimiento de los cromosomas en la división celular.- Se ha determinado la asociación específica de los microtúbulos con los cromosomas durante la mitosis y meiosis en numerosos estudios. El bloqueo de la mitosis por colchicina fué observada en los primeros estudios (8, 9), entonces se infirió que la irrupción del movimiento de los cromosomas era causado por la disolución de los microtúbulos. Experimentos similares usando bajas temperaturas y luz ultravioleta para destruir los microtúbulos muestran resultados similares, es decir, un bloqueo de la mitosis.

- II) Organización intracelular y movimiento de material.- El bloqueo de la formación de microtúbulos por tratamientos de disrupción del ensamblaje de microtúbulos, revelaron una inhibición del transporte axoplásmico en neuronas, en el movimiento saltatorio de partículas en cultivo de células (9), en los gránulos de melanina en melanocitos (8), en los endosomas en macrófagos y ribosomas en ovarios telotróficos. Se observaron también bloqueos en la liberación de histamina e insulina después del tratamiento con colchicina, lo que sugirió -- que los microtúbulos estaban relacionados con la movilización de mate

rial de secreción.

III) Desarrollo y mantenimiento de la forma celular.- Numerosos estudios han indicado que los microtúbulos desempeñan un papel importante en la conformación del citoesqueleto. Se demostró que las células elipsoidales se transformaron en células más esféricas, cuando se emplearon colchicina y urea a bajas presiones y temperaturas para destruir los microtúbulos en explantes de nervios y ganglios o en células neuroblastomas, debido a que se depolimerizaron los microtúbulos (9).

Utilizando colchicina solamente, se observó un bloqueo en la morfogénesis de la forma celular durante el desarrollo del mesénquima primario en embriones de Arbacia. Además, colchicina y vinblastina, inhiben la elongación de los tejidos en desarrollo y extensiones de procesos neuronales. El AMP cíclico induce la transformación de varias líneas celulares en formas elongadas. Estas drogas inhiben también los cambios de formas celulares asociados con la neurulación y espermatogénesis. Se ha reportado que el isopropilfenil-carbamato funciona como un inhibidor del huso mitótico específico para plantas y que también promueve la elongación de células germinativas en desarrollo (8,9).

IV) Movilidad celular.- Los microtúbulos se observan como ya se mencionó

anteriormente en cilios, flagelos y colas de espermias, donde generan una fuerza propulsora. Este proceso requiere de energía en forma de ATP, el cual puede ser hidrolizado por la ATPasa que se encuentra asociada con la pared externa microtubular. Los microtúbulos que se han observado en el citoplasma de células en cultivo de tejidos, se han relacionado con la movilidad celular. Se demostró que la colchicina interfiere con la formación de los microtúbulos citoplasmáticos ya que se observó una interrupción de la orientación del movimiento de las células (8,9).

MECANISMO DE ACCION DE COLCHICINA EN EL ENSAMBLAJE MICROTUBULAR

La colchicina inhibe la polimerización de microtúbulos "in vitro" e "in vivo", observándose este efecto a concentraciones del fármaco que son menores a las concentraciones de tubulina libre. Margolis y Wilson (10) han demostrado que bajo ciertas condiciones la colchicina inhibe la polimerización de los microtúbulos a través de la adición de complejos tubulina-colchicina pero no de colchicina libre, a las terminales microtubulares de ensamblaje.

Evidencias indirectas han sugerido que los sitios de unión de colchicina a tubulina no se localizan en las regiones de contacto entre los dímeros de tubulina en el microtúbulo. De aquí que la inhibición del ensam

blaje producido por la incorporación de los complejos tubulina-colchicina en los microtúbulos, puede no deberse a un impedimento estérico directo - producido por la colchicina. Es probable que la unión de tubulina a colchicina induzca o estabilice un isómero conformacional de las proteínas - que inhiba el ensamblaje. De esta manera, la incorporación de los complejos tubulina-colchicina en los microtúbulos pueden perturbar el arreglo - regular geométrico de los microtúbulos y por lo tanto perderse la afinidad de las terminales para las adiciones subsecuentes de tubulina libre - (10).

En el estado de polimerización, la tubulina contiene 2 moléculas de GTP/mol de proteína. De estas dos moléculas solo una es intercambiable y la otra se pierde únicamente por desnaturalización de la proteína. Actualmente se sabe que el GTP intercambiable, es hidrolizado durante la polimerización de tubulina. Reportes de estudios de esta actividad han revelado que la colchicina estimula la actividad de GTPasa de la proteína. Estudios posteriores demostraron que la podofilotoxina no solamente inhibe la polimerización de microtúbulos, sino que también inhibe la unión de colchicina a tubulina.

Los efectos determinados en ciertas drogas antimicrotubulares en relación a la actividad de GTPasa de tubulina; demostraron que colchicina, vinblastina y podofilotoxina estimulan la actividad de la GTPasa. Se probó

también el Nocodazole, una droga que compite con colchicina en la unión a tubulina, donde se observó una actividad marcadamente superior de la hidrólisis de GTP que la observada para la colchicina. La colchicina y la podofilotoxina presentaron un anillo de trimetoxibenceno, una estructura análoga que se determinó también en el Nocodazole. En base a estas observaciones se puede concluir que el anillo de trimetoxibenceno en la colchicina y las drogas probadas, es el agente principal responsable de la estimulación de la actividad de GTPasa en la tubulina (23).

De los estudios señalados anteriormente podemos concluir, que la colchicina está relacionada en una gran variedad de eventos en la fisiología celular, en relación a su mecanismo de acción antimicrotubular.

A continuación se enlistan los efectos farmacológicos atribuidos a colchicina:

I Antiinflamatorio:

- a) Estabiliza membranas lisosomales
- b) Inhibe la movilización y liberación extracelular de enzimas de leucocitos humanos durante la fagocitosis.
- c) Inhibe la liberación de histamina en los leucocitos
- d) Inhibe la liberación de kinina del plasma "in vitro"

- e) Inhibe la movilización, adherencia y quimiotaxis de los neutrófilos
- f) Inhibe la citotoxicidad mediada por neutrófilos y dependiente de anticuerpos
- g) Inhibe el recambio de inositol en linfocitos

II Antimitótico:

- h) Interfiere con la metafase en la división celular

III Antimicrotubular:

- i) Interfiere con la polimerización de tubulina
- j) Inhibe el movimiento transcelular de proteínas de exportación

IV Efectos sobre la membrana plasmática de la célula:

- k) Modifica el sistema de adenil-ciclase en el hígado
- l) Modifica los niveles de AMP cíclico en leucocitos
- m) Aumenta los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina

V Otros efectos:

- n) Aumenta los niveles de glucógeno hepático
- o) Disminuye la prolina plasmática y el lactato sanguíneo en pacientes cirróticos alcohólicos
- p) Disminuye la proteinuria en el síndrome nefrótico
- q) Aumenta la pigmentación inducida por la hormona estimulante de melanocitos
- r) Inhibe la formación de amiloide

VI Efectos antifibrogénicos

Se ha demostrado que la colchicina tiene efectos también sobre el metabolismo de la colágena ya que interfiere con el movimiento transcelular de la misma (11) y aumenta la producción de colagenasa *in vitro* (12).

UTILIZACION DE LA COLCHICINA EN CLINICA Y SU RELACION CON LA ADMINISTRACION CRONICA DE MEBENDAZOLE

La colchicina ha sido utilizada en el humano para el tratamiento de diversas enfermedades como en el ataque agudo de gota, donde es usada en la terapia profiláctica actualmente (16). Estudios experimentales en animales a los que se indujo cirrosis hepática con tetracloruro de carbono y se tra-

taron posteriormente con colchicina mostraron una mejoría en el funcionamiento hepático y una disminución de la fibrosis (13). Posteriormente en estudios realizados en pacientes con cirrosis hepática alcohólica a los que se les administró colchicina durante 12 y 42 meses se observó una disminución en algunos de los signos clínicos característicos de esta enfermedad (14), aunque los episodios de sangrado de las varices esofágicas fueron persistentes. Los niveles de sobrevivencia no alcanzaron significancia y la conclusión de este estudio en pacientes revela que el uso de cualquier droga antifibrótica (ver más adelante fibrosis y enfermedades fibrosantes), debe permanecer actualmente bajo estudios controlados. La valoración del efecto de colchicina en la cirrosis hepática alcohólica está aún en discusión, por los resultados obtenidos y por los efectos secundarios derivados del uso de dosis elevadas de la droga que requieren de un estudio más profundo (14).

Estudios realizados experimentalmente con cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono en ratas Sprague-Dawley durante 3, 7 y 11 semanas tratados con mebendazole en la dieta mostraron una reducción de la fibrosis producida por CCl_4 la cual se verificó bioquímica e histológicamente. También se observó que un grupo de 11 semanas con CCl_4 mostró una supervivencia del 50% al ser tratados con mebendazole durante la agresión (45).

El presente trabajo pretende valorar el efecto de la administración

crónica de mebendazole en ratas normales, ya que los estudios realizados previamente en nuestro grupo de trabajo plantean nuevas posibilidades para el tratamiento clínico de enfermedades fibrosantes como la cirrosis hepática, fibrosis pulmonar y escleroderma entre otras, mediante la utilización crónica de mebendazole.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE ALGUNOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LOS BENZIMIDAZOLES

Los compuestos del benzimidazole son importantes tanto clínicamente como en la agricultura; se tienen fármacos dentro de esta familia como Benomyl (metil 1-butil carbamoil benzimidazole, 2 il carbamato) y thiabendazole que son fungicidas; el Albendazole, cambendazole, febendazole, mebendazole, oxifendazole, parbendazole y thiabendazole que son antihelmínticos; oncodazole y nocodazole que inicialmente se utilizaron como agentes antineoplásicos (7). Levamisole del que actualmente se han evaluado efectos importantes en inmunoterapia (15).

El principal componente que ha mostrado su afinidad por los microtúbulos es el carbamato de benzimidazole. El benzimidazole por si mismo no posee ninguna actividad antimicrotubular, pero con la inclusión de grupos substituyentes colaterales el compuesto incrementa su potencia considerablemente.

Esta similitud del componente principal en las estructuras de estos compuestos, sugieren un mecanismo de acción común (7,24) depolimerizando la estructura funcional microtubular. Benomyl y Carbendazin interfieren en la mitosis de células de hongos y mamíferos, el oncodazole interactúa con los microtúbulos "in vivo" o "in vitro" inhibiendo el ensamblaje de tubulina cuando interfiere en los sitios de unión que son sensibles también a colchicina. El nocodazole (methyl-5 2 thunilcarbonyl) 1-H-benzimidazole-2 il carbamato) fué inicialmente analizado por sus propiedades anti-cáncer. Recientemente se ha reportado que este compuesto tiene propiedades similares en la producción de cultivos sincrónicos en células de mamíferos (24).

La técnica de microscopía electrónica ha mostrado evidencias indicando que los microtúbulos son los agentes directos causales de la acumulación de las vesículas secretoras dentro del hepatocito y se ha asumido que contienen en ellas los productos de secreción. Varios autores han documentado recientemente los efectos de colchicina en la secreción hepática de proteínas y de los componentes lipoproteicos de muy baja densidad que han sido inhibidos con $10 \mu\text{M}$ de colchicina y cuantificados con los parámetros de albúmina y triglicérol. Cuando colchicina, vinblastina y vincristina son probados en la inhibición de estos compuestos se ha observado que se pueden recobrar la función secretora, extrayendo las células bloqueadas. Señalándose que este bloqueo ocurre a un nivel secretorio y no

a un nivel sistémico.

Se evaluaron los efectos del carbamato de benzimidazole midiéndose los productos celulares y secretados. Se probó al nocodazole y parbendazole conjuntamente con colchicina, a las mismas concentraciones. Los resultados obtenidos fueron similares en los efectos secretores de proteínas y triglicérol; ninguno de los productos de síntesis o de integridad de los metabolitos (juzgados por los niveles de ATP celular) fueron afectados. Esto indica que el bloqueo ocurre únicamente en el patrón de secreción. Se encontró en este estudio que la actividad de los benzimidazoles era distinta siendo más potente nocodazole y luego parbendazole y por último el metil-benzimidazole-carbamato. Cuando se suprimió la administración de las drogas a los hepatocitos se observó que la función secretora se restablecía, 2 ó 3 horas después.

Estos estudios revelan que el mecanismo de acción de los carbamatos es como el que se describe para las drogas específicas de acción antimicrotubular. También se observó que otro grupo de compuestos que son químicamente diferentes a colchicina y vinblastina pueden inhibir la secreción hepática de una manera similar a la que se asocia a estas drogas (24).

Otro compuesto que llama la atención dentro de la familia de los benzimidazoles es el levamisole (Fig. 2) isómero del tetramisole (2,3,5,

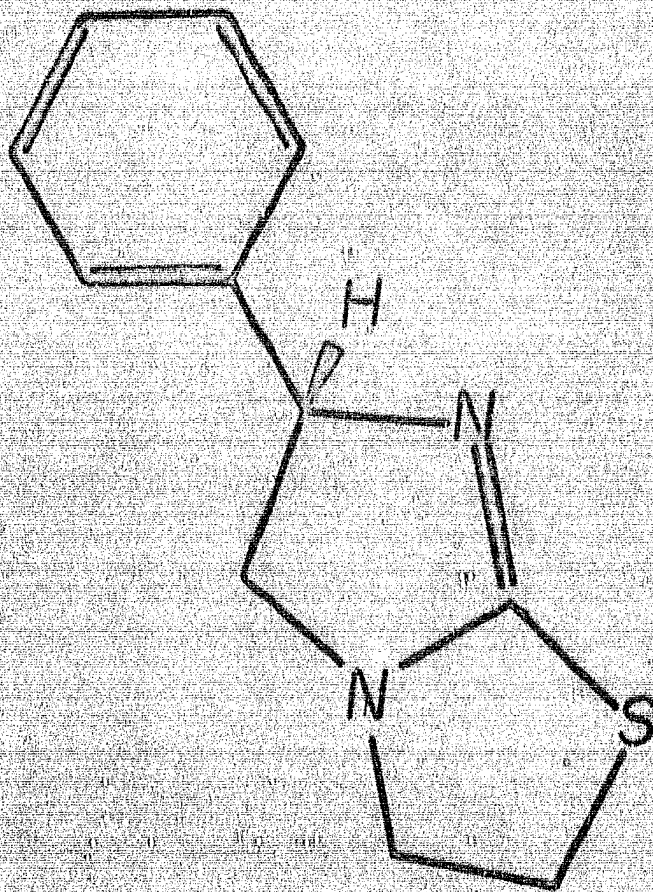


Fig. 2. Fórmula Estructural del Levamisol

6 tetrahidro 6-fendimidazole 2,1-b thiazole) utilizado como un antihelmínico potente de amplio espectro introducido en 1966 por Farmaceutica Janssen, Belgica (22). Renoux y Renoux en 1971 demostraron que levamisole podía potenciar ciertos aspectos inmunitarios en ratones. Se ha demostrado que el fármaco es capaz de restaurar las funciones que afectan a las células en la respuesta inmune. El mecanismo de acción que se propone para el levamisole es el restaurador del desbalance mediante la activación de los macrófagos y de las células T. supresoras. Este efecto del fármaco ha reportado beneficios clínicos en artritis reumatoide y en ciertas infecciones crónicas y recurrentes. También se han observado efectos benéficos en el tratamiento de pacientes con cáncer (15).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL MEBENDAZOLE

El mebendazole fué aprobado como un antihelmíntico de amplio espectro por la Food and Drug Administration (F.D.A.) en 1974 para su uso en el tratamiento de Ascaris lumbricoides (5,18), Enterobius vermicularis y Trichuris trichura. Se demostró también que el compuesto actúa en infecciones causadas por céstodos como: Echinococcus granulosus y Echinococcus multilocularis (1).

El fármaco se ha distribuido en numerosos países alrededor del mundo. Actualmente el mebendazole se conoce con diferentes nombres; Vermox,

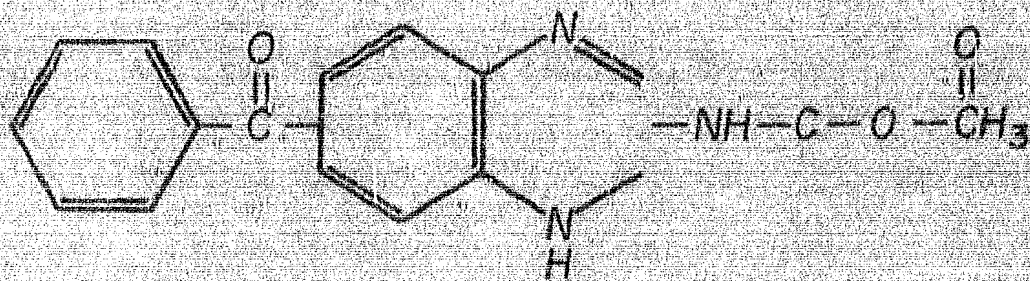
Nemasole, Mebutar, Pantelmin, Sirben y Vermirax entre otros. El mebendazole como miembro de la familia de los benzimidazoles es el metil N - -
 |5(6) benzoil 1,2 benzimidazole| carbamato y su fórmula empírica es - -
 $C_{12}H_{13}N_3O_3$, siendo estructuralmente semejante al tiahendazole; su peso molecular es 295.29 (Fig. 3).

El compuesto es un polvo amorfo de coloración blanquecina a ligeramente amarillenta; su punto de fusión es de 300°C. Es fácilmente soluble en ácido fórmico y soluble en benzaldehído y dimetil sulfoxido y muy poco soluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos. No es higroscópico y es estable en el aire (5).

MECANISMO DE ACCION

El mebendazole ha producido "in vivo" e "in vitro" un bloqueo selectivo e irreversible en la captación de glucosa de los nematodos parásitos adultos, en céstodos y en sus larvas moradoras de tejidos (17). La inhibición de la absorción de glucosa refleja un decremento del almacén de glucógeno del parásito. La falta de glucógeno da por resultado una disminución en la formación de trifosfato de adenosina, requerido para la reproducción y sobrevivencia del helminto. Sin embargo, el mebendazole no afectó los niveles de glucosa sanguínea en el huésped, incluyendo al hombre (17,18,19).

MEBENDAZOLE



TIABENDAZOLE

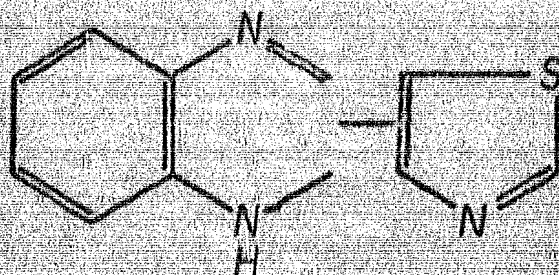


Fig. 3. Fórmula Estructural del Mebendazole y Tiabendazole

Reportes más detallados de los efectos de mebendazolé revelan una degradación de la morfología ultraestructural del helminto. Los cambios observados por medio de microscopía electrónica después de la administración de mebendazole muestran: efectos degenerativos de la droga en el sistema microtubular citoplasmático de las células del epitelio intestinal (3) provocando un bloqueo en el transporte de los gránulos secretorios del aparato de Golgi al citoplasma.

La excesiva acumulación de los gránulos secretorios, resultado del bloqueo, convierte al citoplasma en un citoplasma autolítico liberando enzimas proteolíticas e hidrolíticas y produciéndose la degeneración de las células del epitelio intestinal. Por lo que se ven impedidas las funciones de absorción y digestión con la consiguiente muerte del parásito (1,3,17,18,19).

En el tegumento de céstodos y en sus larvas se observaron también resultados similares después del tratamiento con mebendazole que coinciden en la desaparición de los microtúbulos citoplásmicos y bloqueo del movimiento de sustancias del aparato de Golgi. Se producen cambios degenerativos de la pseudoprologita y escólex en las larvas, y posteriormente muerte del cisticerco (4,17). En Hymenolepis nana se observan los mismos efectos degenerativos y que se piensa son causados por la droga (4).

Aunque no se ha observado ninguna diferencia estructural, química o morfológica entre los microtúbulos de parásitos (helminths y céstodos) y de vertebrados superiores, las diferencias de sensibilidad de la droga entre microtúbulos de parásitos y hospederos no es clara aún. Por otro lado se postula que puede deberse a las diferencias en el metabolismo de la droga y/o a la diferencia de susceptibilidad del mecanismo regulador responsable de polimerizar y depolimerizar los microtúbulos (3,7,23).

Experimentos realizados con proteínas microtubulares (tubulina) purificadas de cerebro de bovino, muestran que la formación del complejo tubulina-colchicina es de 1:1. La inclusión de mebendazole en incubaciones similares disminuye la extensión de las uniones de colchicina a tubulina. Estos resultados fueron más marcados aún en presencia de concentraciones más bajas de colchicina, sugiriendo que el mebendazole compete con colchicina por los sitios de unión a tubulina (7). Este comportamiento fue confirmado también por H. Van der Bossche en 1980 con tubulina purificada de Ascaris suum y tubulina de cerebro de cerdo (20,21), indicando que mebendazole y colchicina se unen a un mismo sitio u otro cercano estructuralmente en las subunidades proteicas microtubulares.

FARMACOCINETICA

Brugman y colaboradores (5) reportaron inicialmente que el mebenda-

zole presenta una absorción mínima después de la ingestión de una sola dosis de 0.1 mg/kg de peso. Se evaluó la incorporación del fármaco marcado con C^{14} en tres voluntarios sanos y se encontró que solo el 5% de la dosis oral era absorbida determinando la radiactividad excretada en la orina. La radiactividad restante fué excretada sin cambios en las heces. Los niveles máximos de la concentración en plasma de mebendazole y sus metabolitos derivados se evaluaron en 0.5% o menos de la radiactividad total administrada. Los niveles máximos se alcanzaron durante las dos y cuatro hrs, la mayor parte del compuesto absorbido se encontró sin cambios (0.2% de la radioactividad) y 1.6% de la radioactividad se encontró como 6-amino-5-(6)-benzimidazolil-fenil cetona en la orina, durante las primeras 24 a 48 hrs. La radioactividad restante correspondió a un metabolito no identificado.

Wilson y colaboradores (25) usando un ensayo más específico, estudiaron las concentraciones de mebendazole en el plasma de dos pacientes adultos que recibieron dosis altas de mebendazole (40 mg/kg de peso corporal) en terapia oral para quisto hidatídico. Se evaluaron las concentraciones, obteniéndose los rangos de 0.012 a 0.040 $\mu\text{g/ml}$ después de la ingestión de una dosis del fármaco de 1 gr. Las concentraciones máximas fueron 0.080 $\mu\text{g/ml}$ detectadas media hora y 2 hrs. después de la administración. Aunque el estudio no midió las concentraciones de mebendazole en heces y orina; los datos apoyan la conclusión de que mebendazole se absorbe pobremente.

por la vía oral.

Estudios similares en niños de 3 a 6 años que ingirieron tabletas masticables de mebendazole en dosis de 100 mg demostraron que menos del 10% de la droga fué absorbida. Los niveles plasmáticos de la droga nunca excedieron de 0,030 µg/ml del fármaco sin cambios y 0,090 µg/ml del principal metabolito 2-amino-5-(6)-benzimidazolil fenilcetona. La absorción intestinal pobre de mebendazole es una de las ventajas terapéuticas del fármaco en el tratamiento de helmintiasis. Esta característica del fármaco permite disminuir los efectos colaterales indeseables en la ingestión de dosis altas de la droga.

EFFECTOS COLATERALES DE MEBENDAZOLE

Los estudios de toxicología en animales han mostrado una tolerancia buena del fármaco cuando se han administrado dosis inclusive altas como ha sido el caso del quiste hidatídico en ratones (50 mg/kg/día) sin presentarse efectos secundarios (26). Estos resultados se verificaron con las experiencias de Brugman y colaboradores, quienes reportaron no haber observado efectos adversos en 702 pacientes tratados con mebendazole. Las observaciones de la ausencia de efectos colaterales han sido confirmados en casi todos los tratamientos clínicos en que se ha utilizado. Se han reportado sin embargo, casos aislados con síntomas de diarrea y cólicos -

abdominales en niños con gran número de parásitos durante la expulsión de A. lumbricoides (27). Otro caso reportado de un efecto desconocido del me**ben**dazole ha sido el de leucopenia asociada con el tratamiento de me**ben**dazole en el quiste hidatídico y que señala puede ser una reacción de hiper**sen**sibilidad del paciente a la droga (28) y cuando se suspende el trata**mi**ento los trastornos desaparecen entre 24 y 48 hrs.

Otros casos del tratamiento del quiste hidatídico hepático con me**ben**dazole en 2 pacientes durante 9 meses a dosis de 400 mg/8 hrs durante 21 días y suspensión del tratamiento (29), mostraron una disminución de las imágenes quísticas y de la IgE asociada a dicha infección. En este es**tu**dio no se observó ningún efecto secundario y una buena tolerancia del fármaco. Reportes de investigación sobre la posible terapéutica de Me**ben**dazole en 40 mexicanos del sureste de Chiapas reporta efectos prometedores en este campo donde se siguió el tratamiento hasta 12 meses con dosis de 2 g de mebendazole por día, reportandose que no hubieron efectos secunda**ri**os durante el tratamiento (30).

LA COLAGENA Y LOS TEJIDOS CONJUNTIVOS

La colágena es una proteína estructural ampliamente distribuida en todo el reino animal y en los vertebrados principalmente. El análisis químico ha revelado que esta proteína constituye un tercio del total de las

proteínas corporales, siendo la colágena un componente estructural importante ya que ha sido demostrada su presencia en casi todos los phyla estudiados (31).

Los tejidos conjuntivos o de sustentación constituyen un amplio conjunto de aspectos morfo-estructurales y de consistencia muy variable. No solamente forman la trama de sustentación y reunión de estructuras, es to es, elementos con funciones predominantemente mecánicas y muchas estéticas (vgr: determinadas partes óseas ó cartilaginosas), sino que poseen elementos que intervienen en funciones complejas especialmente en aquellas relacionadas con el metabolismo, el calor del cuerpo, las de defensa y la cicatrización (32).

Estos tejidos están constituidos por 3 elementos principales: - -
a) poblaciones de células nativas, b) fibras que rodean a los elementos celulares y c) sustancia amorfa o fundamental. Las fibras representan el ensamble ordenado de las proteínas colágena y elastina y la sustancia fundamental está constituida principalmente de proteoglicanos. Los proteoglicanos son proteínpolisacáridos en los que las unidades de disacáridos de los polímeros se unen covalentemente a las proteínas. Las poblaciones celulares de fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, odontoblastos y células reticulares, son las células del tejido conjuntivo derivadas del mesénquima, las cuales se diferencian para la síntesis y secreción de fibras, proteínas

y proteoglicanos.

Los tejidos conjuntivos también puede contener células adiposas y células fagocíticas como macrófagos y células cebadas. Estos tipos celulares se consideran como células residentes ya que están presentes constantemente en un cierto número y en varios tipos de tejidos conjuntivos. - Otras poblaciones celulares son consideradas inmigrantes y aparecen transitoriamente en los tejidos conjuntivos como parte de las reacciones inflamatorias ante un daño celular. Estas células son: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células linfocíticas y monocitos, que han sido observados en gran número circulando en los vasos sanguíneos y rodeando los tejidos conjuntivos (33).

Quando se comparan los tejidos conjuntivos de diferentes órganos y sistemas, se observa una gran diversidad morfológica. La proporción de células, fibras y sustancia fundamental entre las clases y organización de materiales extracelulares puede variar considerablemente de tejido a tejido. En todos los tejidos conjuntivos donde se encuentra la colágena: piel, hueso, córnea, cartilago, tendones, ligamentos, membranas basales, epitelios, revestimiento del globo ocular, válvulas cardiacas, útero, pulmón, etc., la organización microscópica se presenta en una forma análoga. Las células de estos tejidos se encuentran dispersas e inmersas en un abundante material intersticial compacto llamado matriz, que contiene a la coláge

na (34). El microscopio óptico pone de manifiesto que la matriz está formada principalmente por numerosos haces de filamentos y que cada filamento está formado a su vez por la unión de filamentos más finos o fibrillas - - (Fig. 5).

LA MOLECULA DE COLAGENA

La molécula de colágena que compone esta fibrilla fue aislada a mediados de los años 50 por Smith, Gross y Highberger (35). Es una proteína en forma de bastoncito de 300 nm a 280 nm de longitud y de 1.4 nm de espesor (31) y con un peso molecular de 280 000 a 300 000 daltones (36). La molécula de colágena está formada por la asociación de varias cadenas polipeptídicas. En 1963 K.A. Piez y sus colaboradores demostraron que la molécula de colágena comprendía 3 cadenas polipeptídicas mostrándose en el análisis que se obtenían 2 componentes: un componente o fracción ligera que fué denominada fracción α (alfa) y otra exactamente dos veces el peso de la anterior que se denominó β (beta); sugiriendo este hallazgo que este componente consistía de 2 cadenas α unidas entre sí (31).

Las tres cadenas polipeptídicas recibieron la denominación de cadenas α (alfa). Cada cadena está formada por el encadenamiento de unos 1050 aminoácidos, con un peso molecular de alrededor de 100 000 daltones y que miden 300 nm de longitud. Lo que sitúa a las cadenas α entre los polipépti

dos más largos conocidos en el reino animal (34).

Las moléculas de colágena difieren por la naturaleza de las cadenas que las componen pudiendo variar de un tejido a otro. Actualmente se han reconocido por lo menos 5 tipos distintos ya caracterizados (Tabla 1). Los mejor conocidos son los 3 tipos de colagenas intersticiales. La colágena tipo I, el principal componente de piel, tendón, hueso y paredes de los vasos sanguíneos, es sintetizado por los fibroblastos, células del músculo liso, osteoblastos y odontoblastos. El tipo II, es el único tipo de colágena constituyente de cartílago hialino y es producido por los condrocitos. La colágena tipo III es sintetizada por las células de músculo liso y generalmente se le encuentra conjuntamente con la colágena tipo I.

Los otros 2 tipos de colágena son mucho menos abundantes y sus células pertenecen a categorías tisulares distintas de los tejidos conjuntivos. Se trata de las colágenas de membranas basales de los epitelios; las colágenas IV y la V que actualmente se sabe que está presente en membranas fetales de músculo liso y esquelético (36).

La molécula de colágena es una triple hélice formada por el enrollamiento de las 3 cadenas polipeptídicas. Hasta el momento se reconocen 12 variedades de cadenas α (alfa), y aunque por la asociación de 3×3 su número potencial sería $12^3 = 1728$, el número real de moléculas es substancialmente

pequeño. Se ha llegado a la conclusión de que la naturaleza de las cadenas α sintetizadas en las células de un determinado tejido es un evento finamente regulado y que esta regulación está dada por los mecanismos de diferenciación celular, que da a cada tejido sus cualidades biológicas propias.

El primer tipo de colágena estudiado denominado tipo I, está formado por 2 cadenas alfa idénticas denominadas $\alpha 1$ y una cadena alfa distinta de las 2 primeras por su secuencia de aminoácidos llamada $\alpha 2$. La molécula de colágena tipo I responde a la fórmula $(\alpha 1)_2 \alpha 2$, y se localiza predominantemente en piel, tendón y hueso (38).

Las moléculas de colágena denominadas Tipo II y Tipo III están formadas por la asociación de 3 cadenas alfa distintas entre ambos tipos. Sin embargo, las 3 cadenas en cada molécula de colágena Tipo II o Tipo III son idénticas.

PROPIEDADES FÍSICAS Y BIOLÓGICAS DE LA COLÁGENA

La fuerza de tensión que soporta la fibra de colágena es extraordinariamente notable. Una fibra que mide 1 mm de diámetro, puede soportar de 10 a 40 Kg sin romperse. Muchas de sus propiedades químicas y físicas se explican por las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que la

componen. Es única entre las proteínas debido a que cada tercer aminoácido en cada una de sus cadenas polipeptídicas es glicina, que es el aminoácido más pequeño y su residuo de cadenas laterales es un átomo de H_2 . Los otros aminoácidos más frecuentes son los iminoácidos prolina (pro) y su derivado biosintético la hidroxiprolina (hyp).

La hidroxiprolina se encuentra raramente en otras proteínas pero en la colágena representa aproximadamente el 10% de todos los aminoácidos y el otro 10% está representado por la prolina. Cada una de las tres cadenas polipeptídicas de la molécula de colágena tiene 1,000 aminoácidos y por tanto la estructura de cada cadena puede ser considerada como unidades de triplete repetidos. Esto se observó gracias a la técnica de difracción de rayos X, observándose que cada tercer aminoácido era glicina y por tanto la estructura de la cadena se denominó por la fórmula siguiente (Gly-X-Y)₃₃₃. Donde prolina ocupa frecuentemente la posición X e hidroxiprolina la posición Y de los triplete repetidos. Cada cadena de la molécula tiene esta estructura general, y las tres cadenas están enrolladas entre sí mismas formando una super hélice.

Esta forma de hélice de la molécula le confiere rigidez y explica la gran firmeza y resistencia de la fibra que conforma (39). La estructura de hélice de la molécula de colágena establecida por Astbury y detallada por Ramachandran G.N. y Kartha (1954) propone que cada una de las 3 cadenas

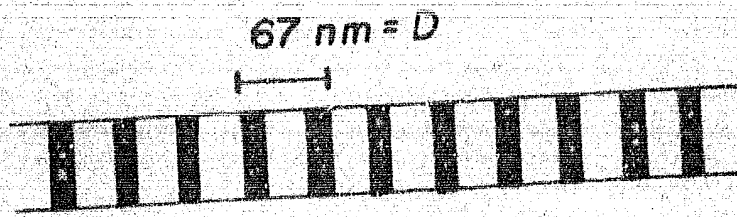
están enrolladas levógicamente en la hélice con 3 aminoácidos en cada vuelta de la hélice (31). Los acoplamientos estereoquímicos debidos a la estructura cíclica de la prolina y de la hidroxiprolina y la naturaleza compacta de la prolina son los componentes que proporcionan la rigidez de la triple hélice. Por otro lado el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina permite establecer puentes de hidrógeno (enlaces débiles) entre los residuos de aminoácidos de las cadenas alfa que constituyen la triple hélice. La molécula de colágena debe en gran parte su estabilidad al grupo hidroxilo de la hidroxiprolina (31) (ver Fig. 4).

Otro aminoácido presente en la molécula es la lisina, que puede ser hidroxilada en el quinto átomo de carbono y este grupo hidroxilo permite entonces que se unan a la molécula de colágena moléculas de azúcares. Todas las colágenas contienen cantidades significativas de hexosas, principalmente glucosa y galactosa que se encuentran como partes integrales de la molécula unidas mediante enlaces covalentes. Son las moléculas de los azúcares las que permitirán establecer enlaces entre las distintas moléculas de colágena que constituyen una trama. Los aminoácidos lisina, ácidos glutámico y aspártico y arginina se encuentran con cargas netas a diferencia de glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina que se encuentran sin carga, y su función es la de mantener la fuerza de unión en el ensamblaje de la fibrilla, (ver Tabla II).

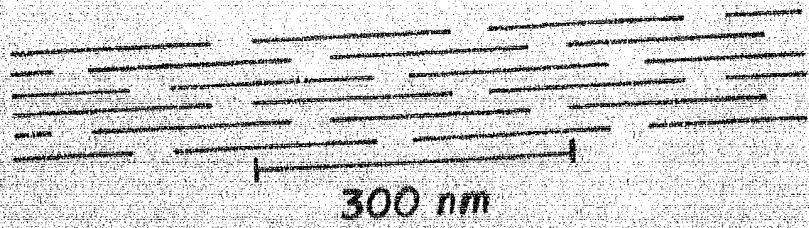
Fig. 4. Esquema representativo de los distintos pasos involucrados en el proceso de Fibrogénesis.

FIBRA DE COLAGENA

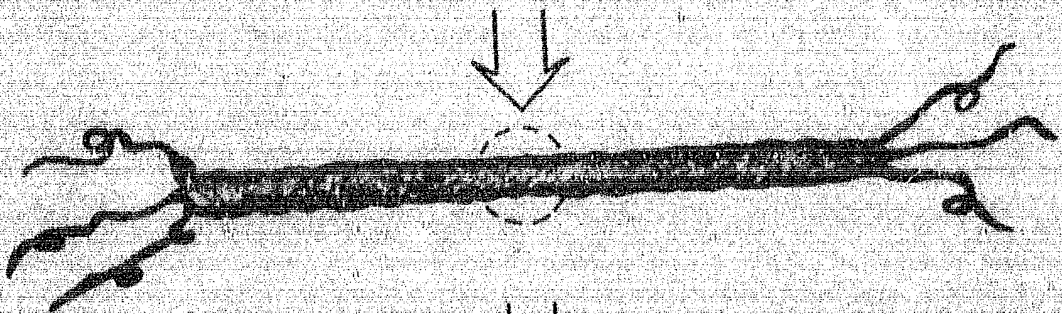
Fibra



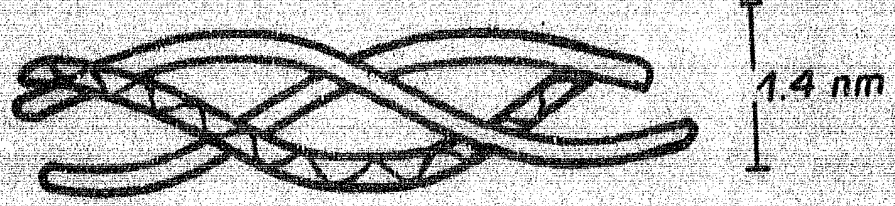
Fibrilla



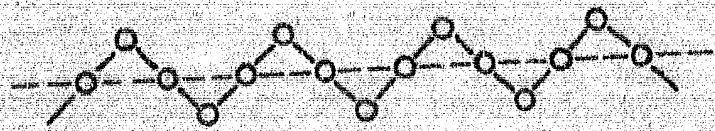
Molécula



Triple Helice



Cadena Alfa



Secuencia de Amino Acidos



Se conoce la composición de aminoácidos para los distintos tipos de colágena de varias especies principalmente humanos, bovinos y aves. En general hay un grado alto de homología para un tipo dado de colágena cuando se hacen comparaciones interespecie pero se han observado variaciones notables entre tipos genéticamente distintos (4).

Se han encontrado diferentes tipos de colágena en distintos tejidos pero muchos tejidos contienen 2 tipos o más. Por ejemplo, las paredes de arterias de animales jóvenes contienen entre 60 y 70% de colágena tipo I y de 30 a 40% de tipo III. La colágena tipo II está limitada a tejidos cartilagosos (31). Los distintos tipos de colágena y su distribución en los tejidos se muestran en la Tabla I (40).

BIOSINTESIS DE LA COLAGENA

En los últimos años se ha demostrado que muchas proteínas son sintetizadas como un precursor más largo y con secuencias de aminoácidos que son removidas enzimáticamente antes de alcanzar la forma funcional de la proteína. Actualmente se sabe que todos los tipos de colágena son sintetizados en esta forma, a través de un precursor que ha sido denominado procolágena. La estructura de triple hélice contiene péptidos adicionales en cada cadena. En estos dos extremos terminales uno amino y otro carboxilo la composición de los aminoácidos que las constituyen semejan estructuras de proteínas globulares. El peso molecular aproximado de las moléculas precursoras denominadas pro α, está en la región de los 150 000 daltones para la

TABLA I

COLAGENAS DIFERENTES GENETICA Y ESTRUCTURALMENTE

Tipo de Colágena	Composición de Cadenas Alfa	Tejido Predominante
I	$ \alpha 1 (I) _2 \alpha 2$	Piel, tendón, hueso y dentina
II	$ \alpha 1 (II) _3$	Cartílago, tejidos hialinos
III	$ \alpha 1 (III) _3$	Músculo, arterias, piel, útero, órganos internos
IV	$ \text{pro } \alpha 1 (IV) _3$	Membranas basales, placenta
V	$(\alpha A)_x, (\alpha B)_x$	Membranas basales, colágena "pericelular"

TABLA II

FUNCIONES DE ALGUNOS AMINOACIDOS EN LA MOLECULA DE COLAGENA

AMINO ACIDO	CARACTERISTICA	FUNCION
Glicina Alanina Prolina Hidroxiprolina	Sin carga	Formación de la triple hélice
Valina Leucina Isoleucina Metionina Fenilalanina	Fuertemente hidrofóbicos	
Acido Aspártico Acido Glutámico	Cargados Negativamente	
Arginina Lisina Hidrolisina	Cargados Positivamente	
Lisina Hidroxilisina	Cargados Positivamente	Participan en la formación de enlaces covalentes

mayoría de las procolágenas (41).

La biosíntesis de colágena se lleva a cabo por los fibroblastos y sus variantes como son los osteoblastos, condroblastos y odontoblastos. Varias características de la biosíntesis de la colágena la distinguen de otras proteínas, una característica no usual es el gran número de modificaciones postraduccionales de la molécula que ocurren después de que la información contenida en el ARN mensajero es traducida. Los principales pasos en la biosíntesis de colágena y sus funciones básicas se resumen en la Tabla III. Algunos de los cambios postraduccionales ocurren dentro de las células que sintetizan colágena, mientras que otros se efectúan extracelularmente.

La mayoría de las enzimas involucradas en estas modificaciones ya han sido aisladas y caracterizadas y sus funciones se han definido también. En la Tabla IV se presentan las funciones básicas y las enzimas que catalizan estas reacciones (39).

TRADUCCION DE LOS DISTINTOS ARN MENSAJEROS QUE CODIFICAN PARA LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENA.

Las diferencias encontradas en las distintas cadenas α son debidas a las modificaciones postraduccionales. Estas son muy distintas a las diferencias encontradas en la estructura primaria de las cadenas, que es debida a la expresión de distintos genes que deben existir para las cadenas poli-

TABLA III

PASOS GENERALES EN LA BIOSINTESIS DE COLAGENA

Paso Biosintético	Significado Biológico
1.- Transcripción y Traducción	Estructura primaria de la proteína
2.- Hidroxilación de residuos de prolina	Esencial para la estabilidad de la triple hélice a 37°C
3.- Hidroxilación de residuos de lisina	Esencial para las reacciones de glicosilación y para la estabilidad de los enlaces covalentes
4.- Glicosilación de residuos de hidroxilisina	Probablemente influye en la formación de las fibras de colágena
5.- Asociación de cadenas y formación de puentes de disulfuro	Esencial para la formación de la triple hélice
6.- Formación de la triple hélice	Esencial para la velocidad normal de secreción de la procolágena al espacio extracelular
7.- Secreción de procolágena	Esencial para que se efectuen las modificaciones extracelulares
8.- Conversión de procolágena a colágena	Esencial para la formación de fibras normales
9.- Agregación de las moléculas	Formación de fibras de colágena
10.- Formación de enlaces covalentes	Esencial para la estabilidad de las fibras de colágena.

TABLA IV

ENZIMAS QUE CATALIZAN LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE
LA COLAGENA

ENZIMA INVOLUCRADA	MODIFICACION POSTRADUCCIONAL
Peptidasa de la señal NH ₂ terminal	Eliminación de la secuencia hidrofóbica involucrada en secreción
Hidroxilasa de prolina	Hidroxilación de ciertos residuos de prolina
Hidroxilasa de lisina	Hidroxilación de ciertos residuos de lisina
Glucosil transferasa	Glucosilación de ciertos residuos de hidroxilisina
Galactosil transferasa	Glicosilación de ciertos residuos de hidroxilisina
N-acetil glucosaminil transferasa	Glicosilación de ciertos residuos de asparagina
Manosil transferasa	Glicosilación de ciertos residuos de asparagina
Proteasa(s) de NH ₂ -terminal de procolágena	Conversión de procolágena a colágena
Proteasa(s) de COOH terminal de procolágena	Conversión de procolágena a colágena
Oxidasa de lisina	Desaminación oxidativa del ε-NH ₂ de lisina. Formación de enlaces covalentes

peptídicas de los cinco tipos de colágena. Las cadenas polipeptídicas son sintetizadas en los complejos ribosomales cuando se efectúa la traducción de los templates de RNA mensajero por los polisomas o poliribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico rugoso. Los polisomas ensamblan los aminoácidos en cadenas polipeptídicas que son en su inicio 50% más largas que las cadenas α de la colágena. Estas cadenas son denominadas cadenas pro α (alfa) y presentan secuencias adicionales de aminoácidos en ambos extremos de las cadenas. La extensión carboxilo terminal se caracteriza por contener cisteínas, que permiten el establecimiento de puentes disulfuro.

Durante la biosíntesis de colágena se presenta una característica poco usual. Los dos aminoácidos típicos de la colágena, hidroxiprolina e hidroxilisina no se incorporan directamente a las cadenas polipeptídicas sino que se derivan de prolina y lisina, que son hidroxilados después de haber sido incorporados durante el ensamblaje de los péptidos. Las tres cadenas pro-alfa de la molécula de procolágena están unidas entre sí por uniones disulfuro intercadena. Inicialmente se pensó que las extensiones peptídicas se localizaban únicamente en un extremo de la cadena, pero evidencias posteriores sugieren que están presentes en ambos lados y que las extensiones en el carboxiterminal son más largas que las del extremo amino terminal (42).

HIDROXILACION DE LOS RESIDUOS DE PROLINA Y LISINA

Estas reacciones son catalizadas por dos enzimas diferentes; la pro

lil hidroxilasa y la lisil hidroxilasa. Ambas hidroxilaciones requieren de oxígeno, iones ferrosos, α cetoglutarato y un agente reductor que es el ácido ascórbico. El α -cetoglutarato es descarboxilado a succinato y CO_2 durante la reacción y un átomo de oxígeno molecular se incorpora en hidroxiprolina o hidroxilisina mientras que otro átomo se incorpora en el succinato.

El peso molecular reportado para la prolil hidroxilasa activa aislada de embrión de pollo es de 240,000 daltones. Es un tetrámero constituido por 2 tipos diferentes de monómeros enzimáticamente inactivos con un peso molecular de 60,000 y 64,000 daltones. La lisil hidroxilasa presenta actividad enzimática en fracciones obtenidas por cromatografía de filtración con pesos moleculares estimados de 550,000 y 200,000 daltones. La secuencia mínima requerida para la actividad de la prolil-hidroxilasa es el triplete X-Pro-Gly. Esto indica que en la biosíntesis de colágena la hidroxilación de los residuos de prolina ocurre antes de la formación de la triple hélice y cuando las cadenas polipeptídicas nacientes se encuentran unidas a los ribosomas.

GLICOSILACION DE LOS RESIDUOS DE HIDROXILISINA

Después de la hidroxilación de algunos residuos de lisina ciertos residuos de hidroxilisina son glicosilados a galactosil-hidroxilisina y glucosilgalactosil-hidroxilisina. Estas modificaciones son catalizadas por las enzimas galactosil y glucosil transferasas cuya actividad se ha demostrado

en varios tejidos (42). La glicosilación, así como la hidroxilación se llevan a cabo antes de la formación de la triple hélice.

MODIFICACIONES INTRACELULARES

Las cadenas polipeptídicas se sintetizan en los ribosomas unidos a membranas y mientras se ensamblan pasan a través de la membrana hacia la cisterna del retículo endoplásmico. Estudios recientes demostraron que la enzima prolil-hidroxilasa se localiza dentro de la cisterna del retículo endoplásmico y que la lisil-hidroxilasa también se encuentra en el compartimiento de la cisterna (43). La hidroxilación de los residuos de prolina y de lisina se inician mientras que las cadenas polipeptídicas aún están siendo sintetizadas en los ribosomas y antes de estar completamente formadas en ellos. La glicosilación también se inicia mientras las cadenas son ensambladas y sintetizadas en los ribosomas. Posterior a la liberación de las cadenas en la cisterna, se lleva a cabo la formación de la triple hélice, la unión de las cadenas por medio de los puentes disulfuro intercatenarios ocurre dentro de la cisterna del retículo endoplásmico.

SECRECIÓN DE PROCOLAGENA A LA MATRIZ EXTRACELULAR

Aún cuando existían controversias respecto al patrón y mecanismos de secreción de la procolágena, estudios recientes han demostrado que las vacuolas del aparato de Golgi están relacionadas con la secreción. En cõ-

lulas de epitelio de córnea, odontoblastos y osteoblastos se han identificado vesículas lisas del aparato de Golgi y vacuolas conteniendo material colagénico. El movimiento transcelular de la procolágena relacionado con las estructuras membranales del aparato de Golgi sugiere que tal movimiento está mediado por microtúbulos (41). Estudios realizados con colchicina y vinblastina, han demostrado que en presencia de estos agentes antimicrotubulares se inhibe la secreción de procolágena en cultivos de fibroblastos. Así mismo, se ha observado que estos compuestos y otros agentes antimicrotubulares retardan la conversión de procolágena a colágena (44).

Otro estudio realizado en cultivo de hueso craneal ha evaluado los efectos antimicrotubulares de colchicina y vinblastina en la síntesis de proteínas utilizando la técnica de microscopía y autoradiografía, mostrando que colchicina retarda la conversión de la procolágena a colágena e inhibe su secreción por localización del isótopo incorporado con la autoradiografía. Estas observaciones sugieren también que parte de la colágena secretada por la célula es dirigida al complejo de Golgi y esto implica que el movimiento transcelular de las vesículas derivadas del complejo de Golgi se lleva a cabo por los microtúbulos. La inhibición gradual de la síntesis de colágena por colchicina es atribuida a la interrupción de la vía del complejo de Golgi, ya que se sabe que la conversión de procolágena a colágena se efectúa extracelularmente.

Los efectos producidos por vinblastina en las células de huesos cra

neales indican que actúa inhibiendo tanto la síntesis de proteínas no colagénicas como las colagénicas. Ambos inhibidores microtubulares mostraron una disminución en la síntesis y secreción aunque a diferentes niveles en la ultraestructura celular. La vinblastina actúa en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y en el complejo de Golgi mientras que colchicina solo afecta el complejo de Golgi. Estos estudios sugieren por tanto que la colágena se secreta al menos en parte por la vía del complejo de Golgi y que esta secreción es dependiente del funcionamiento normado por el sistema microbular (11).

MODIFICACIONES EXTRACELULARES

La conversión de procolágena en colágena es un evento extracelular como se mencionó anteriormente. El primer paso consiste en la eliminación de los extremos amino y carboxilo de la procolágena por medio de dos o más proteasas. Los datos obtenidos indican que esta conversión ocurre por lo menos en dos pasos. Una de estas dos enzimas ya ha sido caracterizada, se le ha nombrado procolágena aminopeptidasa y se cree que probablemente cataliza la eliminación de la porción amino terminal; la enzima requiere de calcio para su actividad. Las extensiones terminales de la molécula de procolágena probablemente juegan un papel muy importante en el ensamblaje de la triple hélice, especialmente controlando la proporción. Probablemente también tienen otra función, como la de prevenir la formación temprana de fibras intracelulares antes de que la proteína sea secretada.

AGREGACION Y ENTRECruzAMIENTO DE LA MOLECULA DE COLAGENA

Después de la conversión de procolágena en colágena, las moléculas se arreglan de una forma específica que permite la conformación de las fibras en el espacio extracelular. La formación de las fibras ocurre espontáneamente una vez que han sido eliminados los extremos amino y carboxilo de la procolágena y es el resultado de la agregación de triples hélices de colágena. La fuerza de tensión que tienen las fibras se deriva de los enlaces entrecruzados que se forman en el ensamblaje de la fibra. El primer paso de la conformación de la fibra está dado por un proceso enzimático que ocurre con la oxidación desaminativa de los grupos ϵ -amino de residuos de lisina y/o hidroxilisina para generar grupos aldehídos y que es catalizado por la enzima lisil oxidasa. Los requerimientos de la enzima para su funcionamiento son: una fuente de iones de cobre y oxígeno molecular. Se ha confirmado la necesidad de estos requerimientos, ya que se observa una inhibición de su actividad en presencia de quelantes de cobre y por un número de compuestos nitrilados (el β -amino propionitrilo), así como con agentes peróxido-oxálicos (42).

Se han identificado dos tipos de enlaces covalentes cruzados en la molécula de colágena: las uniones intramoleculares que se llevan a cabo entre las cadenas polipeptídicas de una misma molécula y las uniones intermoleculares que se originan por la formación de enlaces entre moléculas adyacentes. Las uniones intramoleculares se forman por condensaciones

aldólicas entre dos aldehidos y se localizan cerca de las regiones amino terminales de las cadenas alfa. Los enlaces intermoleculares se originan por la reacción entre un aldehido de una cadena y un grupo ξ -NH₂ de lisina o hidroxilisina de otra molécula de colágena. La extensión y tipo del entrecruzamiento varía con la función fisiológica y la edad de los tejidos. La importancia de las uniones entrecruzadas está dada por la fuerza mecánica que confiere a las fibras, requerimiento indispensable en la función morfoestructural de los tejidos conjuntivos que conforman (46).

ENFERMEDADES DE LA COLAGENA

En los últimos años se ha hecho evidente que la colágena está implicada en un espectro muy amplio y variable de problemas médicos. Se ha observado que alteraciones en la producción de colágena y en su degradación, están relacionadas con enfermedades como la cirrosis hepática y la fibrosis pulmonar. Las ulceraciones de la córnea e invasiones de tejido conjuntivo que rodea a tumores, pueden estar relacionadas con cambios en el metabolismo de la colágena que se producen por una destrucción tisular.

Así también, se ha observado que un gran número de aberraciones en el desarrollo ontogénico están relacionadas con la colágena y pueden heredarse o adquirirse por una predisposición del individuo. Estas fallas morfogenéticas convergen en los errores a niveles de síntesis, secuencia primaria de la colágena, formación, estructura y estabilidad de la molécula, ensamblaje

de las moléculas para la producción de fibras, formación de las uniones en tre cruzadas intra e intermoleculares, arreglo de las fibras en los tejidos o desequilibrio entre las tasas de síntesis y degradación.

CLASIFICACION DE LOS DESORDENES DE COLAGENA A NIVEL MOLECULAR

Las alteraciones en la composición y ensamble de las fibras de colágena en el intersticio se denominan defectos estructurales. La modificación en la cantidad de colágena polimerizada en el espacio extracelular frecuentemente es resultado de un defecto en la regulación. Ambos tipos de patologías pueden ser genéticamente definidos (a menudo desórdenes hereditarios), o pueden ser el resultado de una función anormal en el producto de la expresión de un gene determinado (enfermedades adquiridas).

DEFECTOS ESTRUCTURALES

Un defecto estructural es aquella alteración en la estructura de la molécula de colágena y/o en el tipo de la colágena que conforma la fibra. Frecuentemente se ha interpretado como el resultado del funcionamiento anormal en algún paso intracelular durante la síntesis de los polipéptidos. Cuando las alteraciones estructurales son demasiado extensas y no permiten la formación de moléculas estables se puede observar una disminución de la cantidad de fibras de colágena. Cuando no se detectan modificaciones extensas que afecten su estructura terciaria, los monómeros de colágena pueden parti-

cipar en la construcción de estructuras fibrilares, aunque su estabilización final o arquitectura pueden encontrarse modificadas. Lo anterior da como resultado que en la formación de las fibras se puedan determinar alteraciones en las propiedades mecánicas, estructurales y/o en la arquitectura de los tejidos que conforman.

DEFECTOS DE CONTROL O REGULACION

Generalmente son el producto de una alteración en los mecanismos de regulación de la tasa de síntesis, degradación o el balance entre ambas. La atrofia es el resultado de una degradación que es mayor que la síntesis mientras que la esclerosis es el producto de un proceso inverso.

DEFECTOS GENETICOS

Como se ha observado, las enfermedades hereditarias son el resultado de la síntesis de polipéptidos defectuosos o de la falta de producción o deficiencia de alguna enzima requerida para el procesamiento normal y/o ensamblaje adecuados de la colágena.

DEFECTOS ADQUIRIDOS

Resultado de una expresión anormal de un gene o de sus productos. Este resultado puede deberse a la ausencia de un cofactor requerido o a la

intervención de un inhibidor. La función de una o varias enzimas o de toda la actividad biosintética de la célula puede verse modificada de esta forma. Estas alteraciones pueden depender también de las interacciones entre compuestos exógenos o endógenos, así como de la colágena extracelular (46). La clasificación propuesta para la patología de la colágena a nivel molecular se presenta en la tabla V.

ENFERMEDADES DE LA COLAGENA POR DEFECTOS EN SU REGULACION

La Fibrosis Hepática

Es una secuela producida por diversos agentes agresores químicos y biológicos que dañan al hepatocito y pueden provocar fibrosis. Cuando la lesión es aguda el número de células destruidas es relativamente pequeño y el hígado se regenera completamente sin dejar cicatriz residual. Cuando la lesión es crónica se forma una cicatriz generalizada que es persistente. Esta se forma principalmente al existir una síntesis activa y depósito de colágena en el intersticio del hígado y en parte es responsable de algunas de las manifestaciones y secuelas de la enfermedad (47). La patogénesis de la fibrosis hepática se ha relacionado con la acumulación de las fibras de colágena sintetizadas de novo y que es el resultado de la estimulación de fibroblastos pre-existentes o por la transformación de células perisinusoidales en fibroblastos. Sin embargo, otros autores sugieren que el número de fibroblastos y la cantidad de fibrosis en el hígado no se correlacionan directa-

TABLA V

ORIGEN Y NATURALEZA DE DEFECTOS DE LA COLAGENA*

<u>Defectos en</u>	<u>Manifestación</u>
<u>Estructura de la Molécula</u>	
1) Síntesis post-ARN mensajero de OH-prolina e OH-lisina	a) Ehlers Danlos VI b) Escorbuto, b) anoxia
2) Eliminación de la extensión NH ₂ terminal del precursor procolágena (procolágena peptidasa)	a) Ehlers Danlos VII b) Dermatosparaxis en ganado
3) Transcripción Cambios en los tipos de las cadenas sintetizadas	a) Osteogénesis imperfecta b) Artritis reumatoide
<u>Estructura de la Fibra</u>	
1) Formación de enlaces covalentes inter e intracadena (lisil oxidasa)	a) Ehlers Danlos V b) Latirismo a) Homocistinuria b) Efecto de D-penicilamina
2) Interacción con otros componentes del tejido conjuntivo I) Proteoglicanos II) Glicoproteínas	a) Síndrome de Marfan b) Scleromexedema a) Pseudoxanthoma elasticum
<u>Velocidad de Síntesis y/o Degradación (Metabolismo)</u>	
1) Cambios en la velocidad de síntesis	b) Esclerosis sistémica progresiva b) Artritis reumatoide b) Fibrosis en cicatrices b) Fibrosis pulmonar b) Fibrosis hepática
2) Cambios en la velocidad de Degradación	b) Invasión panicular de cartílago en artritis reumatoide, algunos trastornos hormonales
3) Actividad Colagenolítica Aumentada	a) Osteopetrosis b) Gangrena gaseosa b) Enfermedad periodontal
4) Enfermedades hereditarias	
5) Enfermedades adquiridas	

mente y por ello postulan que la colágena puede provenir de otras entidades celulares distintas de los fibroblastos y que posiblemente estas células correspondan a las del parénquima hepático. Investigaciones recientes acerca del origen de la colágena hepática han reportado evidencias de actividad enzimática de prolil-hidroxilasa en el hepatocito, sugiriendo que el parénquima hepático puede estar participando activamente en la síntesis y posiblemente en la degradación de colágena (48).

Los eventos moleculares que relacionan el daño al hepatocito con el proceso inflamatorio y el incremento en la síntesis y depósito de colágena son elementos desconocidos en el desarrollo de fibrosis hepática. Sin embargo, se han aislado algunos factores de macrófagos, linfocitos, granulomas e hígados lesionados, que son capaces de estimular la proliferación de fibroblastos y la biosíntesis de colágena in vivo (49).

En la cirrosis están aumentados todos los tipos de colágenas (tipos I, III, IV y V). Sin embargo, en la cirrosis avanzada se ha observado que el tipo I es el predominante. Además, la proporción incrementada entre la colágena tipo I y tipo III se cree que puede ser el factor que promueve el estado de irreversibilidad de la fibrosis en el hígado (49). Se ha establecido que la colágena tipo I corresponde a los haces gruesos de colágena que se encuentran en las triadas portales y las cicatrices que rodean a los nódulos de regeneración. La colágena tipo III se encuentra asociada con componentes heterogéneos entre los que se incluyen fibronectina y glucoproteínas

ácidas, además de la colágena tipo V o "pericelular" y la colágena de membranas basales. La lisil-oxidasa, enzima responsable de la oxidación de los residuos específicos de lisina y de hidroxilisina de la colágena, está elevada en la fibrosis hepática inducida por CCl_4 . La actividad de la enzima prolil-hidroxilasa también se ha encontrado elevada en el hígado después del daño hepático inducido con agentes agresores. La actividad de las enzimas galactosil y glucosiltransferasas también se ha encontrado elevada (42).

Tratamientos Utilizados

La prednisona se ha utilizado en el tratamiento de ciertas formas de hepatitis como la alcohólica, la crónica activa y la fulminante. Esta modalidad de tratamiento incrementa la síntesis de albúmina y puede modificar algunas manifestaciones clínicas o las anomalías bioquímicas. Sin embargo, se observan pocos cambios en la cifra total de mortalidad. Los corticoesteroides han resultado útiles en el tratamiento de la hepatitis crónica activa, si bien la validez de esta afirmación se ha puesto algunas veces en duda. Se ha observado que la administración de prednisona disminuye la síntesis de ácidos nucleicos y colágena lo que puede guardar relación con la reparación del daño hepático. En algunos casos la síntesis de DNA recobra su normalidad mientras que la síntesis de colágena continúa en aumento.

Desde hace 10 años se ha utilizado la colchicina en el tratamien

to de la fibrosis hepática por alcohol, observandose una mejoría de la función hepática. Sin embargo, los resultados no muestran un dato significativo de la disminución de la mortalidad en esta enfermedad, así como una disminución en el estado fibrótico de los pacientes (50). En la actualidad no existe un tratamiento considerado como acertado en la detención de las fibrosis o procesos cicatriciales, que significativamente incrementen la tasa de supervivencia de estos padecimientos. Lo que sí se ha desarrollado son terapias alternas que mejoran o alivian las complicaciones secundarias originadas por la cirrosis.

Fibrosis Pulmonar Idiopática

Esta enfermedad se caracteriza histológicamente por el desarreglo del parénquima pulmonar e infiltración crónica de células inflamatorias. Aun cuando se desconoce el mecanismo que explique el porqué se establece la fibrosis pulmonar, se ha sugerido que puede describirse como un desorden inmunológico en el que estas células reconocen a la colágena como extraña. De esta forma, la colágena puede actuar como un antígeno que mantiene o causa un daño progresivo en el pulmón (51). Una característica clínica de reconocimiento del padecimiento es que se observa asociado a desórdenes colágeno-vasculares. Las características fisiológicas e histológicas de la fibrosis pulmonar idiopática se observan en pacientes con artritis reumatoide, esclerosis sistémica progresiva, polimiositis-dermatomiositis y lupus eritematoso sistémico (52).

Actualmente se ha hecho aparente que en la fibrosis pulmonar la distribución de las fibras de colágena, su organización ultraestructural y la proporción de los tipos de colágena se encuentran alterados. Los análisis bioquímicos indican que el contenido de colágena tipo III está disminuido marcadamente y el grado de hidroxilación de los residuos de lisina en tipo I y tipo III de colágena se encuentra reducido. Se ha confirmado también por estudios de inmunofluorescencia, un incremento marcado en la cantidad de colágena tipo I que se localizó en los engrosamientos de los septos alveolares; la colágena tipo III se encontró reducida en los septos y localizada perivascularmente. Se observó un incremento en la colágena tipo V en el intersticio de los septos engrosados en áreas de proliferación de células de músculo liso (42). También se ha reportado un incremento de la enzima prolil hidroxilasa en este padecimiento. Los tratamientos utilizados en esta enfermedad han sido principalmente a base de corticosteroides (drogas con efecto anti-inflamatorio) y D-penicilamina, sin que se hayan obtenido resultados alentadores en el tratamiento de la fibrosis pulmonar (42).

DESORDENES ADQUIRIDOS

Se piensa que en estos desórdenes el tejido conjuntivo sirve como locus de varias o en cierto modo distintivas reacciones inmunológicas e inflamatorias. Entre los padecimientos más notables que pertenecen a esta categoría podemos mencionar:

Esclerosis Sistémica Progresiva

La Esclerosis Sistémica Progresiva o Esclerodermia es una fibrosis característica de la piel y vasos sanguíneos. El proceso va siendo gradualmente excesivo en las manos, continúa en la piel y se moviliza a los tejidos subcutáneos y a varios órganos internos afectando particularmente a pulmón, corazón y riñones. Aparentemente la esclerodermia es un padecimiento en el que la falla reside en la pérdida del control de la síntesis de colágena, probablemente debida a la interacción de un virus o de una respuesta anormal de tipo autoinmune, debida a un problema cardiovascular. Los niveles de las enzimas prolil y lisil hidroxilasas han sido reportados con cifras elevadas en este padecimiento (53).

Los tratamientos utilizados en la terapia de la esclerodermia han sido la D-penicilamina y la colchicina. Con esta última se han reportado mejorías clínicas en el estadio fibrótico de los pacientes, aunque otros datos no están de acuerdo con estos hallazgos. En vista de estos resultados controversiales, el consenso general es que se requiere de estudios adicionales, que establezcan de una manera definitiva la efectividad de este tratamiento en la esclerodermia (42, 53).

Artritis Reumatoide

Aunque los cambios en la colágena no son el factor primario o dis

tintivo en esta enfermedad, el proceso está caracterizado por un incremento de la síntesis de colágena sinovial y por un aumento en la degradación de colágena del cartílago. Se ha determinado actividad de colagenasa en gránulos de leucocitos y en fluidos sinoviales obtenidos de pacientes con artritis reumatoide activa. Esta colagenasa es capaz de digerir el cartílago articular intacto y representa un mecanismo importante de destrucción de las articulaciones. Se ha demostrado un incremento de la actividad de prolil hidroxilasa en los tejidos sinoviales, así como un incremento de la actividad de la colagenasa en los pacientes con artritis reumatoide (45,54). En el tratamiento de esta enfermedad se ha utilizado el levamisole, con resultados que reportan mejoras significativas. Sin embargo, existen casos en los que hay poca o ninguna correlación entre el mejoramiento de la enfermedad y las remisiones clínicas (55).

DESORDENES HEREDITARIOS

Síndrome Ehlers-Danlos y Osteogénesis Imperfecta

Muchos desórdenes hereditarios del tejido conjuntivo involucran defectos moleculares de la colágena. Varios tipos de la serie del Síndrome de Ehlers-Danlos (EDS) se han definido como defectos específicos en la síntesis de colágena (ver Tabla V). El síndrome está caracterizado por hiperelasticidad de la piel e hipermovilidad de las articulaciones. En otros tipos de EDS clasificados como severos, los defectos en piel y arti

culaciones pueden estar asociados a deformidades del esqueleto óseo, ruptura de intestinos o de vasos sanguíneos.

En el EDS tipo IV el defecto molecular se asocia con una falla de la síntesis en cantidades normales de la colágena tipo III. Se ha observado que cultivos de fibroblastos de pacientes con EDS-IV, no producen colágena tipo III y mapas peptídicos de proteínas colagénicas aisladas de piel, tracto gastrointestinal, aorta y pulmones revelan que no hay colágena tipo III. Estos resultados explican porqué los pacientes con esta enfermedad tienen una extrema fragilidad de la piel. En el EDS tipo V el defecto molecular se asocia con una deficiencia de la enzima lisil oxidasa, que es necesaria para generar los aldehídos de la lisina e hidroxilisina y por tanto proveer de los grupos reactivos necesarios para sintetizar los enlaces covalentes intra e intercadena de la molécula. Los pacientes con estas alteraciones presentan cicatrizaciones delgadas y sumamente frágiles.

El EDS tipo VI es debido a una deficiencia de la enzima lisil hidroxilasa causada por diferentes mutaciones de las enzimas en las diferentes familias de los genes necesarios para la síntesis de colágena. Estudios realizados en estos pacientes indican un requerimiento de la hidroxilación de lisina para la formación de uniones entrecruzadas intermoleculares estables de la colágena. Sin embargo, no se observa una disminución de la actividad de la enzima lisil hidroxilasa en todas las familias afectadas por EDS VI, por lo que es posible pensar que se presentan otras mutaciones en la molécula de colágena que permiten estas manifestaciones clínicas (36).

En el EDS tipo VII la enzima necesaria para la eliminación de los extremos amino-terminales de la procolágena tipo I está deficiente. Estos pacientes presentan severas dislocaciones de las articulaciones, además de fragilidad y rupturas fácilmente producidas en la piel. La piel y tendones de pacientes con este síndrome presentan cadenas de colágena de tamaño intermedio entre las cadenas pro α y alfa (α). Estos desórdenes moleculares de la colágena se han identificado en el ganado vacuno, como la dermatosparaxis o fragilidad de la piel.

Otra enfermedad genética de la colágena es la Osteogénesis Imperfecta que se ha clasificado en distintas variantes al igual que los EDS. Todas ellas se presentan en tejidos óseos, que manifiestan una gran fragilidad, por lo que es frecuente observar un gran número de fracturas en estos padecimientos. En muchos pacientes se ha observado que la piel es delgada y traslúcida y las articulaciones son laxas. Los estudios realizados en cultivo de fibroblastos derivados de biopsias de tejido muestran que existe una deficiencia en la síntesis del tipo I de colágena que resulta en una alteración en la proporción entre colágenas tipo I y tipo III.

Síndrome de Marfán

Es un desorden generalizado del tejido conjuntivo, es heredado genéticamente y sus principales manifestaciones son esquelóticas, oculares y cardiovasculares. Las características clínicas de la enfermedad recuerdan

aquellas lesiones que se producen en animales jóvenes durante el crecimiento causadas por una severa deficiencia de cobre y/o administración de osteolatrógenos tales como el β -amino propionitrilo. La deficiencia de cobre y la presencia de BAPN causan una inhibición de la actividad de la lisil oxidasa, la enzima relacionada con la formación de enlaces covalentes en la colágena y elastina. Se han observado alteraciones similares en el estudio de éste síndrome, se presentan manifestaciones características como longitud anormal de las extremidades, hipermovilidad de las articulaciones, escoliosis y depresión excesiva del esternón, miopía y dislocación de los lentes oculares. Las anomalías cardiovasculares son las más severas e incluyen aneurismas, disecciones aórticas e insuficiencias valvulares (56,39).

Los estudios bioquímicos realizados en estos pacientes no solo han permitido entender la patogénesis de estos desórdenes sino que también proveen y aportan nueva información en la función, estructura, y metabolismo de la colágena misma. Por lo tanto no representa una sorpresa el saber que los desórdenes hereditarios de la colágena se encuentran actualmente sujetos a una investigación exhaustiva en diferentes partes del mundo.

O B J E T I V O S

En base a los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio utilizando el mebendazole en el modelo experimental de cirrosis hepática inducida en ratas tratadas con CCl_4 , donde los resultados histológicos y bioquímicos mostraron una disminución de los septos de colágena y regeneración del parénquima hepático en la etapa de cirrosis considerada como reversible (45), se pretendió en esta tesis demostrar la siguiente hipótesis: el fármaco administrado crónicamente en dosis por debajo de las letales no produciría alteraciones significativas a nivel de síntesis de proteínas totales y contenido de colágena en distintos órganos y tejidos corporales, ya que se absorbe mínimamente (0.5-1.0%) por vía intestinal y que se metaboliza principalmente en el hígado. Además de que los estudios realizados con el mebendazole como droga antimicrotubular han demostrado que compite activamente con colchicina y que inhibe la polimerización de tubulina.

Los objetivos específicos del presente estudio fueron: analizar los efectos de la administración crónica del mebendazole en ratas normales y compararla con grupos controles. Para ello, se determinaron los siguientes parámetros en base a la hipótesis planteada: bioquímicos, farmacológicos e histológicos.

A) Parámetros Farmacológicos:

Se determinó la dosis letal media del fármaco y el intervalo de tolerancia, de acuerdo a los reportes citados en la literatura y a los ensayos de inhibición de síntesis de proteínas totales.

B) Parámetros Bioquímicos:

- 1) Determinación de la síntesis de proteínas totales en órganos - tales como hígado y pulmón, por la incorporación de ^3H -prolina en explantes de tejido.
- 2) Efecto del fármaco sobre el contenido de colágeno y proteínas totales en varios tejidos y órganos como: pulmón, esternón, útero e hígado.
- 3) Celularidad de los tejidos, por cuantificación de ADN, para determinar posibles alteraciones en la división celular de los - diferentes tejidos analizados.

C) Parámetros Morfológicos:

Se realizaron cortes histológicos de hígado y pulmón para correlacionar las imágenes morfológicas de los tejidos con los estudios bioquímicos.

cos anteriormente señalados. Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina utilizando técnicas convencionales.

MATERIALES

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 4-6 semanas de edad.

Los reactivos empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y del mejor grado disponible, siendo en su mayoría de grado analítico. El mebendazole (metil N-5(6) benzoil 1-2 benzimidazolil-carbamato) obtenido en forma pura, fue donado por los Laboratorios Janssen Pharmaceutic de México; el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium, de Gibco Laboratories; la penicilina G sódica y la estreptomina de los Laboratorios Lakeside; el ácido ascórbico de Fisher Scientific Co.; el fumarato de β -amino propionitrilo, la L-prolina y la L-hidroxi-prolina de Sigma Chemical Corp.; la ^3H -prolina (actividad específica de 139.1 Ci/mmol) fue obtenida de New England Nuclear Corp.; los filtros de fibra de vidrio (2-4 cm GF/A) de Whatman Inc.; de los laboratorios Merck se obtuvieron la cloramina T, el reactivo de difenil-amina, el 4 dimetil-amino-benzaldehido, la ninhidrina y la pepsina cristalizada; el líquido de centelleo de acuerdo a la técnica Bray se preparó en el laboratorio (57).

M E T O D O S

Vía de Administración y Dosificación del Fármaco

Para la administración crónica del fármaco se diseñó inicialmente un protocolo para determinar la mejor vía de administración, así como la dosificación del fármaco en las ratas. Se descartó la administración intraperitoneal del mebendazole disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) aún cuando fué efectiva, y aunque el fármaco es muy poco soluble en agua se ha reportado que el DMSO produce alteraciones orgánicas además de ser su mamente tóxico (58). Debido a lo anterior se decidió administrar el mebendazole por vía oral en la dieta. Inicialmente se preparó una mezcla de alimento (Purina Chow) que contenía 1,000 y 500 mg del fármaco por Kg de alimento. Las "galletas" preparadas con estas primeras concentraciones no fueron toleradas por los animales, muchos de ellos murieron por inhani ción y otros desarrollaron canibalismo.

Además, se pudo observar que la droga estaba causando efectos co laterales indeseables como vómito, diarrea, pérdida de peso, etc. Finalmente se determinó una dosis que fué tolerada por los animales (250 mg/Kg de alimento) y que fué utilizada para los siguientes experimentos. Grupos de ratas Sprague Dawley (en número no menor de 3 experimentales y 3 contro les) hembras recibieron el mebendazole por vía oral en la dieta (250 ppm). Los animales se sacrificaron a los 15, 30, 45, 60, 90 y 150 días respecti-

vamente después de la administración del fármaco. Una vez que las ratas llegaron a las etapas respectivas, se sacrificaron previo ayuno de 16-18 hrs.

Obtención de los Organos y Tejidos

Las ratas se anestesiaron con cloroformo para luego hacer un corte longitudinal en la cavidad torácica que dejó al descubierto los pulmones. Estos se extrajeron y lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Se separaron los pulmones y el pulmón izquierdo se seleccionó para fijarse en formol al 10% con buffer de fosfatos (pH 7.4), perfundiéndose finalmente con el fijador para efectuar posteriormente los estudios histológicos. Los otros lóbulos se fragmentaron con el objeto de tener una muestra representativa de los tejidos para el análisis bioquímico y se colocaron en medio de cultivo Dulbecco (DMEM).

El hígado se obtuvo completo por disección y se separaron los lóbulos mayores que fueron cortados en rebanadas finas y se mezclaron las rebanadas de varias ratas con el fin de obtener una muestra representativa del grupo. Otros fragmentos de tejido se fijaron en formol al 10% con buffer de fosfatos (pH 7.4) para los estudios histológicos.

De ambos órganos (pulmón e hígado) se tomaron fragmentos representativos (100 mg/ensayo) para los análisis bioquímicos y de incorporación de radiactividad en los tejidos o biosíntesis de proteínas, tanto para los gru

pos experimentales como para los controles. Además, se obtuvo el esternón como órgano representativo del cartílago hialino, se lavó con solución salina fisiológica y se preservó en medio de cultivo para su posterior análisis del contenido de colágena y celularidad de los tejidos.

Análisis Bioquímicos

Los análisis bioquímicos constaron de la evaluación de la síntesis de proteínas totales, por incorporación de ^3H -prolina en hígado y pulmón en los distintos estadios de la administración del fármaco (15, 30, 45, 60, 90 y 150 días).

Se realizó la cuantificación del contenido de colágena en los tejidos para determinar si podría presentarse algún efecto no deseado en el recambio de esta proteína. Además, se determinó la concentración de ADN en los diferentes tejidos con el objeto de valorar posibles cambios en la celularidad de los tejidos como respuesta a la acción del fármaco.

Biosíntesis de Proteínas

Para la evaluación de la biosíntesis de proteínas totales, se transfirieron fragmentos de los tejidos (pulmón e hígado) a frascos de vidrio que contenían: 4 ml de medio de incubación (IMEM), BAPN (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ^3H -prolina (20 $\mu\text{Ci}/\text{ensayo}$). Los ensayos de biosíntesis de proteínas se realizaron

por duplicado en ambos órganos para los grupos experimentales y controles y se realizaron mediante una cinética de incorporación de ^3H -prolina y cuantificación de la radiactividad precipitable con TCA al 10%, según el método para cultivo de órganos (59).

Proviamente se agregaron ácido ascórbico (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que es un co-factor requerido por la prolil y lisil hidroxilasas, además de penicilina (100 U.I./ml) y estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con el fin de evitar la contaminación por microorganismos. Los frascos se taparon flojamente y se colocaron en un agitador que se ajustó a una velocidad de 100 rpm. Las muestras se colocaron dentro de un incubador metabólico (NAPCO) en una atmósfera de aire - CO_2 (95% - 5%) y se incubaron durante 90 y 180 minutos a 37°C . La reacción se terminó por congelamiento de las muestras. Posteriormente las muestras fueron descongeladas y homogeneizadas con un politrón (Brinkmann Instruments), adicionándose ácido acético a una concentración final de 0.5 M. De los homogenados se tomaron alícuotas apropiadas para determinar la incorporación del isótopo a proteínas totales y también para la cuantificación de ADN.

La cuantificación del isótopo incorporado en proteínas totales, se determinó por la cantidad de radiactividad susceptible a la precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Una alícuota de 0.2 ml de cada muestra se llevó a 1 ml con agua destilada, se le adicionaron 0.5 ml de solución decolorante (25 ml de NaOH 10 M, 15 ml de H_2O_2 30%, 250 mg de L-prolina y se

afioró a 250 ml con agua destilada) y 1 ml de TCA 25%. Las muestras se in-
 cubaron a 4°C durante 20 minutos y se filtraron por vacío a través de -
 filtros de fibra de vidrio. Los filtros se colocaron en frascos de plás-
 tico y se les adicionaron 10 ml de líquido de centelleo de Bray. La ra-
 diactividad se determinó utilizando un contador de centelleo líquido (Nu-
 clear Chicago). Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. La
 síntesis de proteínas totales se expresó como la radiactividad incorpora-
 da precipitable con ácido tricloroacético por gramo de tejido húmedo - -
 (dpm/gth).

Los cálculos para la radiactividad incorporada se realizaron de -
 la siguiente manera:

$$(\text{cpm}/0.2 \text{ ml}) \times 30 = \text{cpm}/6 \text{ ml} \times E = \text{dpm}/6 \text{ ml} + \frac{1000}{\text{p.m}} = \text{dpm/gth}$$

cpm = cuentas por minuto

X30 = factor utilizado para conocer las cpm en 6 ml, el volumen
 total del homogenado.

E = eficiencia del contador de centelleo líquido para ^3H utili-
 zando una solución del estándar de tritio en tolueno.

dpm = desintegraciones por minuto

p.m = mg de tejido utilizados en la biosíntesis.

Determinación de ADN

La determinación de ADN se realizó según el método de la difenilamina de Burton (60). Se tomaron alícuotas de 0.2 ml de los homogenados y se hidrolizaron en ácido perclórico 0.5 M durante 120-180 minutos a -70°C . Para cada una de las determinaciones se elaboró una curva tipo de ADN (10-50 mg) utilizando ADN de timo de ternera. Se adicionó a todas las muestras 1.0 ml de solución de trabajo que se preparó de la manera siguiente:

Reactivo A: 1.5 g de difenilamina
100 ml de ácido acético
1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado

Reactivo B: 16 mg/ml de acetaldehído en agua

Se preparó una solución de trabajo que contenía 20 ml del reactivo A + 0.1 ml del reactivo B. Las muestras se agitaron e incubaron a 30°C durante 16-20 horas y posteriormente se determinó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Zeiss. Los valores para cada una de las muestras experimentales se obtuvieron de la curva tipo y se expresaron como mg ADN/gth de la manera siguiente:

De la curva patrón de absorbancia a 600 nm contra μg de ADN de timo de ternera, utilizando concentraciones de 10-100 μg , se obtuvo una lf-

nea recta con una pendiente (m) = (0.0184)

Utilizando la ecuación $y = mx + b$; $b = 0$ tenemos $V.o. = 0.0184 \times \mu\text{g ADN}$;

$V.o.$ = valor observado

Por lo tanto: $\mu\text{g ADN} = \frac{V.o.}{0.0184}$

Los cálculos se realizaron de la manera siguiente:

$(V.o./0.0184) \times 30 = \mu\text{g ADN}/6 \text{ ml} \div \frac{1000}{p.m} = \text{mg ADN/gth}$

$p.m$ = mg de tejido utilizados en la biosíntesis

$\times 30$ = factor utilizado para conocer los μg de ADN en el volúmen total del homogenado (6 ml).

Quantificación de Colágena Tisular por Determinación de Hidroxiprolina en Hidrolizados Acidos de los Tejidos.

Para la determinación de hidroxiprolina, se utilizó el método de Stegeman, modificado por Woessner (61). Se tomaron muestras de aproximadamente 100 mg de tejido fresco para hígado, 50 mg de tejido en pulmón y, de 20 a 40 mg de tejido para esternón. Las muestras de tejido fueron deshidratadas por incubación a 100°C en una estufa (Thelco) hasta obtener un peso constante. Posteriormente los tejidos se hidrolizaron con HCl 6 N dentro de ampollitas de vidrio selladas al vacío, que se incubaron a 100°C durante 72 horas. Después de la incubación, los hidrolizados se filtraron y se evaporaron a sequedad. Finalmente las muestras se resuspendieron en 5 ml

de agua bidestilada en el caso de pulmón y esternón y en 2 ml en el caso de hígado y se tomaron alícuotas apropiadas (25, 50 y 100 μ l de los distintos tejidos) para la determinación colorimétrica. Cada alícuota se llevó a un volumen final de 2 ml con agua bidestilada y se adicionó 1.0 ml de solución de cloramina T. (0.704 g de cloramina T, 10 ml de agua destilada, 15 ml de solución amortiguadora de citratos). Las muestras se agitaron e incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les agregó 1 ml de ácido perclórico 3.15 M, las muestras se agitaron e incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación se agregó 1.0 ml de solución de paradimetil-amino-benzaldehído (PDAB), se agitaron vigorosamente y se incubaron durante 20 min a 50°C. Las muestras se enfriaron en agua corriente durante 5 min y se determinó la absorbancia a 557 nm en un fotocolorímetro (Spectronic 2,000 Bausch & Lomb).

Los reactivos utilizados para la determinación se prepararon como sigue:

1.- Para la solución estándar de hidroxiprolina se disolvieron 25 mg de L-hidroxiprolina en 25 ml de agua y a partir de esta solución se hicieron diferentes diluciones hasta llegar a la concentración requerida.

2.- Para la cloramina T se preparó una solución 0.05 M, disolviendo 1.4 g de cloramina T en 20 ml de agua destilada, a la que se le agrega

ron 30 ml de metil celosolve y 50 ml de una solución amortiguadora de citratos que contenía:

Ac. cítrico monohidratado	50 g
Ac. acético glacial	12 ml
Acetato de sodio trihidratado	120 g
Hidróxido de sodio	34 g
Aforado con agua destilada	1,000 ml
Antes de aforar ajustar a pH	6.0

3.- El ácido perclórico 3.15 M se preparó diluyendo 27 ml de HClO_4 al 70% (grado analítico) en 100 ml de agua destilada.

4.- La solución de paradimetil-amino-benzaldehído al 20%, se preparó agregando metil celosolve a 20 g de PDAB, hasta un volumen final de 100 ml.

Determinación Colorimétrica de la Prolina

Diferentes alícuotas de las muestras, los tejidos hidrolizados previamente, se llevaron a 1.5 ml con agua destilada, se adicionaron 1.5 ml de ácido acético y 1.5 ml de solución de ninhidrina, los tubos se taparon y agitaron, calentándose a ebullición en baño maría durante 60 min. Finalmente se enfriaron los tubos y se determinó la absorbancia a 515 nm

en un fotocolorímetro (Spectronic 2,000 Bausch & Lomb). Se determinó también una curva estándar de prolina con una solución de 0.1 $\mu\text{m}/\text{ml}$, tomándose volúmenes correspondientes a 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 y 0.25 μmoles .

Análisis Morfológico

Para la realización de este estudio se tomaron fragmentos de cada uno de los órganos mencionados para los grupos controles y experimentales (pulmón, esternón e hígado). Los tejidos se fijaron en solución de formaldehído al 10% en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes semifinos (6 μm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E), de acuerdo con las técnicas convencionales de histología.

RESULTADOS

Previo a las determinaciones de los diferentes parámetros bioquímicos, se procedió a realizar un estudio comparativo tanto en hígado como en pulmón de ratas Sprague-Dawley hembras y machos. La razón de estos experimentos preliminares fue establecer posibles diferencias entre los dos sexos en los distintos parámetros bioquímicos mencionados, ya que observaciones previas demostraron que la inducción de cirrosis por tetracloruro de carbono (CCl_4) en hembras, es más irregular que la que se tiene con ratas macho,

En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de síntesis de proteínas totales, celularidad y concentración de colágena. Excepto para la síntesis de proteínas totales en el pulmón, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de ratas (hembras y machos). Como puede observarse, los valores de síntesis de proteínas totales, ADN (mg/gth) y colágena (mg/gts), caen dentro de los valores obtenidos para un cómputo de 95% del intervalo de confianza, tomando $(n-1)$ grados de libertad, en la tabla de la prueba de T de Student y un valor crítico de $\alpha = 0.05$ ó 5% de nivel de significancia para la prueba de T de student. En base a los resultados obtenidos y con el objeto de utilizar al máximo los animales de la colonia se decidió trabajar con ratas hembra para realizar los experimentos que constituyeron esta tesis.

TABLA VI

COMPARACION DE LAS CONCENTRACIONES DE COLAGENA, ADN Y BIOSINTESIS DE PROTEINAS
 TOTALES EN EL HIGADO Y PULMON DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY NORMALES (HEMBRAS
 Y MACHOS)

GRUPO NORMAL	INCORPORACION TOTAL (dpm x 10 ⁶ /g tejido humedo)	ADN (mg/g tejido húmedo)	Colágena (mg/g tejido seco)
Hígado M	1.350 ± (0.330)	4.260 ± (0.450)	22.773 ± (1.135)
Hígado H	1.199 ± (0.357)	5.145 ± (0.424)	20.157 ± (4.251)
Pulmón M	7.170 ± (1.187)	5.469 ± (0.927)	101.999 ± (2.828)
Pulmón H	11.336 ± (2.328)	6.023 ± (0.359)	93.629 ± (10.682)

En la Tabla VII se observa que los valores de incorporación total de radiactividad (síntesis de proteínas totales) en hígado de ratas hembras, se mantuvo dentro del intervalo de valores obtenidos en el grupo control. Cuando se comparó el valor promedio del grupo control $0.268 \pm (0.030)$ dpm $\times 10^6$ /mg ADN contra el valor promedio de los grupos experimentales que fue de $0.275 \pm (0.043)$ dpm $\times 10^6$ /mg ADN se observó una dispersión un poco mayor en la desviación estándar del grupo experimental que no se consideró significativa. Las desviaciones se calcularon con las mismas características descritas para la prueba de T de Student: (n-1) grados de libertad y $\alpha = 0.05$ ó 5% de nivel de significancia.

Los valores promedio del grupo control para la celularidad fueron de $5.020 \pm (0.437)$ mg ADN/gth y para los grupos experimentales de $4.856 \pm (0.592)$ mg ADN/gth. Se observó que la mayoría de los valores correspondientes a los grupos experimentales estuvieron dentro de los valores normales a excepción del grupo de 150 días de tratamiento con mebendazole que fue ligeramente menor.

En cuanto a los valores de colágena, el grupo control y experimental presentaron variaciones dentro de los rangos delimitados con la prueba de T de student y fueron respectivamente $20.157 \pm (4.251)$ mg de colágena/gts en el grupo control y $20.655 \pm (2.154)$ mg/gts para el grupo experimental; donde las diferencias encontradas estuvieron dentro del rango de desviación estándar y no fueron significativas o atribuidas a la acción del

TABLA VII

BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES, CONCENTRACION DE COLAGENA, ADN Y RELACION PROLINA/
HIDROXIPROLINA EN HIGADO DE RATAS SOMETIDAS A DIETA CON MEBENDAZOLE^{a)}

Tratamiento con Mebendazole (días)	Incorporación total (dpm x 10 ⁶ /mg ADN) ^{b)}	ADN (mg/g tejido húmedo)	Colágena (mg/g tejido seco)	Relación Pro/OH-Pro
0	0.268 ± (0.029) ^{c)}			
15	0.332 ± (0.045)	5.020 ± (0.437)		
30	0.222 ± (0.030)	5.048 ± (0.043)	20.157 ± (4.251)	13.977 ± (2.931)
45	0.281 ± (0.015)	5.709 ± (0.139)	23.150 ± (1.432)	13.660 ± (1.406)
60	0.252 ± (0.008)	4.832 ± (0.132)	19.936 ± (0.536)	14.115 ± (1.866)
90	0.333 ± (0.024)	4.449 ± (0.115)	22.957 ± (2.265)	14.313 ± (0.943)
150	0.239 ± (0.018)	5.128 ± (0.480)	20.059 ± (1.491)	13.586 ± (0.328)
		3.987 ± (0.124)	20.476 ± (2.518)	15.244 ± (2.016)
			17.376 ± (1.638)	17.601 ± (2.097)

- a) Grupo de ratas Sprague-Dawley hembras de 4 semanas de edad recibieron el mebendazole en la dieta (250 ppm).
- b) Los valores representan los resultados obtenidos utilizando de 3-4 animales por experimento.
- c) Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

fármaco.

En cuanto a los valores obtenidos para la relación prolina/hidroxi prolina se observó un valor promedio de $13.977 \pm (2.931)$ para los grupos control y el valor promedio para los grupos experimentales dió una relación de $14.586 \pm (1.626)$, que fue un promedio ligeramente mayor al normal pero cuya dispersión fue menor. Así mismo, se observó que los datos de los grupos experimentales caen dentro de las desviaciones obtenidas para un intervalo de confianza de 95%, por lo que no se consideraron ser diferencias significativas atribuibles al mebendazole.

En la Tabla VIII se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la incorporación de ^3H -prolina a proteínas totales de pulmón. No se observaron diferencias significativas al comparar grupos controles y experimentales, obteniéndose un valor promedio para los grupos control de $1.681 \pm (0.373)$ dpm $\times 10^6$ /mg ADN y para los grupos experimentales fue de $1.693 \pm (0.201)$ dpm $\times 10^6$ /mg ADN. Para los valores de ADN se obtuvo un promedio de los grupos controles que fue de $6.048 \pm (0.630)$ mg de ADN/gth y para los grupos experimentales de $6.279 \pm (1.242)$ mg ADN/gth. Con respecto al valor promedio no hubo demasiada dispersión pero en los grupos experimentales correspondientes a 90 y 150 días se obtuvieron los valores más elevados que explican la gran dispersión del promedio del grupo, ya que se salen de la media y desviación estándar de los grupos controles.

TABLA VIII

BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES, CONCENTRACION DE COLAGENA, ADN Y RELACION PROLINA/
HIDROXIPROLINA EN PULMON DE RATAS SOMETIDAS A DIETA CON MEBENDAZOLE

Tratamiento con Mebendazole (días)	Incorporación total (dpm x 10 ⁶ /mg ADN)	ADN (mg/g tejido húmedo)	Colágena (mg/g tejido seco)	Relación Pro/Oh-Pro
0	1.681 ± (0.373)	6.048 ± (0.630)	92.629 ± (10.682)	4.727 ± (0.795)
15	1.922 ± (0.008)	5.393 ± (0.123)	110.760 ± (4.895)	3.365 ± (0.072)
30	1.584 ± (0.057)	6.221 ± (0.329)	88.257 ± (3.924)	4.930 ± (0.450)
45	1.836 ± (0.234)	5.353 ± (0.030)	102.330 ± (2.953)	4.338 ± (0.125)
60	1.675 ± (0.277)	5.118 ± (0.154)	90.203 ± (4.115)	4.666 ± (0.008)
90	1.780 ± (0.344)	7.540 ± (0.277)	98.105 ± (3.155)	5.202 ± (0.304)
150	1.360 ± (0.304)	8.051 ± (0.069)	136.985 ± (9.224)	3.710 ± (0.288)

En cuanto al contenido de colágena del pulmón, el promedio de los grupos controles fue de $92.629 \pm (10.682)$ mg/gts y en los grupos tratados con mebendazole se obtuvo un valor promedio de $104.440 \pm (17.936)$ mg/gts. Cuando se compararon los valores en las diferentes etapas experimentales con el valor promedio, se observó que todo ellos cayeron dentro de él, salvo el grupo de 150 días de tratamiento, en el que el contenido de colágena fue mayor que el promedio (136.985 mg/gts).

La relación prolina/hidroxiprolina obtenida para los grupos controles fue de $4.727 \pm (0.795)$ y para los grupos tratados con mebendazole fue de $4.368 \pm (0.712)$, que abarca los valores contemplados en la media del grupo control a excepción de los grupos de 15 y 150 días que estuvieron ligeramente por debajo de los valores de dispersión, que posiblemente sean debidos a variaciones biológicas que no son significativos ni atribuibles al fármaco, ya que la síntesis de proteínas totales del pulmón se observó constante y dentro de los valores promedio, lo que excluye una disminución en la síntesis de proteínas en presencia del fármaco a estas concentraciones.

El esternón fue tomado como un órgano característico de tejido cartilaginoso hialino cuyo contenido de colágena es elevado y su dinámica en la biosíntesis de colágena es activa. Es un órgano muy pequeño en la rata y debido a esto no fué posible cuantificar su actividad biosintética por

falta de material biológico (aún tomando como mínimo 3 animales por ensayo). Por lo anterior se decidió determinar la celularidad del tejido, su contenido de colágena, la relación de proteínas colagénicas y no colagénicas, que de manera indirecta nos indican la dinámica de biosíntesis que presenta el tejido. Lo anterior fue con el objeto de observar el comportamiento del tejido y la posible interacción o acción del fármaco en el mismo.

En la Tabla IX se muestran los valores obtenidos para esternón. Los resultados de celularidad obtenidos para los grupos controles dieron un valor promedio de $2.886 \pm (0.727)$ mg de ADN/gth y para los grupos experimentales el promedio fué de $3.0440 \pm (0.411)$, donde no se observaron variaciones que no se contemplen en las desviaciones estándar estimadas con la prueba de T de Student. El contenido de colágena de esternón para los grupos controles fue de $44.185 \pm (15.142)$ mg/gts y en los grupos tratados con mebendazole se obtuvo un promedio de $47.929 \pm (6.396)$, que está dentro de las variaciones estándar obtenidas para un 95% de intervalo de confianza. Se observó un incremento paulatino en el contenido de colágena a mayor tiempo en los grupos experimentales, siendo igual en los grupos controles aunque en la tabla solo se presentan al tiempo cero, los valores promedio de los 6 grupos. Al comparar la desviación estándar se observó que todos los valores cayeron dentro de este rango, ya que el comportamiento es similar al grupo experimental.

CONCENTRACION DE COLAGENA, ADN Y RELACION PROLINA/HIDROXIPROLINA EN ESTERNONES
DE RATAS SOMETIDAS A DIETA CON MEBENDAZOLE

Tratamiento con Mebendazole (días)	ADN (mg/g tejido húmedo)	Colágena (mg/g tejido seco)	Relación Pro/OH-Pro
0	2.886 \pm (0.727)	44.185 \pm (15.142)	2.195 \pm (0.260)
15	2.886 \pm (0.008)	37.128 \pm (5.978)	2.255 \pm (0.309)
30	3.099 \pm (0.538)	47.666 \pm (1.822)	2.602 \pm (0.101)
45	3.493 \pm (0.090)	44.262 \pm (2.720)	2.821 \pm (0.035)
60	3.265 \pm (0.457)	52.969 \pm (2.996)	2.550 \pm (0.045)
90	3.209 \pm (0.716)	53.759 \pm (3.613)	2.857 \pm (0.031)
150	2.311 \pm (0.078)	51.799 \pm (2.498)	2.116 \pm (0.255)

El valor promedio de la relación prolina/hidroxiprolina obtenida para los grupos controles fue de $2.195 \pm (0.260)$ y para los grupos con tratamiento fue de $2.543 \pm (0.275)$. Consideramos que la dispersión en este parámetro puede deberse a variaciones biológicas de la población, ya que son poco significativas de acuerdo al intervalo de confianza utilizado.

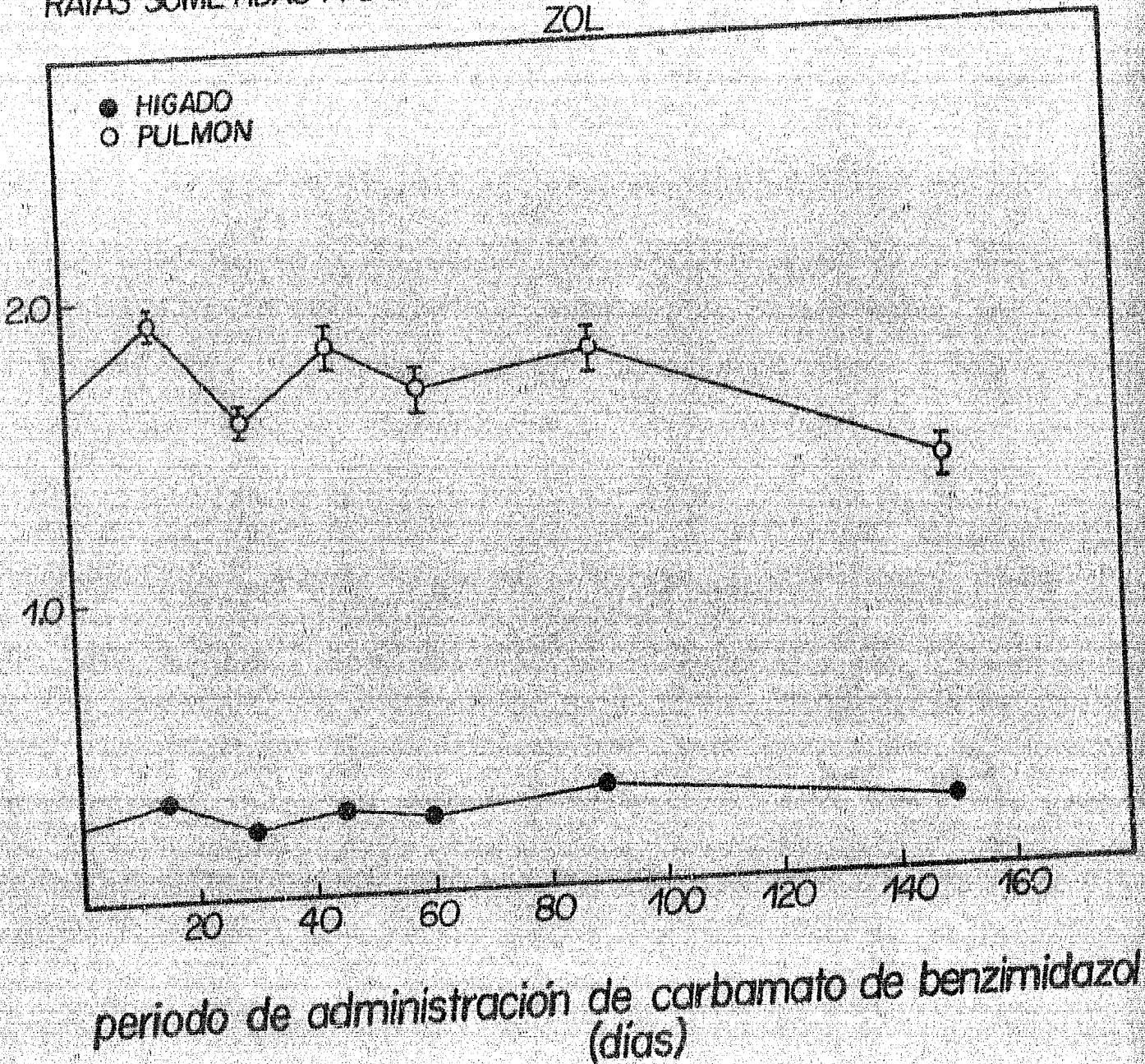
Síntesis de Proteínas Totales

En la Figura 5 se muestra la representación gráfica obtenida al comparar las incorporaciones de ^3H -prolina a los diferentes períodos de administración del fármaco para hígado y pulmón. Se observó que la síntesis se mantuvo constante en el hígado sin variaciones significativas durante el tratamiento. El pulmón presentó una ligera disminución en la incorporación hacia el final de los 2 puntos correspondientes a 90 y 150 días del tratamiento. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente estas variaciones no se consideraron significativas.

Concentración de Colágena

En la Figura 6 se presenta la variación en el contenido de colágena para hígado, pulmón y esternón. No se apreciaron variaciones en el contenido de colágena para el hígado; para esternón se obtuvo una curva

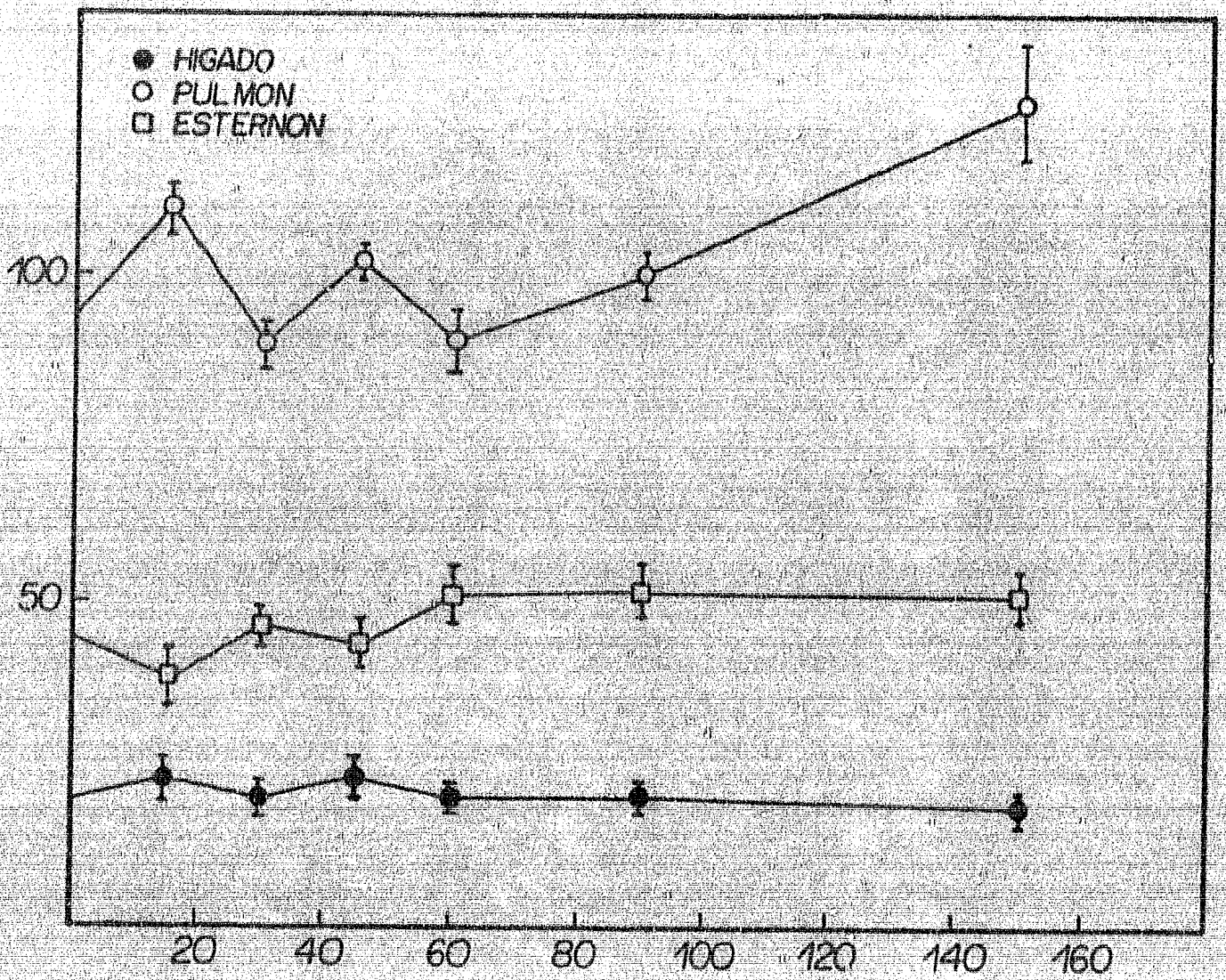
BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES EN DIFERENTES ORGANOS DE RATAS SOMETIDAS A DIETAS CRONICAS DE CARBAMATO DE BENZIMIDAZOL



periodo de administración de carbamato de benzimidazol (días)

Fig. 5. Efecto del Carbamato de Benzimidazole sobre la Síntesis de Proteínas Totales en Diferentes Organos de Ratas Sometidas a Dietas Crónicas del Fármaco: (●—●) Hígado y (○—○) Pulmón.

CONTENIDO DE COLAGENA EN DIFERENTES ORGANOS DE RATAS - SOMETIDAS A DIETAS CRONICAS DE CARBAMATO DE BENZIMIDAZOL



periodo de administración de carbamato de benzimidazol
(días)

Fig. 6. Concentración de Colágena en Diferentes Organos de Ratas Sometidas a Dietas Crónicas de Carbamato de Benzimidazol; (●—●) Hígado, (○—○) Pulmón y (□—□) Esternón.

que se incrementó paulatinamente, se detuvo y se mantuvo lineal a partir del día 60 del tratamiento. En el pulmón la concentración de colágena se mantuvo constante hasta el día 60 y posteriormente se incrementó hacia los 150 días de tratamiento con mebendazole.

Relación Prolina/Hidroxi prolina

La Figura 7 nos muestra la gráfica de la relación prolina/hidroxi prolina a lo largo del tratamiento con mebendazole. La relación fue lineal para esternón y para pulmón lo que indica que no hay variaciones en el depósito y contenido de proteínas en ambos órganos durante el tratamiento. En hígado se observó un incremento en la relación hacia los 90 días de la administración del fármaco que fue más pronunciado a los 150 días de la administración. Esto indica un aumento o mayor concentración de proteínas en el hígado hacia los 90 y 150 días del tratamiento.

Histología del Hígado

En la Figura 8 se presenta la histología hepática y las imágenes histológicas correspondientes a las letras A, B, C y D representan: A- hígado normal, B- hígado tratado con mebendazole durante 30 días, C- hígado con tratamiento por 60 días y D- 90 días de tratamiento con mebendazole.

RELACION PROLINA/HIDROXIPROLINA EN DIFERENTES ORGANOS DE RATAS SOMETIDAS A DIETAS CRONICAS DE CARBAMATO DE BENZIMIDAZOL

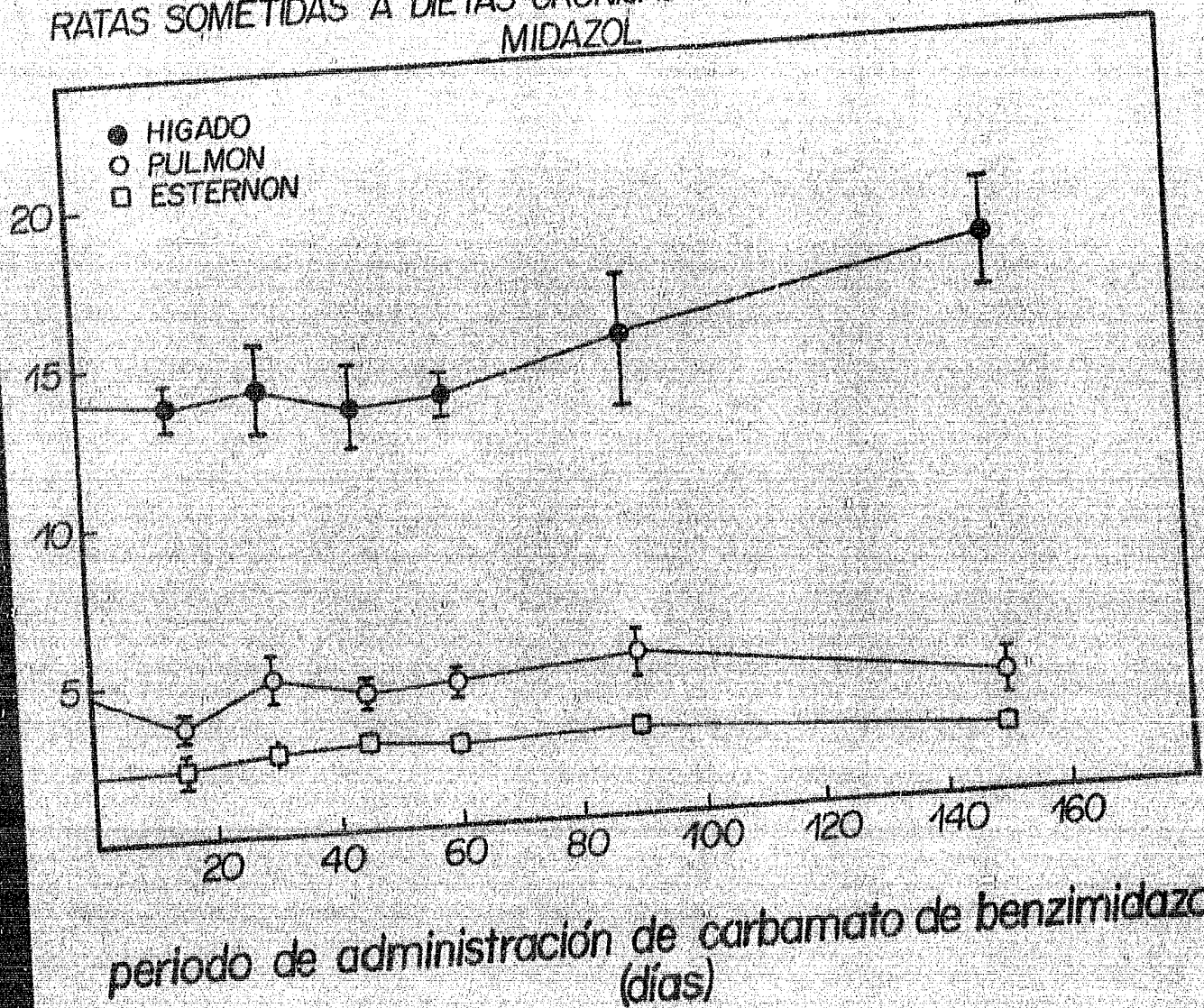
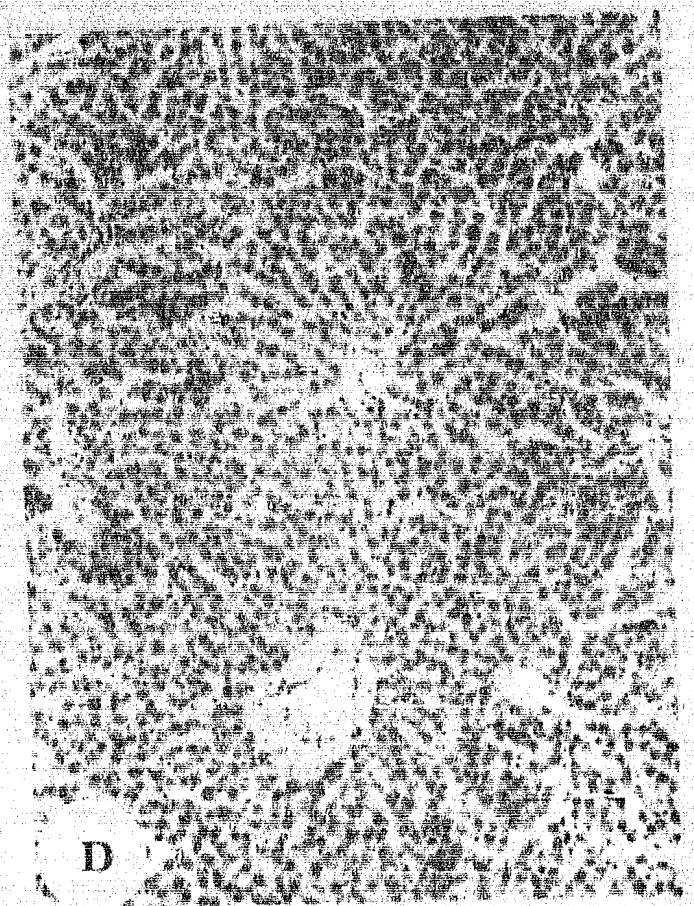
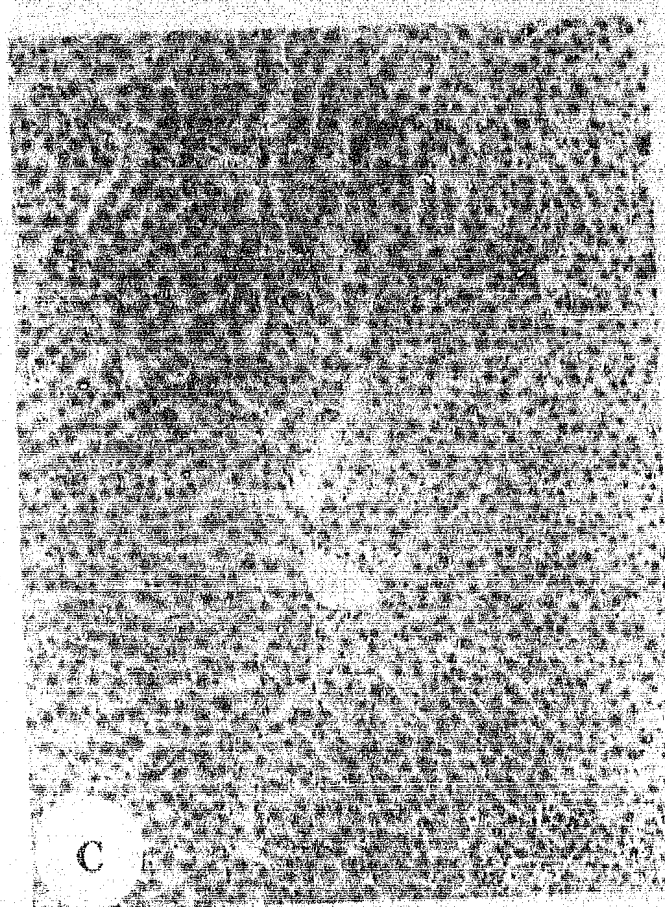
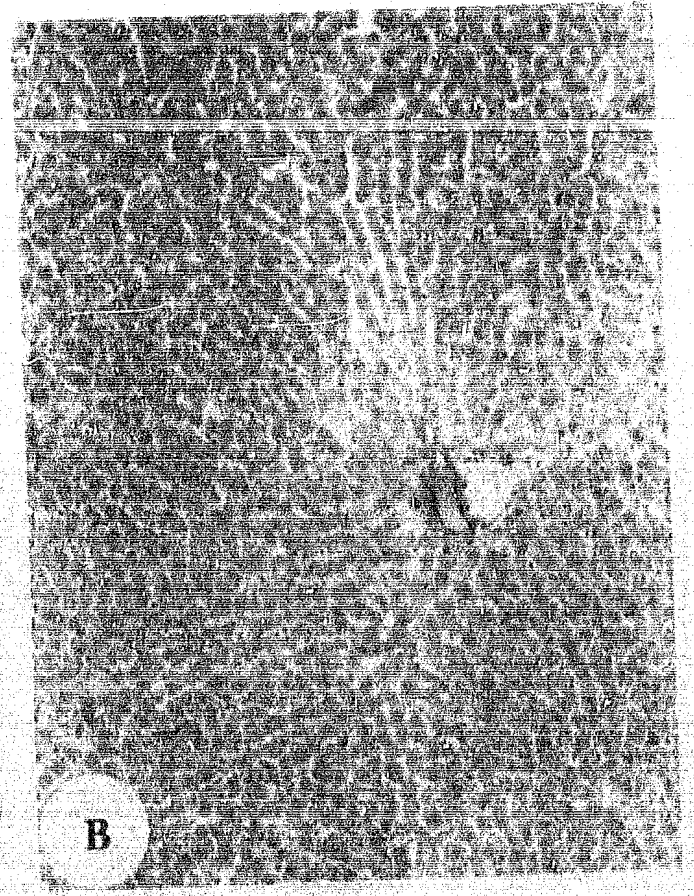
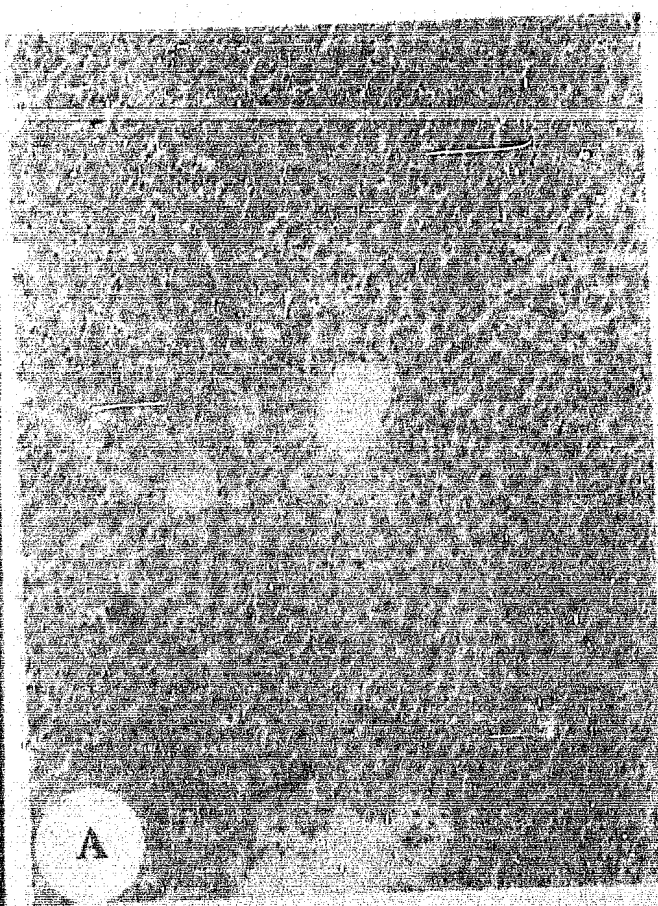


Fig. 7. Efecto del Carbamato de Benzimidazol sobre la Relación Proteínas Totales (Prolina)/Colágena (Hidroxiprolina) en Diferentes Organos de Ratas Sometidas a Dietas Crónicas del Fármaco: (●—●) Hígado, (○—○) y (□—□) Esternón.

Fig. 8. Microfotografías de Parénquima Hepático de Ratas Sprague-Dawley.
A) -Hígado Normal, B) -Hígado + CBZ durante 30 días, C) -Hígado
tratado con CBZ, por 60 días y D) - Hígado + CBZ durante 90 días.



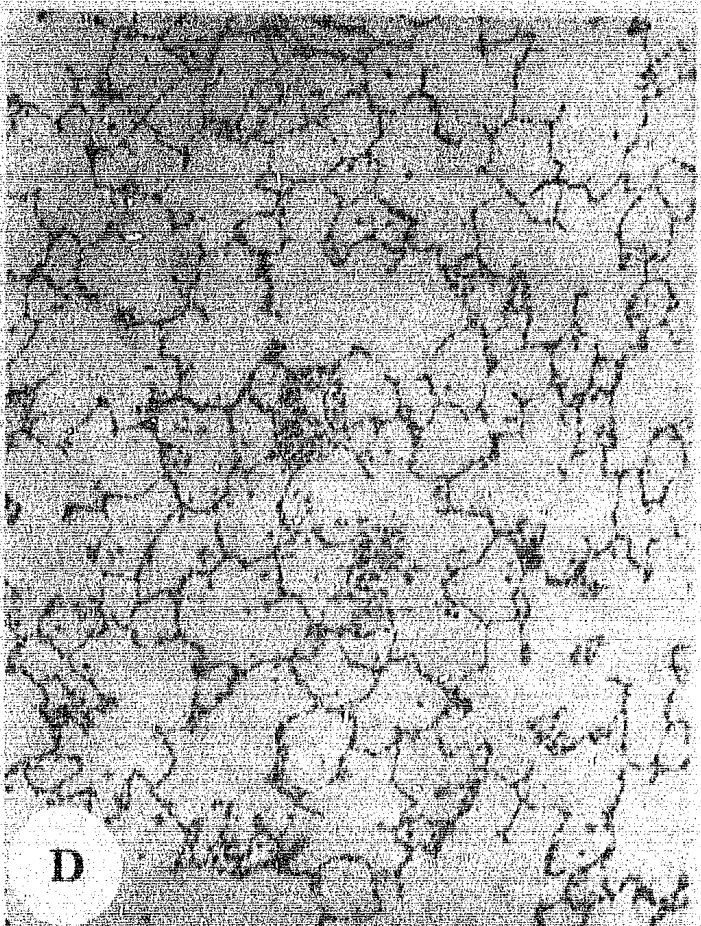
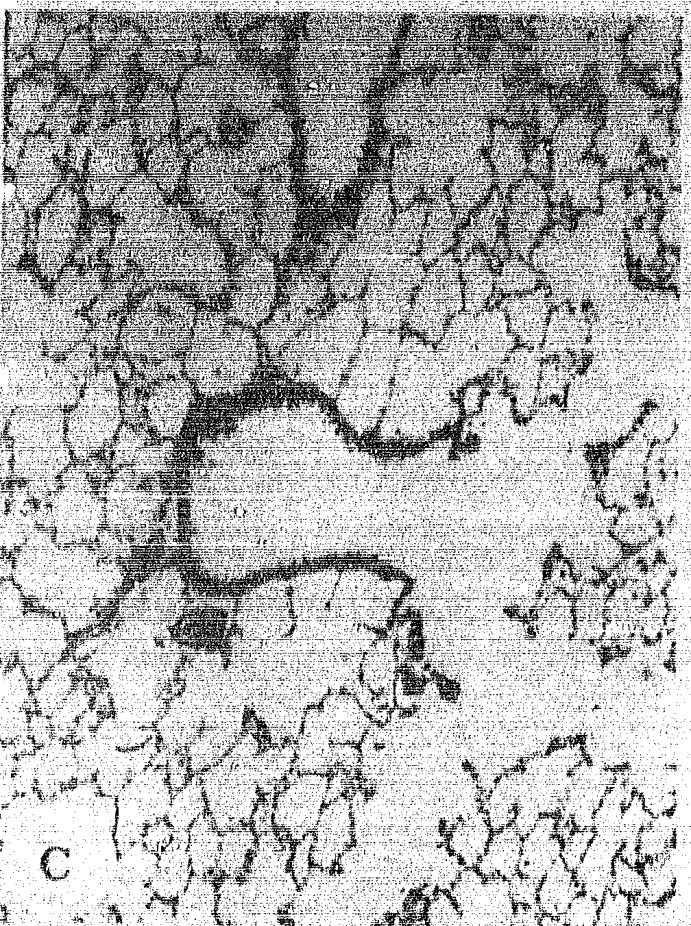
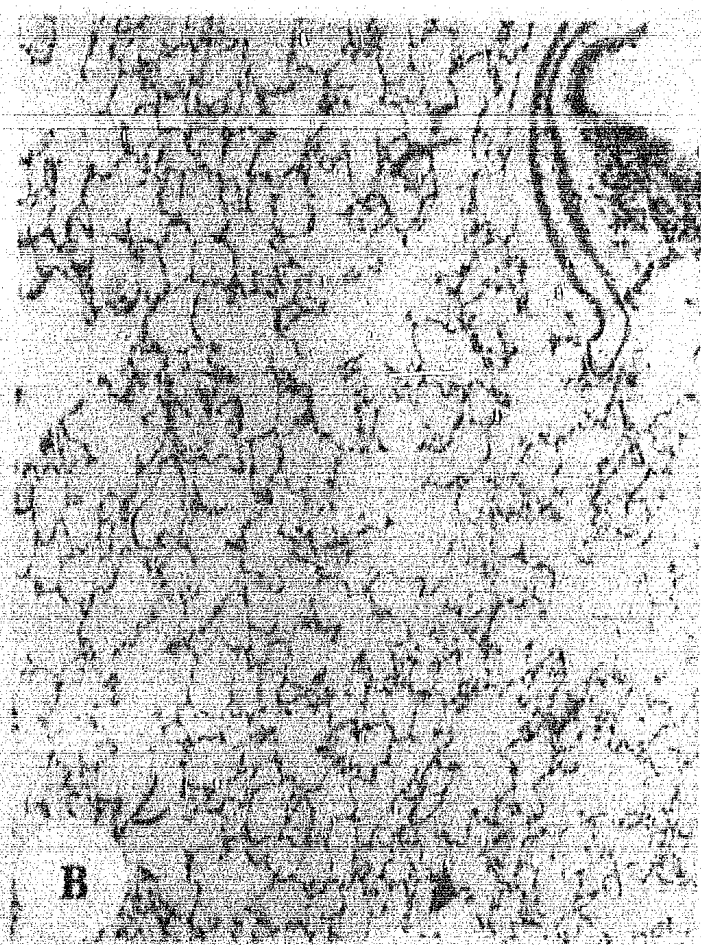
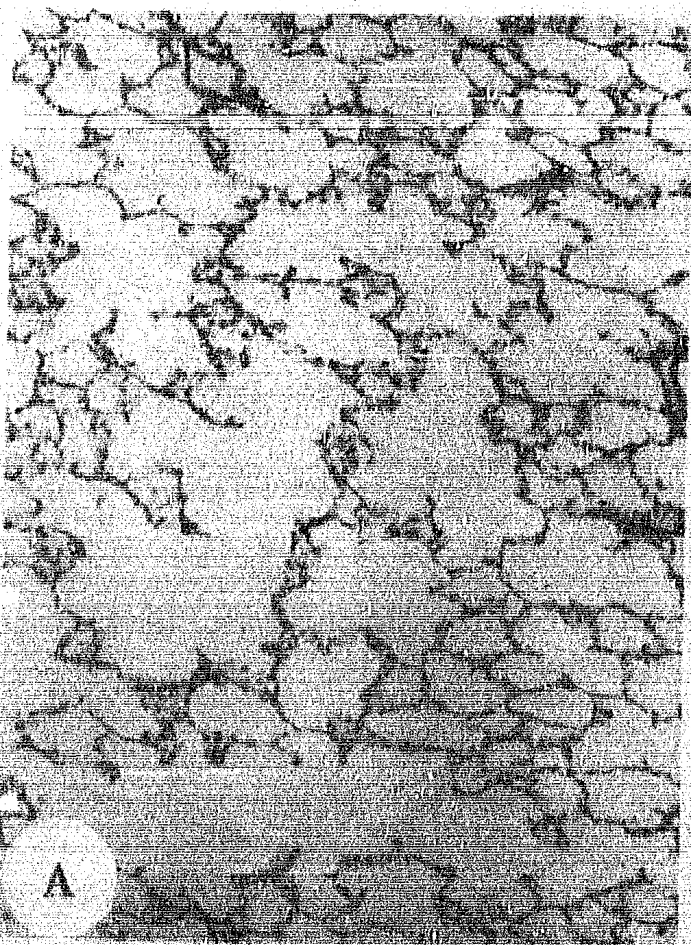
Se observó una ligera esteatosis que aumentó progresivamente con el tiempo de tratamiento, así como un pequeño infiltrado de células inflamatorias (predominantemente macrófagos y linfocitos), en las etapas avanzadas de la administración (90 y 150 días de tratamiento).

Histología del Pulmón

Los resultados del estudio morfológico correspondiente al pulmón se presentan en la Figura 9. Las imágenes histológicas correspondientes a las letras A, B, C y D representan: A- pulmón normal, B- pulmón tratado con mebendazole durante 30 días, C- pulmón tratado con mebendazole por 60 días, D- pulmón tratado con mebendazole durante 90 días.

En las imágenes histológicas del pulmón se observó un pequeño infiltrado de células inflamatorias en las etapas de 60 y 90 días, así como a los 150 días. Por lo que respecta a la arquitectura del pulmón no se observó ninguna alteración morfológica a lo largo del tratamiento aún iniciándolo en ratas jóvenes de 4 semanas de edad.

Fig. 9. Microfotografías de Parénquima Pulmonar de Ratas Sprague-Dawley.
A) Pulmón Normal, B) Pulmón + CBZ durante 30 días, C) Pulmón +
CBZ por 60 días y D) Pulmón + CBZ durante 90 días.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el desarrollo de este estudio se cuantificaron los parámetros bioquímicos de celularidad, biosíntesis de proteínas totales, contenido de colágena y su relación con proteínas totales mediante la proporción de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, con la finalidad de indagar el efecto de éste fármaco cuyo efecto antimicrotubular requería de un estudio a los niveles antes mencionados dada su naturaleza de acción. Nuestro interés fue obtener los valores normales de síntesis en los órganos señalados, considerando que por su arquitectura y función pudieran ser afectados por el fármaco en la administración prolongada a la dosis determinada experimentalmente y comparar los valores obtenidos después de la aplicación del fármaco.

Los resultados mencionados anteriormente nos sugieren que el carbamato de benzimidazole actúa en el hígado de la rata produciendo una ligera esteatosis, que bioquímicamente se correlaciona con el incremento de proteínas observado en la relación prolina/hidroxiprolina. Esto nos indica que se están reteniendo proteínas en el hígado como resultado de la actividad antimicrotubular de la droga. Se observó un aumento en el contenido de proteínas en el hígado, pero no se afectó la concentración de colágena hepática que como se observa en la Figura 5 se comportó linealmente, así como la síntesis de proteínas totales que se mantiene sin variaciones. Eviden

cias en microscopía indican que los agentes bloqueadores de microtúbulos producen una acumulación en vesículas secretorias (que se almacenan en el hepatocito) de lipoproteínas de muy baja densidad (IMBD) y proteínas, así como también se tienen evidencias de que fármacos como son la colchicina, vinblastina y vincristina producen un bloqueo a nivel secretorio y no a nivel de síntesis de proteínas. Estudios realizados acerca de la naturaleza de los productos secretados y productos colulares en hepatocitos de ratas Sprague-Dawley machos, revelaron que el efecto de ciertos compuestos como: carbamato de benzimidazole, nocodazole y parbendazole produjeron efectos similares a las mismas concentraciones que colchicina en la secreción de proteínas y IMBD y se observó que ninguno de los productos de síntesis ni la integridad metabólica juzgada por los niveles de ATP fueron afectados. Los hallazgos de este estudio indican que el bloqueo ocurrió a nivel de las vías de secreción (24,47).

En el estadio patológico de la cirrosis hepática por alcohol, el hígado se encuentra en el humano con un contenido abundante de fibroblastos, que sintetizan activamente colágeno. Esta proteína es excretada al espacio extracelular por vía microtubular (11,14,24,44 y 45). Debido a estas consideraciones si el fármaco se utiliza prolongadamente en este u otro padecimiento en el que se presente un desequilibrio en la síntesis o degradación de colágeno, se podría contratestar este efecto fibrosante que caracteriza a ésta y a otras enfermedades del tejido conjuntivo.

Otra observación que resulta interesante y que se correlacionó histológicamente con la incorporación de proteínas totales en este estudio, es que el mebendazole ha mostrado varios efectos inmunológicos. Algunos de ellos se observaron también en este estudio como fue el incremento de células mononucleares a nivel hepático y biliar. Se desconoce si la función de estas células ayuda a la degradación de colágena. Esto explicaría el ligero incremento en la síntesis de proteínas totales, producto de un número mayor de células que se reflejan bioquímicamente en el contenido de ADN e histológicamente en el infiltrado de células inflamatorias.

En un estudio de trasplante de corazón de rata, el mebendazole prolongó el tiempo de supervivencia de las ratas, lo que nos habla de que el fármaco interviene de alguna forma no especificada aún, en la función del linfocito T.

El posible mecanismo de acción del mebendazole podría desglosarse como sigue:

Se ha reportado que de la unión de la molécula de colchicina y la proteína tubulina, principal componente de los microtúbulos, se forma un isómero conformacional de las subunidades de ensamblaje del microtúbulo. Estos isómeros son los complejos colchicina-tubulina, que impiden la subsecuente adición de tubulina libre en el ensamblaje de los microtúbulos.

(10). Otros estudios han revelado que la colchicina y compuestos de la familia del benzimidazole como carbendazin y nocodazole, poseen en común una estructura análoga: un anillo de trimetoxibenceno que es responsable del efecto estimulante de la hidrólisis de GTP (23,63). El efecto estimulatorio de nocodazole fué mas alto debido a una mayor competitividad por los sitios de unión a tubulina con respecto a colchicina y como consecuencia de ello una hidrólisis más activa del GTP. Dado que para la polimerización de los microtúbulos se requiere de GTP libre, las drogas antimicrotubulares del tipo del mebendazole activan a la GTPasa (23, 63) que convierte GTP en GDP inhibiendo la polimerización del microtúbulo.

El sistema de activación del AMP cíclico está íntimamente relacionado con los niveles de GTP y GDP ya que para la activación de la adenil ciclasa (enzima que convierte ATP en AMP cíclico), es necesaria la presencia de GTP (64). El incremento de la actividad de la enzima GTPasa por efecto de la droga antimicrotubular, en este caso el mebendazole, producirá una disminución de GTP libre por lo que los niveles de AMP cíclico también se verán afectados. Algunos estudios indican que al disminuir los niveles de AMP cíclico se activan las funciones del linfocito T supresor. Otros estudios realizados con sustancias que elevan el AMP cíclico (prostaglandinas y toxina del cólera) en los linfocitos, han demostrado que se produce una disminución de las funciones del linfocito T supresor, favoreciendo la secreción de inmunoglobulinas (62).

De este estudio se desprenden varias interrogantes acerca del mecanismo de acción de este fármaco, algunas de ellas a nivel inmunológico, ya

que no es posible afirmar si el mebendazole interfiere directa o indirectamente en la disminución de los niveles de AMP cíclico o por el contrario eleva los niveles celulares de este nucleótido, el cual tiene implicaciones a nivel inmunológico y cuyo conocimiento es fundamental para el tratamiento de enfermedades autoinmunes del tejido conjuntivo. Es muy importante por lo anterior realizar futuros estudios en el linfocito y fibroblastos en presencia del mebendazole con relación a los niveles de AMP cíclico.

Los resultados de esta tesis nos indican que la administración crónica de mebendazole no produjo alteraciones a nivel de la arquitectura pulmonar ni hepática cuando se correlacionaron los parámetros bioquímicos e histológicos. En el caso de esternón no se observaron alteraciones bioquímicas significativas en los parámetros analizados, debido probablemente a que los niveles sanguíneos del fármaco son muy bajos y dado que su absorción intestinal es pobre. El posible uso de esta droga en tratamientos prolongados en el hombre puede sugerirse dado que el tiempo de tratamiento en las ratas fue de 1/5 de su vida, lo que representa en el humano aproximadamente 12 años de vida. Además, los animales fueron evaluados en etapas de desarrollo (4 semanas de edad), sin que se observaran complicaciones importantes.

Este trabajo aunado a los hallazgos previos a este estudio en la administración de mebendazole a ratas con cirrosis hepática producida con

CCl_4 (45), explica sus efectos como una droga antimicrotubular semejante a colchicina y cuyas características farmacológicas permiten minimizar efectos secundarios indeseables. Además, permite considerar la utilización del compuesto en el tratamiento de algunas enfermedades de la colágena, particularmente en aquellas patologías fibrosantes en las que no existe actualmente ningún tratamiento a pesar de variados y múltiples esfuerzos desarrollados en este campo (14).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Keystone J. y Murdoch J.K. 1979. Diagnosis and Treatment. Drug five years later: Mebendazole. *Ann. Int. Med.* 91: 582-586.
- 2.- Banerjee D., Prakash O.M. y Kaleyugaperumal L. 1972. A Clinical Trial of Mebendazole (R17, 635) in Cases of Hookworm Infection. *Indian J. Med. Res.* 60: 562-566.
- 3.- Borgers M., De Nollin S., Verheyen A. et al. 1975. Effects of New Anthelmintics on the Microtubular Sistem of Parasites; en: *Microtubules and Microtubules Inhibitors*, North Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 497-507.
- 4.- Verheyen A., Borgers M., Vanparijs O. et al. 1976. The Effects of Mebendazole on the Ultrastructure of Cestodes. *Jansen Pharmaceutica Research. Lab.*, p. 60.
- 5.- Brugmans J.P., Thienpont D.C., Wijngaarden I. et al. 1971. Mebendazole in Enterobiasis Radiochemical and Pilot Clinical Study in 1,278 Subjects. *J.A.M.A.* 217: 313-316.

- 6.- Peña C.A., Clyde W.J., Vellarejos Y.M. et al. 1973. Mebendazole an Effective Broad Spectrum Anthelmintic. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.* 22: 592-595.
- 7.- Ireland C.M., Grull K., Gutteredge W.E. et al. 1978. The Interaction of Benzimidazole Carbanate with Mammalian Microtubular Protein. *Biochem. Pharmacol.* 28: 2680-2682.
- 8.- Wilson L., Bamberg I.R., Mizel S.B. et al. 1974. Interaction of Drugs with Microtubule Proteins. *Fed. Proc.* 33: 158-166.
- 9.- Olmsted J.B. y Boris G. 1975. Microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 42: 507-540.
- 10.- Detrich W.H., Williams R.C. y Wilson L. 1982. Effect of Colchicine Binding on the Reversible Dissociation of the Tubulin Dimer. *Biochemistry* 21: 2392-2400.
- 11.- Ehrlich P.H., Ross R. y Bornstein P. 1974. Effects of Antimicrotubular Agents on the Secretion of Collagen. *J. Cell. Biol.* 62: 390-405.
- 12.- Harris E.D. y Krane S.M. 1971. Effects of Colchicine in Culture of Rheumatoid Synovium Arthritis. *Arthritis Rheum.* 14: 669-684.

- 13.- Rojkind M. y Kershenobich D. 1975. Effect of Colchicine on Collagen Albumin and Transferrin Synthesis by Cirrhotic Rat Liver Slices. *Biochim, Biophys. Acta* 378: 415-423.
- 14.- Kershenobich D., Uribe M., Suárez I.G. et al. 1979. Treatment of Cirrhosis with Colchicine. *Gastroenterology* 77: 532-536.
- 15.- Amery W.K. y Gough D.A. 1981. Levamisole and Immunotherapy: Some Theoretic and Practical Considerations and their Relevance to Human Disease. *Oncology* 38: 168-181.
- 16.- Ertel N.H., Mittler J.C., Akgun S. et al. 1976. Radioimmunoassay for Colchicine in Plasma and Urine. *Am. Assoc. Adv. Sci.* 93: 233-235.
- 17.- Van Der Bossche H. y De Nollin S. 1973. Effects of Mebendazole on the Absorption of Low Molecular Weight Nutrients by Ascaris Summ. Int. J. Parasitol. 3: 401-407.
- 18.- Borgers M., De Nollin S., De Brabander M. et al. 1975. Influence of the Anthelmintic Mebendazole on Microtubules and Intracellular Organelle Movement in Nematodes Intestinal Cells. *Am. J. Vet. Res.* 36: 1153-1166.

- 19.- De Nollin S. y Van Der Bossche H. 1973. Biochemical Effects of .
Mebendazole on Trichinella spiralis Larvae. J. Parasitol. 59:
970-976.
- 20.- Friedman O.A., Platzer E.G. y Carroli E.J. 1980. Tubulin
Characterization During Embryogenesis of Ascaris suum. Devel.
Biol. 76: 47-57.
- 21.- Friedman P.A. y Platzer E.G. 1980. Interaction of Anthelmintic
Benzimidazoles with Ascaris suum embryonic tubulin. Biochim. Biophys.
Acta 630: 271-278.
- 22.- Thienpont D. 1966. Tetramisole (R8299) a New Potent Broad Spectrum
Anthelmintic. Nature (London) 209: 1084-1086.
- 23.- Lin C.M. y Hamel E. 1981. Effects of Inhibitors of Tubulin Polymerization
on GTP Hydrolysis. J. Biol. Chem. 256: 9242-9245.
- 24.- Birkett C.R., Coulson C., Pogson C. et al. 1981. Inhibition of Secretion
of Proteins and Triacyl-glycerol from Isolated Rat Hepatocytes Mediated
by Benzimidazole Carbamate Antimicrotubular Agents. Chem. Pharmacol. 30:
1629-1633.

- 25.- Wilson J.F. 1978. A Clinical Trial of Mebendazole in the Treatment of Alveolar Hydatid Disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* 118: 747-757.
- 26.- Kammerer W.S. 1976. Chemotherapy of Hydatid Disease Echinococcus granulosus in mice with Mebendazole and Bethionol. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25: 714-717.
- 27.- Faith Haver R.N. 1981. Experience with Mebendazole in Guatemala. *Ann. Intern. Med.* 94: 415.
- 28.- Miskowitz P.F. y Javitt N.B. 1980. Leukopenia Associated with Mebendazole Therapy of Hydatid Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 1356-1358.
- 29.- García Lorenzo M.L. Rodríguez Montes J.A., Aticso Herreros, J. et al. 1980. Posibilidades Terapéuticas del Mebendazole en la Hidatidosis Hepática. *Rev. Clin. Esp.* 159: 133-136.
- 30.- Rivas-Alcalá A.L., Greene B.H., Taylor H. R. et al. 1981. 12 Meses de Seguimiento de Terapia con Mebendazole para Oncocercosis. *Lancet* 7: 1043, Letter.

- 31.- Woodhead-Galloway J. 1980. Collagen the Anatomy of a Protein. London. The Camelot Press Ltd. Southampton p.p. 2-7.
- 32.- Verztman L. 1973. Enfermedades Difusas del Tejido Conjuntivo Ed. Scheramex. S.A. de C.V. México. p.p. 27-30.
- 33.- Burton G. y Rabinovitch M. Connective Tissue Cap. 4. 1977. Histology (Wess, L. y Greep, R.O. Eds). Mc Graw-Hill Book Company. New York, pp. 145-178.
- 34.- Trelstad R. 1981. La Colágena. Mundo Científico La Recherche 1: 284-295.
- 35.- Ramachadran G.N. y Reddi A.H. 1976. Biochemistry of Collagen Ed. Plenum Publishing N.Y. p.p. 378-383.
- 36.- Viidik A. y Vuust. J. 1980. Biology of Collagen, Vol. I. Academic Press. New York. p.p. 34-52.
- 37.- Hance A.H. y Crystal R.G. 1975. The Connective Tissue of Lung. Am. Rev. Resp. Dis 112: 657-699.
- 38.- Miller E.J. 1976. Collagen Type I. Mol. Cell. Biochem. 13: 165-175.

- 39.- Prockop D.J. y Guzman N.A. 1977. Collagen Diseases and the Biosynthesis of Collagen. Hospital Practice p.p. 61-68.
- 40.- Bornstein P. y Sage E. 1980. Structurally Distinct Collagen Types. Ann. Rev. Biochem. 49: 957-1003.
- 41.- Fessler J.H. y Fessler L.I. 1978. Biosynthesis of Procollagen. Ann. Rev. Biochem. 47: 129-162.
- 42.- Kivirikko K.I. y Risteli L. 1976. Biosynthesis of Collagen and its Alterations in Pathological States. Review Article, Med. Biol. 54: 159-186.
- 43.- Prockop D.J. 1976. Intracellular Steps in the Biosynthesis of Collagen. en: Biochemistry of Collagen (Ramachandran, G.N. y Reddi A.H., Eds) Plenum Publishing N.Y. p.p. 163-273.
- 44.- Ehrlich H.P. y Bornstein P. 1972. Microtubules in Transcellular Movement of Procollagen. Nat. New Biol. 238: 257.
- 45.- Santamaría P. y Díaz de León L. 1984. Efecto de Mebendazole sobre la Síntesis de Colágena en la Cirrosis Hepática Experimental. Tesis. Fac. de Ciencias, Esc. de Biología, Universidad Veracruzana.

- 46.- Lapiere C.M. y Nusgens B. 1976. Collagen Pathology at the Molecular Level, en: Biochemistry of Collagen (Ramachandran G.N. y Reddi A.H., Eds) Plenum Publishing, N.Y. p.p. 377-447.
- 47.- Wolpert E. y Kershenobich D. 1982. Temas Selectos de Hepatología. Nueva Editorial Interamericana. México. p.p. 114-121.
- 48.- Guzeliaro P.S. y Diegelmann R.F. 1979. Localization of Collagen Prolyl Hydroxylase in the Hepatocyte. Exp. Cell Res. 123: 269-279.
- 49.- Rojkind M. y Kershenobich D. 1981. Hepatic Fibrosis. Clinics in Gastroenterology 10: 737-755.
- 50.- Kershenobich D. 1982. Uso de Colchicina en Enfermedad Hepática por Alcohol; en: Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades del Hígado y de las Vías Biliares. Clínica de Hígado, Depto. de Gastroenterología (Uribe M. y Wolpert. E. Eds) I.N.N. p.p. 219-230.
- 51.- Kravis T.C., Ahmed A., Brown T.B., et al. 1976. Pathogenic Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. J. Clin. Invest. 58: 1223-1232.
- 52.- Crystal R.G., Fulmer J.D., Roberts W.C., et al. 1976. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Ann. Int. Med. 85: 769-788.

- 53.- Leroy, C.E. 1974. Collagen and Human Disease. Bulletin of the Rheumatic Diseases, Published by the Arthritis Foundation. 25: 778-785.
- 54.- Harper E. 1980. Collagenases. Ann. Rev. Biochem. 49: 1063-1078.
- 55.- Asquith P. 1980. The Clinical Use of Levamisole: a Critical Review; en: Recent Advances in Clinical Immunology. Academic Press N.Y. p.p. 341-362.
- 56.- Kivirikko K.I. y Savolainen R.E. 1981. Genetic Disorders of Collagen. Focus on Research. Med. Biol. 59: 1-6.
- 57.- Bray G.A. 1960. A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aqueous Solution in a Liquid Scintillation Counter. Anal. Biochem. 1: 279-285.
- 58.- Yellowlees P., Greenfield C. y Mc Intyre M. 1980. Dimethylsulfoxide Induced Toxicity. Lancet 2: 1004-1006.
- 59.- Breikreutz D., Díaz de León L., Paglia L. et al. 1978. The Synthesis of Presumptive Procollagen Messenger Ribonucleic Acid in the Calvaria of the Developing Chick Embryo. Biochim. Biophys. Acta 517: 349-359.

60.- Burton K. 1968. Determination of DNA Concentration with Dihenylamine; en: Methods in Enzymology Section VII. (Colowick S.P. y Kaplan N.O., Eds) Academic Press Inc. New York. p.p. 163-168.

61.- Woessner J.F. 1961. The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportion of this Iminoacid. Arch. Biochem. Biophys. 93: 440-447.

62.- Stolleman G.H. 1982. Advances in Internal Medicine. Year Book. Med. Publishers. New York. 304-313.

63.- Andrew J.M., Wagenknecht T. y Timasheff S.N. 1983. Polymerization of Tubulin-Colchicine Complex. Relation to Microtubule Assembly. Biochemistry 22: 1556-1566.

64.- Williams R.H. 1981. Textbook of Endocrinology. Sixth Edition. W.B. Saunders Company. N.Y. p.p. 46-54.