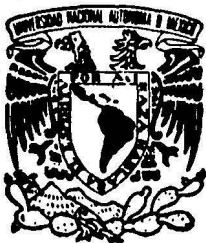


24/24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**"MEBENDAZOL Y CIRROSIS
HEPATICA EXPERIMENTAL"**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ARACELI PAEZ ARENAS



MEXICO, D. F.

1986



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.

C O N T E N I D O.

1.- INTRODUCCION	1
2.- FUNDAMENTO DEL TEMA	
2.1 Alteraciones Producidas por el Etanol	5
2.2 Cirrosis Hepática	11
2.2.1 Alteraciones Características de la Cirrosis Hepática	16
2.3 Colágena	19
2.3.1 Tipos de Colágena	24
2.3.2 Características Bioquímicas	28
2.3.3 Biosíntesis	30
2.3.4 Desórdenes de la Colágena	39
2.4 Alteraciones Producidas por CCl_4	43
2.5 Tratamientos Utilizados para Interfe- rir con la Síntesis o Acumulación de- Colágena	48
2.6 Microtúbulos	58
2.7 Mebendazol	
2.7.1 Propiedades Físicas	61
2.7.2 Mecanismo de Acción	62
2.7.3 Farmacocinética	63
2.7.4 Efecto Antimicrotubular	64
2.7.5 Toxicología	65

3.- ANTECEDENTES	66
4.- HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	69
5.- MATERIALES Y METODOS	71
- Inducción de la cirrosis	71
- Formación de los grupos experimentales	71
- Obtención del hígado	72
- Cuantificación de colágena tisular por determinación de hidroxiprolina en hidrolizados ácidos de los tejidos	73
- Cuantificación de protefnas totales - por determinación de prolina en hidrolizados de los tejidos	75
- Determinación de ADN	76
- Análisis morfológico	77
6.- RESULTADOS	78
- Grupo tratado con CCl ₄	78
- Grupo tratado con mebendazol (CBZ)	83
- Grupo tratado simultáneamente con CCl ₄ y CBZ	88
7.- DISCUSION DE RESULTADOS	97
8.- CONCLUSIONES	103
9.- BIBLIOGRAFIA	105

LISTA DE ABREVIATURAS

A. R.	Artritis reumatoide
ADN	Acido desoxi-ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BAPN	β -amino propionitrilo
C-terminal	Carboxilo terminal
DHA	Deshidrogenasa alcoholica
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
GTP	Trifosfato de guanosina
gts	Gramo de tejido seco
LMBD	Lipoproteínas de muy baja densidad
MEOS	Sistema de oxidación microsomal - del etanol
NAD	Nicotinamida adenin dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
N-terminal	Amino terminal
OH-Pro ; Hip	Hidroxiprolina
Pro	Prolina
R.E.	Retículo endoplasmático
R.E.L.	Retículo endoplasmático liso
R.E.R.	Retículo endoplasmático rugoso

1.- INTRODUCCION

En Estados Unidos y varios países más se han llevado a cabo estudios estadísticos que demuestran la existencia de un incre -
mento en la mortalidad debida a cirrosis hepática, llegando a -
constituir la quinta causa de muerte en adultos entre 25 y 64 -
años (1).

En los estudios que realizó Pequignot (2) en 1971, se consi -
dera que el riesgo de cirrosis alcohólica aparece cuando se con -
sumen 80 g de etanol/día (1 l de vino a 10°) y este riesgo es -
mayor para un consumo superior a 160 g de etanol/día (2 l de vi -
no). Estudios posteriores de este mismo autor (1980) revelaron -
que aunque alcohólicos con diagnóstico de cirrosis habían consu -
mido en promedio 180 g de etanol/día durante un período de 25 -
años, ingestas tan bajas como 40 g (hombres) y 20 g (mujeres) re -
presentaban un incremento en el riesgo de desarrollar cirrosis.-
Se ha demostrado que el etanol es realmente tóxico para el hepa -
tocito y puede inducir el desarrollo de cirrosis hepática.

Dentro de las múltiples complicaciones del alcoholismo, la -
enfermedad hepática por alcohol es probablemente la más letal y -
la principal causa de consumo de recursos de salud pública. Una -
vez que se establece el daño hepático por alcohol, no existe has -
ta la fecha ningún tratamiento que haya demostrado ser efectivo -
para detener la progresión clínica de la enfermedad hepática, -
aún después de suspendida la ingesta de alcohol.

La cirrosis hepática es la vía final más común de todos los -
padecimientos crónicos que afectan al hígado en forma difusa. -

Los cambios tisulares que finalmente causan la cirrosis en el al-
cohólicismo, generalmente ocurren al cabo de un período de varios -
años y pueden permanecer clínicamente en silencio, hasta que el -
paciente tiene un cuadro de cirrosis bien establecido. Sin embar-
go, hay pacientes que inicialmente presentan hepatitis alcohólica
y en quienes la cirrosis se desarrolla gradualmente, por lo que -
un mejor entendimiento de los factores involucrados en su instala-
ción, desarrollo y progresión permitirán diseñar medidas terapéu-
ticas adecuadas.

La cirrosis hepática se puede considerar como un grupo de al-
teraciones crónicas y difusas del hígado caracterizado por necro-
sis celular, regeneración del parénquima, fibrosis con formación-
de nódulos y desorganización de la arquitectura lobulillar, debi-
do a la producción aumentada, así como el depósito excesivo de -
proteínas colagénicas en el intersticio del parénquima hepático -
(3,4). Se puede decir que en la actualidad no existe un tratamien-
to adecuado para esta enfermedad, aún cuando se puedan mejorar -
transitoriamente algunas de sus complicaciones secundarias como -
son: el sangrado, la hipertensión portal, la ascitis y la encefá-
lopatía hepática (5). En un estudio prospectivo realizado en pa-
cientes cirróticos a los que se les administró colchicina por vía
oral, se observó una mejoría del funcionamiento hepático, cuando-
se compararon con el grupo control (cirrótico con placebo). En es-
te estudio preliminar no se demostró de una manera concluyente -
que existieran cambios morfológicos que indicaran una disminución
del estado fibrótico de los pacientes (6).

Estudios previos han demostrado que el mebendazol, un fármaco utilizado ampliamente en el tratamiento de las helmintiasis, -inhibe la formación de microtúbulos. Esta inhibición se ha estudiado "in vivo" e "in vitro" y se sabe que el compuesto se une específicamente a la tubulina con una afinidad mayor que la colchicina e impide su polimerización (7). Además, este compuesto es muy poco soluble en agua, su absorción intestinal es baja (0.5 -- 1.0%), el compuesto absorbido es metabolizado a 2-amino-5(6)-hidroxibenzilbenzimidazol el cuál es eliminado en la orina.

Resultados previos realizados en ratas de 4 semanas de edad (etapa de desarrollo), a las cuales se les administró mebendazol en forma crónica, no mostraron alteraciones bioquímicas ni morfológicas en diferentes órganos corporales (pulmón, hígado y estérnón) en un tiempo de tratamiento de 150 días, este tiempo corresponde en los animales a aproximadamente 1/5 de su vida, lo que representa en el humano cerca de 12 años de vida (8).

En un estudio posterior, ratas a las cuales se les indujo cirrosis hepática con tetracloruro de carbono y después se les trató con mebendazol durante 3, 7 y 11 semanas, mostraron una reducción de la fibrosis producida por CCl_4 la cual se verificó bioquímica e histológicamente. También se observó que un grupo de animales que fue agredido durante 11 semanas con CCl_4 mostró una sobrevivencia del 50% al ser tratados con mebendazol durante la agresi3n (9).

En base a estos estudios el objetivo de la presente tesis es, determinar el posible efecto protector del mebendazol, simul-

táneamente al desarrollo del protocolo de inducción de cirrosis -
hepática experimental. Se espera que el compuesto tenga efecto -
primario sobre la producción de colágena hepática, ya que inhibe-
la polimerización de tubulina y en consecuencia la formación de -
microtúbulos, estructuras necesarias para que la colágena sea se-
cretada.

2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA.

2.1.- Alteraciones Producidas por el Etanol.

De estudios farmacocinéticos se sabe que en el intervalo de una hora después de haber ingerido alcohol, aproximadamente el 90% es absorbido a nivel del estómago e intestino delgado. El 5% del alcohol absorbido es eliminado a través de la piel, pulmón y riñón y el 75% es catabolizado en el hígado. Por ser una molécula pequeña y debido a su débil carga eléctrica, el etanol es altamente miscible y puede difundirse rápidamente a través de los capilares y otras membranas, mezclándose con toda el agua del cuerpo - (10).

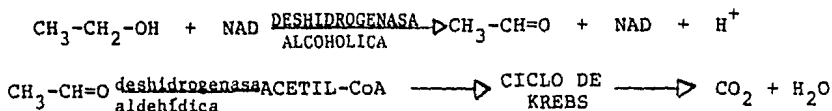
Una vez que el etanol llega al hígado es metabolizado, utilizando algunos de los tres sistemas enzimáticos que posee el hepatocito para tal fin. Estos sistemas oxidan el etanol a acetaldehído, el cuál es de 10 a 30 veces más tóxico que el etanol, y son:

- A) Enzima deshidrogenasa alcohólica (DHA), presente en el citosol
- B) Enzima catalasa, que se encuentra en los peroxisomas.
- C) Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS por sus siglas en inglés), localizado en el retículo endoplasmático liso (R.E.L.).

La actividad de estos tres sistemas oxidativos se explica, por la presencia de cantidades variables de etanol en el cuerpo, que son derivados de fermentaciones bacterianas en el intestino - (3). El etanol es catabolizado en acetaldehído, parte de éste se-

incorpora en el ciclo de Krebs y puede convertirse en carbohidra-
tos y grasa. Pero la mayor parte se convierte finalmente en CO₂ y
agua (3).

La función de la enzima deshidrogenasa alcohólica es catali-
zar la reacción:



Esta enzima es la responsable del metabolismo del etanol en
concentraciones de 20mmol.

Para que en un paso posterior el acetaldehído sea convertido
en acetil-coenzima A, se requiere la actividad de deshidrogenasa-
aldehído y reservas adecuadas de NAD. La etapa que limita el pro-
ceso en esta vía del metabolismo del etanol, parece ser, la dispo-
nibilidad hepática de NAD y no los valores de la deshidrogenasa -
aldehídica (11).

El efecto tóxico del etanol sobre el hígado, estriba en que
produce cantidades elevadas de NADH₂, por lo tanto, aumenta la -
proporción de NADH₂/NAD. En consecuencia, se inhiben las vías oxi-
dativas en la célula hepática y se observa una disminución neta-
de la oxidación de lípidos y de la oxidación de quilomicrones en-
el hígado (12).

Durante el consumo crónico de alcohol, la actividad de la -
deshidrogenasa alcohólica (DHA) puede permanecer constante o dis-
minuir. Trabajos realizados por Crow y colaboradores demostraron-

que, bajo ciertas circunstancias, el nivel de la actividad de DHA puede estar limitado por el metabolismo del etanol; por lo tanto, la disminución observada en la actividad de DHA después del consumo crónico de etanol, puede tener una significancia funcional (13).

También se ha postulado, que el etanol a través de un aumento en la demanda de oxígeno, puede generar hipoxia y producción de radicales libres agravando el daño hepático. Se ha sugerido que una reducción en los requerimientos de oxígeno a través de medicamentos antitiroideos pudiera prevenir el daño hepático. Al disminuir la tensión normal de oxígeno en la zona privenular puede cambiar el estado redox del hígado, lo cual puede dañar la zona hepática por muchos efectos tóxicos, incluyendo la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de proteínas (14).

Se ha postulado que el aumento en el consumo de oxígeno es debido a:

- A) Aumento del papel ó actividad de la actividad de la inducción del sistema de oxidación microsomal del etanol -- (MEOS).
- B) Reoxidación relativamente incompleta de NADH en la mitocondria del hígado, posiblemente asociado con un incremento de los niveles de catecolaminas o de hormona tiroidea.

El metabolismo acelerado del etanol aumenta la producción de acetaldehído, el cual incrementa la actividad microsomal y la producción de enzimas del R.E.L. Por otra parte, los fármacos sufren un proceso de biotransformación en el organismo, éste se efectua-

mediante la intervención de enzimas intracelulares. La biotransformación puede dar lugar a la formación de sustancias farmacológicamente más activas que el fármaco original (activación) o bien a metabolitos con poca o ninguna acción (detoxificación).

Por lo anterior, el etanol puede afectar indirectamente la producción de enzimas del R.E., que pueden activar algunos fármacos y convertirlos en hepatotóxicos, aumentando sus efectos adversos, como sucede en el caso del tetracloruro de carbono. También puede inactivar algunos fármacos mediante los mecanismos de ⁽¹⁵⁾:

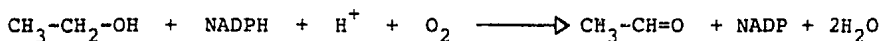
- A) Glucuronidación.
- B) Acetilación.
- C) Interacción con glutatión.

Esta interacción con los fármacos puede activar compuestos potencialmente carcinógenos y posiblemente, explique el incremento de la incidencia de cáncer en los alcohólicos ⁽¹⁵⁾.

Lieber describe el sistema de oxidación microsomal (MEOS) como un sistema que puede oxidar el etanol 10 veces más que la catalasa. Este sistema requiere de NADPH y O₂, es relativamente insensible a inhibidores de catalasa y tiene la capacidad de oxidar alcoholes alifáticos de cadena larga. Este sistema fue separado de la DHA y de la catalasa por cromatografía en columna de dietilamino etil celulosa. El sistema fue reconstituido y se encontró que está compuesto por el citocromo P-450, NADPH-citocromo P-450-reductasa y fosfolípidos ⁽¹⁶⁾. Estudios realizados en conejos demostraron que posiblemente el sistema microsomal de oxidación etanólica representa un mecanismo diferente al de la deshidrogena

sa alcohólica y que acelera el catabolismo del etanol a concentraciones elevadas, fenómeno no observado en la DHA. Se ha demostrado la existencia de estos dos sistemas en el hombre (17).

El sistema de oxidación microsomal del etanol cataliza la reacción:



Se ha observado que el etanol aumenta los requerimientos de colina, posiblemente por aumento en la oxidación de ésta (18), lo anterior sugiere que el etanol altera ciertos factores dietéticos. Anteriormente se pensaba que solamente en condiciones dietéticas anormales, tales como dietas pobres en proteínas y altas en colesterol se podría inducir lesión hepática (19). Sin embargo, se demostró que un grupo de mandriles, los cuales fueron sometidos a dietas de etanol y suficientes nutrientes, desarrollaron no sólo hígado graso después de dos a cinco años, sino también daño hepático y un tercio de los casos progresaron a cirrosis. Por lo tanto, es evidente que el etanol juega un papel tóxico importante en el desarrollo del daño hepático.

Actualmente ya no se considera que la mala nutrición juegue un papel primario en la producción del daño hepático, pero se ha reafirmado como un coadyuvante debido principalmente a que el daño hepático perjudica los procesos de digestión, así como la absorción o activación de nutrientes, pudiéndose producir un agotamiento selectivo de los mismos. Lo anterior puede derivarse en daño orgánico específico como la lesión lisosomal, resultado del agotamiento

to de la vitamina A ⁽²⁰⁾. El uso terapéutico de la vitamina A es complicado debido a que cantidades excesivas de ésta son hepatotóxicas y el consumo de alcohol aumenta la susceptibilidad. Una posible explicación a la toxicidad de la vitamina A puede ser por un aumento en la producción microsomal de metabolito tóxico.

Existen otros dos factores que probablemente aceleran más el metabolismo del etanol y que son ⁽¹⁷⁾:

- A) La hepatomegalia, que se refleja en un incremento en la actividad de la masa celular y aumento en la capacidad para remover el etanol.
- B) El acetaldehído, producido por el sistema DHA ó MEOS, el cuál es un producto tóxico del metabolismo de etanol y que aumenta después del consumo crónico del etanol.

Se ha observado que en animales alimentados con etanol y exposición crónica de acetaldehído, aparecen alteraciones morfológicas en las mitocondrias del hígado que se caracterizan por aumento de tamaño y la presencia de crestas anormales asociadas con dificultad funcional, especialmente disminución de la oxidación de ácidos grasos ⁽²¹⁾. También presentan disminución en el contenido del citocromo "a" y "b" y en la actividad de deshidrogenasa succínica ⁽²²⁾. La actividad de las enzimas de la matriz mitocondrial, como la deshidrogenasa glutámica, deshidrogenasa málica y la aspartato-amino-transferasa, se ha encontrado incrementada en pacientes con enfermedades del hígado ⁽²¹⁾.

Se ha observado que pacientes con alcoholismo crónico están propensos a desarrollar atrofia gástrica, por lo que incrementan su

retención de proteína plasmática durante la ingesta, lo cual conduce a una menor producción de eritrocitos, por lo que existe una anemia y una mala absorción de proteínas en la población alcohólica.

Por otra parte, la exposición de la mucosa intestinal a varias concentraciones de etanol provoca, una disminución del transporte de glucosa y algunos aminoácidos, así como de agua, sodio y tiamina (10).

En la figura 1 se muestran las anormalidades metabólicas que puede producir el abuso en la ingesta de alcohol.

2.2.- Cirrosis Hepática.

Existen diversos factores que pueden causar lesión difusa del hígado, originando cuadros morfológicos diversos de cicatrización, al igual que distintos estadios de enfermedad. Todas las formas de cicatrización en cirrosis producen: tejido cicatricial, aparición de nódulos regenerativos hiperplásicos; es frecuente la presencia de ictericia y se encuentran alteradas las funciones hepáticas (3).

Es generalmente aceptado que la cirrosis del hígado es una enfermedad irreversible. La irreversibilidad está asociada principalmente a la presencia o incremento del tejido conjuntivo en el hígado. El mayor componente proteínico de este tejido es la proteína denominada colágena (23)

Existen diferentes clasificaciones para la cirrosis hepática, la siguiente, es de acuerdo a su etiopatogenia y porcentaje de distribución (3):

E T A N O L

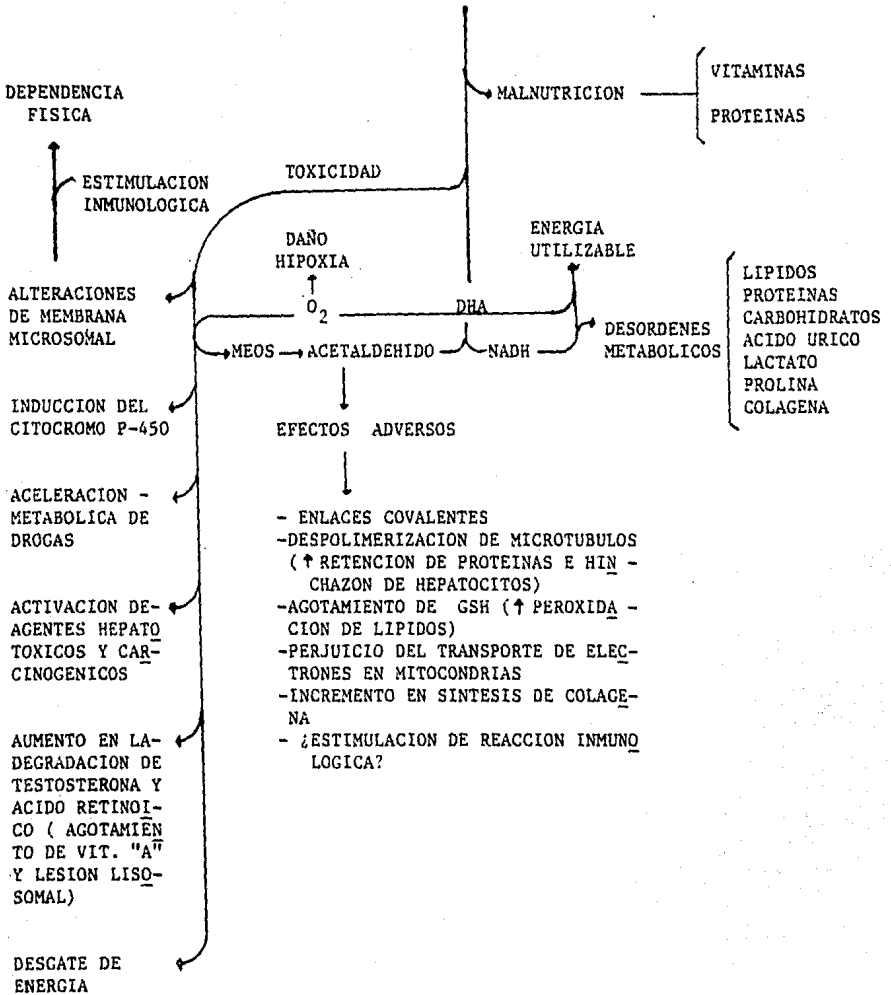


Figura 1.- Anormalidades Hepáticas, Nutricionales y Metabólicas Después del Abuso del Etanol.

(Hepatology; 4:6.1244.1984)

- I.- Cirrosis Asociada con el Abuso del Alcohol, de Laennec, Portal, Alcohólica-Nutricional.
- II.- Cirrosis Asociada con Hemocromatosis (Cirrosis Pigmentaria). Son trastornos causados por almacenamiento de hierro, existen cantidades elevadas de hemosiderina, - en la mayoría de los pacientes predomina la insuficiencia hepática o los signos de hipertensión portal.
- III.- Cicatrización Posnecrótica. Se desarrolla insidiosamente y puede ser la etapa final de algunas formas de hepatitis crónica, viral o inmunológica. Las cicatrices son característicamente gruesas y los nódulos resultan de la regeneración tisular.
- IV.- Cirrosis Posthepatítica.- Se caracteriza por cicatrización fina trabecular, que rodea los lobulillos aislados o múltiples del hígado, respetando la arquitectura intralobular. El tejido fibroso raramente reúne y aprisiona un solo lobulillo como ocurre en forma característica en la cirrosis por alcohol.
- V.- Cirrosis Biliar.- Caracterizada por cicatrización difusa pero delicada y ordenada del hígado, nace a nivel de los conductos biliares en las triadas portales y se extiende comunicándose con triadas vecinas. Las causas más comunes de esta cicatrización son: cálculos biliares, neoplasias, atresia biliar y/o estrechamiento de conductos biliares.
- VI.- Tipo Indeterminados y Diversos.- Entre los que se encuentra la enfermedad de Wilson o Degeneración Hepato-

lenticular. Es un trastorno genético del metabolismo de cobre, debido a una síntesis inadecuada de ceruloplasmina, proteína plasmática que fija el cobre, por lo tanto es transportada en unión muy laxa con la albúmina disociándose fácilmente y depositándose en el hígado, ganglios basales, corteza cerebral, riñón y córnea.

La cirrosis asociada con el abuso excesivo de alcohol constituye el tipo más frecuente y se le conoce con varios nombres (Alcohólica-Nutricional, de Laennec y portal).

En E.U. y en otras sociedades de alto nivel económico, el problema creciente del alcoholismo crónico, guarda, evidentemente una estrecha relación con la frecuencia de este tipo de cirrosis. Clínicamente la cirrosis comienza con la pérdida del apetito y debilidad generalizada. Si la enfermedad no es detectada, los signos de importancia funcional tardan en desarrollarse. Cuando existe una lesión grave, las células del hígado se regeneran sin dejar cicatriz residual. Pero cuando existe una lesión crónica se presenta una cicatrización generalizada.

Las lesiones más frecuentes producidas en el hígado por el etanol son: esteatosis, que es generalmente asintomática y está caracterizada por la acumulación de triglicéridos en forma de pequeñas gotas en los hepatocitos, algunas veces puede llevar a la ruptura de la membrana celular. Después del consumo crónico de etanol, el número de miofibroblastos y otras células mesenquimatosas se incrementan (24).

La obstrucción de las raicillas intrahepáticas de la vena - porta, causadas por cicatriz fibrosa o por la expansión de nódulos de regeneración provocan hipertensión portal. La hipertensión portal puede estar causada por: cirrosis en un 90% de los casos, - por obstrucción de la vena portal producida por obstrucción neoplasica, trombosis y/o insuficiencia cardiaca congestiva prolongada.

Con la hipertensión portal la presión en los sinusoides hepáticos está aumentada, por lo que se incrementan las anastomosis entre la vena porta y arteria hepática que se desarrollan como consecuencia de procesos inflamatorios y respiratorios que tienen lugar en la génesis de la cicatriz. En la formación de las vías venosas colaterales, las más importantes se hallan en el plexo esofágico, estas vías se sobre cargan y forman várices- pudiendo éstas llegar a romperse y producir una hemorragia masiva que suele causar la muerte.

En el desarrollo de la hipertensión portal hay cambios tales como ascitis, formación de vías venosas colaterales y esplenomegalia. La ascitis es la acumulación intraperitoneal de líquido acuoso que contiene protefna (principalmente albúmina), glucosa, sodio y potasio en concentraciones prácticamente iguales a las de la sangre.

El aumento de la presión sinusoidal origina un incremento de trasudación y la formación de linfa dentro de la cavidad abdominal que se ve incrementada, pudiendose acumular varios litros de este líquido. Por otra parte, la acumulación de lípidos, pro-

tefnas, aminoácidos, agua y electrolitos incrementan el tamaño del hepatocito. Se ha asociado la presencia de hepatocitos hinchados con la reducción del espacio intercelular lo cual contribuye al incremento de la presión portal observado en el estado precirrótico.

Jahn (25) ha demostrado que en las células del hígado de rata, los filamentos intermedios del citoesqueleto son necesarios para permitir una organización estructural adecuada de la membrana plasmática, de las mitocondrias y del núcleo dentro de la célula, esta estructura integral puede perderse en el hepatocito conteniendo cuerpos de Mallory en la hepatitis alcohólica. La pérdida de esta organización puede ser un mecanismo involucrado en el daño celular en las enfermedades del hígado.

En la hepatitis alcohólica la lesión histológica básica es el edema celular, esta lesión se presenta particularmente en la zona 3 del lóbulo y es más pronunciada en la vena hepática, la necrosis determinada por ella puede estar asociada con fibrosis, con esteatosis y colestasis. El alcohólico crónico casi siempre empieza por sufrir hígado graso, pudiendo éste derivar a una necrosis y una posterior fibrosis, acompañada de retracción progresiva del órgano. La fibrosis de localización perivenular puede proveer un índice de progresión hacia la cirrosis (24).

2.2.1.- Alteraciones Características de la Cirrosis Hepática.

Los mecanismos que intervienen en la acumulación de grasa en el hígado son:

- A) Aumento del transporte de grasa desde la periferia hacia el hígado.
- B) Disminución de la oxidación de ácidos grasos.
- C) Aumento en la síntesis de triglicéridos.
- D) Trastornos en la movilización de lípidos en forma de lipoproteínas.

Como el alcohol moviliza los depósitos de grasa, aumenta su transporte hacia el hígado y simultáneamente bloquea su utilización, esta grasa se acumula dentro de los hepatocitos. Con concentraciones suficientes de alcohol se producirán no sólo cambios grasos sino también lesiones de las células hepáticas (3).

La evolución morfológica de la cirrosis es primeramente un hígado voluminoso liso, de color amarillo, evidentemente grasoso. Las células hepáticas pueden estar hinchadas, produciendo cierta estasis biliar y pueden encontrarse cuerpos de Mallory en el citoplasma. Conforme aumenta la lesión disminuye gradualmente el volumen del hígado y finalmente se vuelve nodular. En los estadios tempranos, se observan muchos filamentos con un diámetro de 5 mm y fibras con diámetro de 10 mm alrededor de los miofibroblastos. Morfológicamente estas fibras se han considerado como colágena tipo III (26).

Posteriormente, el hígado cambia a un color rojizo debido a la congestión y presenta cicatrización difusa. Los nódulos tienen dimensiones variables que van desde 0.1 a 1.0 cm de diámetro los mayores resultan de la regeneración producida por el desarrollo progresivo de la cicatrización. Esta etapa empieza alrededor

de las zonas portales y acaba extendiéndose hasta conectar triadas portales vecinas. Cuando la enfermedad se activa hay necrosis unicelular que origina un infiltrado neutrófilo local. Cuando estos cambios comprometen a todo el lóbulo, así como a su armazón reticular subyacente, no puede haber regeneración. Sin embargo, las células hepáticas adyacentes pueden proliferar y producir nódulos de elementos celulares que carecen de una función normal en la secreción y excreción de bilis.

Finalmente, el hígado se retrae hasta ser un órgano fibrótico, tiene un color cada vez más pardo, no hay cuerpos de Mallory, la actividad regenerativa decrece por lo que la cicatrización se vuelve más intensa, predominando grandes bandas de colágena. En pacientes con cirrosis alcohólica, la prolina e hidroxiprolina libres en suero se encuentran incrementadas, aunque estos incrementos no son específicos. No se ha demostrado que las concentraciones elevadas de prolina libre induzcan la síntesis de colágena (17). Se ha observado que el lactato y el acetaldehído estimulan la síntesis de colágena en cultivos de miofibroblastos (27). Subsecuentemente, la actividad de colagenasa puede decrecer y contribuir a la acumulación de colágena.

La patogénesis de la fibrosis puede ser explicada por (28):

- A) Un incremento en la síntesis de colágena.
- B) Una disminución de la degradación de colágena.
- C) La combinación de ambos factores.

Evidencias experimentales sugieren que un deterioro de la degradación y reabsorción de colágena están involucrados en la transición del estado reversible al irreversible de la enfermedad. Es-

to podría deberse a:

- 1.- Cambios en la actividad de colagenasa, la cuál puede ser causada por disminución en la síntesis de la enzima, por un defecto en la activación del precursor de la misma o por exceso de inhibidores enzimáticos.
- 2.- Una disminución en la susceptibilidad del sustrato, la cuál puede generarse debido al incremento de enlaces cruzados y polimerización de colágena, o el secuestro de sustrato dentro de un compartimiento inaccesible a los mecanismos de degradación (29).

2.3 Colágena.

La colágena es la protefina más abundante del cuerpo humano y fue aislada por Smith, Gross y Highberger en los años 50's. Posteriormente siguiendo los trabajos de Astbury los investigadores Ramachandran y Kartha en 1954 establecieron los detalles sobre la teoría de la estructura de la colágena, proponiendo que cada una de las tres cadenas que la constituyen se enrollan en una hélice izquierda dando a su vez a una superhélice derecha (30).

La colágena constituye aproximadamente 1/3 del total de las protefinas del cuerpo y la mayor parte del tejido conjuntivo, tal como piel, tendones, hueso, así como las membranas que están en los tejidos superficiales o epiteliales. Esta protefina sirve como el mayor componente estructural del organismo (31-33).

La colágena en los vertebrados se encuentra distribuida de la siguiente manera: 40-60% se localiza en piel, del 10-20% en hueso

so, dentina y cartilago y en los vasos sanguineos del 7 al 8%. El tejido con mayor contenido de colágena es la piel y el tendón; - los órganos internos y músculos poseen pequeñas cantidades y casi no hay asociación con el tejido nervioso. La propiedad distintiva de la colágena es que forma fibras insolubles que tienen una fuerza tensil alta (30).

El tejido conjuntivo consiste de células esparcidas en una - matriz compuesta de agua estructural, iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+), fibras de colágena dispuestas principalmente en forma de numerosos haces de filamento y éstos, por la unión de filamentos - más finos o fibrillas. En algunos tejidos pueden encontrarse conjuntamente mucopolisacáridos y elastina, o como en el caso del - hueso, cristales de hidroxapatita (fosfato de calcio), células - adiposas, células fagocíticas (macrófagos) y células cebadas.

La proporción relativa de la colágena y los demás constituyentes varia de acuerdo al tejido y a las circunstancias específicas como son las reacciones inflamatorias en las que se identifica can otras células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células linfocíticas y monocitos.

Esta proteína también se encuentra constituyendo tejidos que deben ser resistentes y al mismo tiempo, estar dotados de propiedades particulares como la córnea, el revestimiento transparente del globo ocular, así como válvulas cardiacas (31,32). El tejidoconjuntivo alveolar es el menos especializado, teniendo muchos - componentes que incluyen una gran variedad de tipos celulares y - fibras de elastina.

Los factores que determinan la estructura del tejido son:

- A) Variación de las proporciones de las moléculas de co-
lágena, elastina y proteoglicanos.
- B) Variación en los tipos genéticamente diferentes de co-
lágena.
- C) Variaciones en las modificaciones postraduccionales -
de la colágena.
- D) Diferentes tipos de proteoglicanos, que son proteín--
polisacáridos en los que las unidades repetitivas de-
disacáridos se unen covalentemente a las proteínas -
(dermatan y keratan sulfatos, etc.).
- E) Arreglo topográfico particular de macromoléculas y cé-
lulas.

Las funciones conocidas de la colágena en el tejido conjun-
tivo son:

- 1) Proveer la fuerza tensil en todos los tejidos; esta fuerz
za está dada por el efecto de:
 - a) La formación de enlaces intra e intermoleculares.
 - b) Las fuerzas de fricción entre fibrillas y fibras de -
colágena.
 - c) Las interacciones físicas y/o químicas de la colágena
con otras estructuras en los componentes de la matriz
extracelular.
- 2) Permitir que el tejido no sea rígido; lo anterior result
tará del arreglo espacial de las fibras y fibrillas que-
permitira un deslizamiento entre ellas y un posterior re
torno a su estado original.

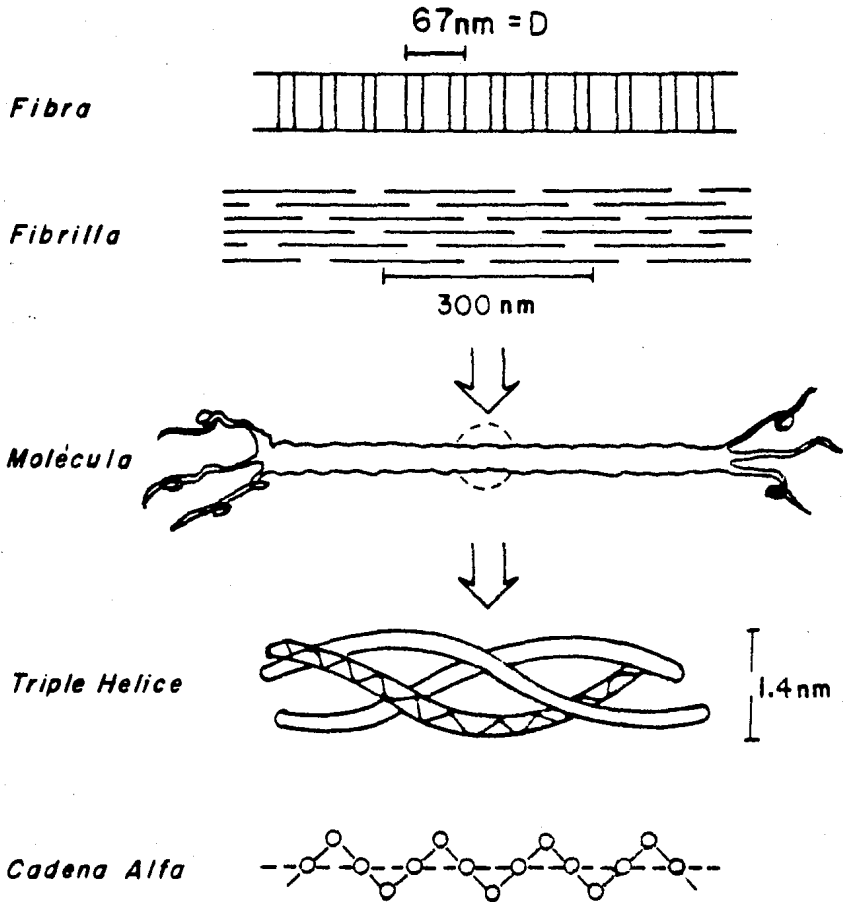
- 3) Limitar el movimiento de otros componentes tisulares.
- 4) Servir como sustrato para el depósito de cristales de hidroxapatita interviniendo en el crecimiento, remodelación y reparación del hueso (33).

Es por esto que los cambios o defectos en la síntesis y/o procesamiento de las moléculas, dan como resultado defectos o cambios en la estructura o función del tejido conjuntivo. En enfermedades como el escleroderma, algunos tipos del síndrome de Ehlers-Danlos, dermatosparaxis (enfermedad en gatos y carneros), escorbuto, síndrome de Marfán, cirrosis hepática y algunas otras se pueden encontrar alteraciones que originan, lo que se conoce, en conjunto como enfermedades de la colágena.

Se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos genéticamente definida en la cadena polipeptídica determina la conformación tridimensional la cual es esencial para la actividad biológica de las proteínas. En el caso particular de la colágena esta secuencia determina en la estructura de la molécula: la formación de una triple hélice, con una longitud de 180 nm a 300 nm, 1.4 nm de espesor y un peso molecular de 280 000 a 300 000 daltones y la asociación lateral y longitudinal de las moléculas para la formación de las fibrillas, como se puede observar en la figura 2, que muestra la formación de las fibras de la colágena.

En 1963 K. A. Piez y colaboradores (34), demostraron que la molécula de colágena comprendía tres cadenas polipeptídicas y en el análisis obtuvieron dos componentes: un componente o fracción

FIBRA DE COLAGENA



Secuencia
de
Amino Acidos



Figura 2.- Estructura de la fibra de colágena.

ligera que fue denominada fracción α (alfa) y la otra exactamente dos veces el peso de la anterior, que se denominó β (beta) sugiriendo este hecho que la fracción consistía de dos cadenas α - unidas entre sí. Una característica particular de todas las moléculas de colágena es su asociación en forma de triple hélice, - que resulta por el enrollamiento de tres cadenas, de las cuales se han reconocido hasta el momento 12 variedades diferentes. Por la asociación de 1 X 3 el número potencial de diferentes moléculas de colágena sería $12^3 = 1738$. Sin embargo, el número real de moléculas existentes es pequeño y se han identificado únicamente 10 tipos genéticamente diferentes de colágena (35).

2.3.1.- Tipos de colágena.

Aún cuando se ha hablado de la colágena como una proteína, - en realidad es una familia de proteínas, cada una es genéticamente distinta y se ha asociado con una función estructural particular (31,32). De un tipo a otro de colágena las moléculas difieren por la naturaleza de las cadenas que la componen, así como por su secuencia de aminoácidos (tabla I).

El primer tipo de colágena fue llamado tipo I, actualmente, se han reconocido y caracterizado 10 tipos distintos de colágena. Los más conocidos son los tres tipos de colágena intersticial - (tipos I, II y III), que son los más abundantes en el tejido conjuntivo de piel, hueso, tendón, etc. Los menos abundantes (tipos IV y V) representan microambientes de células pertenecientes a otras localizaciones tisulares (membranas basales y órganos internos).

TABLA 1. CARACTERISTICAS Y LOCALIZACION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENA.

TIPO	CADENAS	CARACTERISTICAS	FORMA DE AGREGACION	LOCALIZACION
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	más abundante.	bandas de fibras de 67 nm.	piel, hueso, etc.
II	$\alpha 1(II)$	más abundante	pequeñas bandas de fibras de 67 nm.	cartilago, humor vítreo.
III	$\alpha 1(III)$	forma reticular en cartilago, - abundante	pequeñas bandas de fibras de 67 nm.	piel, vasos sanguíneos, órganos inter-nos, etc.
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV)$	membrana basal.	forma mallas, no es fibrilar.	en todas las membranas basales.
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	abundante	pequeñas fibras	es mayor en tejidos intersticiales.
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	microfibrillas	bandas de fibras de 100 nm.	es mayor en tejidos intersticiales.
VII	----	cadena larga	dímero FLS ^{a)}	fibras de anclaje.
VIII	$\alpha 1(VIII)$	pequeña hélice en tándem	-----	algunas células endoteliales.
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	es el menor en proporción de cartilago, contiene unidos glicosaminoglicanos	-----	cartilago.
X	$\alpha 1(X)$	cadena corta	---	cartilago mineralizado e hipertrófico.

a) El término FLS se refiere a las moléculas de colágena arregladas en antiparalelo.

Las fibras formadas por la colágena tipo I fluctúan entre 50 y 300 nm de diámetro y presentan un arreglo en bandas de 67 nm que es característico de esta proteína, se localizan predominantemente en piel, tendón, hueso, ligamentos, córnea y órganos internos.

La colágena tipo II es sintetizada durante la condrogénesis en el crecimiento del hueso y del cartilago, se ha reportado que el humor vítreo y la retina de los ojos contienen este tipo de colágena; tiende a formar mallas no fibras, que forman una red junto con proteoglicanos, está presente principalmente en cartilago.

El tipo III es el menos abundante de las colágenas intersticiales y está generalmente asociada con el tipo I y glicoproteínas formando con estas últimas fibrillas reticulares, se encuentra en arterias, músculo, pulmón, hígado y piel. Se sabe que la síntesis de colágena tipo I y colágena tipo III puede efectuarse simultáneamente en el mismo tejido, como ocurre en el pulmón.

El tipo IV de colágena contiene un dominio globular que no se elimina durante el procesamiento de la proteína, es el mayor constituyente de la membrana basal, se localiza rodeando músculos, nervios y grasa.

El tipo V se asemeja a las colágenas intersticiales en que tiene un precursor, en la longitud de su molécula y la estabilidad de la triple hélice a la pepsina, forma pequeñas fibras, las cuales se localizan frecuentemente en la periferia de las células del músculo liso.

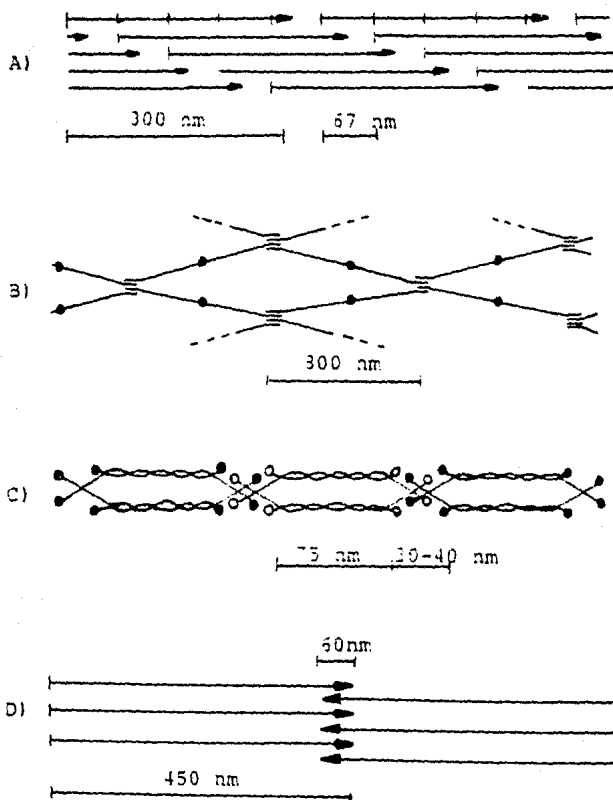


Figura 3.- Modelos de la Asociación de las Macromoléculas de los Diferentes Tipos de Colágena.

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

El tipo VI tiene una estructura molecular única y se encuentra como microfibrillas en el intersticio del tejido conjuntivo, las cuales están formadas por dímeros y tetrameros que tienen - una asociación simétrica.

El tipo VII se solubiliza por digestión con proteasas, está formada por estructuras diméricas en antiparalelo, hay similitud entre los constituyentes de este tipo de colágena y las fibras - de anclaje de la membrana basal en el tejido del estómago.

El tipo VIII, también conocido como colágena E.C., se observó en algunas células endoteliales, aún no se ha caracterizado - suficientemente.

El tipo IX, también conocida como tipo M ó colágena HMW-LMW, es el menor constituyente colagénico en cartílago, contiene algunos dominios no-helicoidales los cuales son atacados por proteasas dando como resultado los fragmentos HMW (alto peso molecular) y LMW (bajo peso molecular). No se ha determinado su organización.

El tipo X es conocida como cadena corta ó tipo G., es el mayor producto del cultivo de condrocitos y de regiones calcificadas de cartílago, aún no se ha establecido el arreglo de éste tipo de colágena.

En la figura 3 se puede observar los modelos de la asociación de las macromoléculas de los diferentes tipos de colágena.

Usando anticuerpos fluorescentes se ha demostrado que una - célula puede sintetizar simultáneamente más de un tipo de colágena y que las proporciones y los tipos pueden cambiar con las condi

diciones del cultivo. Lo anterior implica que debe existir un mecanismo bioquímico intracelular que permita el ensamble específico de las diferentes cadenas α . Posiblemente algunas de las propiedades físico-químicas determinadas por la secuencia de los aminoácidos en las regiones terminales de los precursores de las cadenas α , sean las responsables de éste ensamble.

Existe evidencia de que los genes para cada tipo de colágeno se encuentra en diferentes cromosomas, por lo tanto, se ha postulado que se expresan de manera independiente. Esto permitiría cierta selectividad con respecto al tipo y proporción de las colágenas sintetizadas en un momento dado por diferentes células. Se ha observado que la proporción de los diferentes tipos de colágeno cambian con el tiempo en un mismo tejido; por ejemplo: el tipo III constituye más del 60% de la colágeno en piel fetal, pero representa menos del 20% de la colágeno en la del adulto.

2.3.2 Características Bioquímicas.

Bioquímicamente la colágeno es una proteína singular, la glicina constituye el 33% de sus aminoácidos, lo que permite que cada tercer residuo de cada cadena polipeptídica esté ocupado por glicina, este es un aminoácido cuyo grupo R es hidrógeno lo que permite que las cadenas α formen la triple hélice, cada una de las tres cadenas polipeptídicas tiene aproximadamente 1,000 aminoácidos, por lo tanto, la estructura de la cadena puede ser considerada como repeticiones del triplete único Gli-X-Y. Frecuentemente la prolina ocupa la posición X y la hidroxiprolina la posición Y. Estas cadenas polipeptídicas pueden ser represen-

tadas por la fórmula $(\text{Gli-X-Y})_n$. Cada cadena de la molécula se enrolla en una hélice izquierda con tres aminoácidos por vuelta, cada tres cadenas se enrollan a su vez hacia la derecha para formar una superhélice derecha, produciendo una fibra que tiene rigidez, gran firmeza y resistencia (34).

La repetición del triplete Gli-X-Y es un requerimiento absoluto para la formación de la triple hélice. Aunque la hidroxiprolina es aproximadamente el 10% del total de los aminoácidos que contiene la colágena, este aminoácido raramente se encuentra en otras proteínas animales. La molécula de colágena debe en parte su estabilidad al grupo hidroxilo de la hidroxiprolina que permite establecer puentes de hidrógeno entre los residuos de los aminoácidos de dos cadenas adyacentes. La rigidez está proporcionada principalmente por la naturaleza compacta de la glicina y la estructura cíclica de la prolina e hidroxiprolina, que limitan la rotación de las cadenas polipeptídicas contribuyendo a la estabilidad de la triple hélice. En 1973 se demostró que el grupo hidroxilo es determinante para conferir estabilidad a la fibra, ya que la colágena que no posee hidroxiprolina solo es estable a temperaturas bajas. En los mamíferos 2/3 de las posiciones X y Y de la colágena están ocupadas por otros aminoácidos. Estos otros aminoácidos disminuyen la estabilidad de la hélice, pero son esenciales para la organización de la molécula (34).

La glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina se encuentran en la molécula de colágena sin carga neta, su función es la formación de la triple hélice, en cambio aminoácidos como lisina, ácido glutámico, aspártico y arginina, si presentan una carga neta. Estos residuos cargados o hidrofóbicos tienden a agruparse, determinando-

así la manera en la que se han de asociar las moléculas de colágena unas con otras.

La colágena posee otro aminoácido hidroxilado, la hidroxililisina, que proviene de la hidroxilación de la lisina en el 5º átomo de carbono. La hidroxililisina es requerida para la formación de enlaces intermoleculares para estabilizar las fibrillas, formadas por la asociación de varias moléculas de colágena, una deficiencia de ésta da como resultado una menor fuerza tensil de las fibras.

2.3.3.- Biosíntesis.

Una de las características de la biosíntesis de la molécula de colágena, es que sufre un gran número de modificaciones postraduccionales, algunas de ellas se efectúan dentro de la célula, mientras que otras se llevan a cabo en el espacio extracelular.

En el seno de la célula, la formación de la molécula depende de la síntesis previa de las cadenas que la comprenden, cada una de las cadenas α (alfa) es el resultado de la traducción de un ARN mensajero específico. Se ha estimado que el ARN mensajero para procolágena es por lo menos de 4 500 nucleótidos de largo, para codificar los aminoácidos que constituyen cada cadena pro α y por lo tanto, el peso molecular será aproximadamente de 1.5×10^6 daltones ó mayor.

Una molécula de ARNm copia de un gene particular, determina por su secuencia de nucleótidos el orden de los aminoácidos que constituyen el polipéptido, la traducción se efectúa a nivel de

los ribosomas, situados en el citoplasma en el límite de las cavidades que constituyen el retículo endoplasmático rugoso (R.E.R.).

La colágena se sintetiza primeramente como una molécula mayor ó precursor llamado procolágena, las cadenas individuales son llamadas cadenas pro α . Estas son sintetizadas como prepro α , las cuales tienen aproximadamente 100 residuos adicionales en el comienzo del amino terminal (NH_2). Esta porción extra representa el péptido "señal", el cuál dirige a la molécula al lumen del R.E., el péptido "señal" es removido de la preprocadena inmediatamente después de entrar la molécula al R.E., transformándose en cadenas pro- α . Estudios realizados con aminoácidos radiactivos han mostrado que las extensiones de las cadenas α_1 y α_2 proceden de igual porción y cada cadena es sintetizada por polipéptidos secuenciales en aproximadamente 4.8'. En un experimento de marcaje usando Cis (S^{35}), ésta se incorporó primero dentro de los propéptidos del amino y posteriormente en el carboxilo, la radioactividad total en el propéptido del carboxilo de pro 1 es dos veces mayor que para pro α_2 . Por todos estos estudios se sugirió que cada cadena pro α_1 y pro α_2 son sintetizadas separadamente como propéptidos continuos, que los ARNm activos están presentes para las dos cadenas en proporción 2:1 y que, la proporción de iniciación, elongación, terminación y liberación en los polisomas son idénticas para las dos cadenas.

Las procadenas constan de una región colagénica (Gli-X-Y)₃₃₃ y dos regiones no colagénicas, amino y carboxilo terminales. El propéptido del NH_2 terminal está constituido por tres dominios

estructuralmente distintos: uno de ellos es globular, y es donde se localiza el punto de ataque de la enzima procolágena-N-peptidasa. El peso molecular de éste péptido es de 20 000 daltones.

En la región del carboxilo terminal la conformación de los péptidos es globular, tiene un peso molecular de 30 000 a 35 000-daltones. Por lo tanto, el peso molecular de las cadenas pro α de las colágenas intersticiales es aproximadamente de 154 000 daltones.

Las funciones biológicas atribuidas a las extensiones NH_2 y COOH terminales son:

- a) Prevenir la formación prematura de fibras en el espacio intracelular.
- b) Favorecer el ensamble adecuado de la proteína.
- c) Asociar directamente las cadenas pro α para que cada molécula contenga las tres cadenas pro α adecuadas.
- d) Incrementar la velocidad y eficiencia del enrollamiento de las cadenas dentro de una conformación de triple hélice.
- e) Controlar la cantidad de procolágena sintetizada por la célula mediante un mecanismo de retroinhibición.

Hidroxilación.

La hidroxiprolina e hidroxilisina no se incorporan directamente a las cadenas polipeptídicas sino que se derivan de prolina y lisina que se hidroxilan por la acción de la prolil-3-hidroxilasa, prolil-4-hidroxilasa y lisil-hidroxilasa respectivamente, después de ser incorporadas a las cadenas polipeptídicas. Estas enzi

mas requieren de cofactores como: oxígeno, iones ferrosos, α -cetoglutarato y ácido ascórbico (agente reductor) para llevar a cabo su actividad biológica.

El α -cetoglutarato es descarboxilado a succinato y CO_2 durante la reacción y un átomo de oxígeno molecular se incorpora en el succinato. El peso molecular para prolil-hidroxilasa activa aislada de embrión de pollo es de 240 000 daltones. Es un tetrámero ($\alpha_2 \beta_2$) constituido por dos tipos diferentes de monómeros enzimáticamente inactivos, con pesos moleculares de 60 000 y 64 000 daltones respectivamente. La lisil-hidroxilasa ha sido purificada extensamente y aparentemente es un dímero de dos subunidades, con un peso molecular aproximadamente de 90 000 daltones cada una (36).

La hidroxilación se lleva a cabo en las cadenas nacientes y el péptido debe tener una conformación no helicoidal. Además, se ha observado que los péptidos más largos se hidroxilan más rápidamente. La prolil-4-hidroxilasa y lisil-hidroxilasa actúan solamente sobre residuos de prolina o lisina en la posición Y siendo la secuencia requerida para la actividad el triplete -X-Y-Gli. En cambio la prolil-3-hidroxilasa actúa sobre los residuos de prolina en la posición X; trabajos recientes han demostrado que esta enzima hidroxila la posición X solamente si la posición Y es 4-hidroxiprolina (37), por lo que la secuencia resultante es 3-Hip-4-Hip-Gli (38). Esto indica que en la biosíntesis de colágena la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina ocurren antes de la formación de la triple hélice y cuando las cadenas polipeptídicas nacientes se encuentran unidas a los ribosomas. Cuando se

inhibe la hidroxilación o se incorporan análogos de aminoácidos - en la cadena de la procolágena, se bloquea su secreción y por lo tanto se observa una acumulación en el R.E.R. Esta proteína no puede ser secretada por la célula hasta que se hidroxile o bien - que la temperatura disminuya y se favorezca el ensamble y la formación de la triple hélice.

Glicosilación.

La hidroxilisina puede ser glicosilada por adición de galactosa y glucosa, generando residuos glucosil-galactosil-hidroxilisina. Estas reacciones son catalizadas por la glucosil y galactosil transferasas; la galactosil-transferasa ha sido parcialmente purificada (39) y la glucosil-transferasa ha sido aislada de un homogenado proteínico. Ambas enzimas transfieren el azúcar a partir de un precursor común: glucósido-uridina-difosfato. Las reacciones requieren de la presencia de cationes divalentes preferentemente manganeso (34) y al igual que las prolil-hidroxilasas el sustrato debe tener una conformación no helicoidal. La adición de los azúcares probablemente ocurre en la cisterna del R.E.R. La glicosilación de los diferentes residuos de hidroxilisina, así como la extensión del grupo R, permite establecer interacciones particulares entre los distintos tipos de colágena y proteína-polisacáridos para constituir una matriz extracelular determinada.

La glicosilación en la región del COOH terminal de cada cadena pro α difiere de la glicosilación en la región colagénica, en que los azúcares que se adicionan son glucosamina y manosa, que -

son unidos a residuos de asparagina, a través de un enlace N-glicosídico. Esta glicosilación se puede bloquear con tunicamicina, pero no se ve afectada por defectos en la hidroxilación de lisina.

Los extremos terminales de los péptidos de la procolágena contienen varios residuos de cisteína, la cuál permite el establecimiento de puentes disulfuro, la formación de dichos puentes en el extremo NH_2 es únicamente intracadena, a diferencia del extremo COOH en el que la formación de dichos puentes es inter e intracadena. La formación de la triple hélice ocurre en el lumen del R.E.R., y el proceso se inicia cuando se forman los puentes disulfuro entre los péptidos del C-terminal de las tres cadenas. Las fuerzas que determinan el desfase periódico de las moléculas de colágena en la fibrilla, provienen generalmente de las interacciones iónicas entre cadenas laterales de los aminoácidos de las cadenas α de dos moléculas adyacentes. Al formarse los puentes disulfuro intercadena la región colagénica espontáneamente puede enrollarse en una triple hélice.

Si se evita la hidroxilación de los residuos de prolina o se inhibe la formación de los enlaces intercadena, la molécula no se ensambla y permanecerá como una proteína no funcional, que se acumulará en el R.E.R. de las células produciéndose una secreción muy lenta y un funcionamiento inadecuado de las fibras de colágena.

Secreción de la procolágena.

Durante la secreción las moléculas de procolágena se condensan dentro de vesículas, éstas son transportadas hasta la superfi

cie de la célula, donde la procolágena es secretada por un proceso de exocitosis mediado por un sistema microtubular.

La proporción de secreción de la procolágena depende del procesamiento intracelular de la proteína y específicamente que las cadenas pro adquieran una conformación de triple hélice (34). Posiblemente hay un equilibrio entre la proteína intracelular no helicoidal y las modificaciones postraduccionales que al romperse ó modificarse explique la disminución en la secreción de la proteína. Existe una gran variedad de agentes que pueden interferir con la secreción de la procolágena. Estos incluyen la colchicina y la vinblastina, los cuales inhiben la polimerización de los microtúbulos, otros fármacos bloquean los microfilamentos ó inhiben la energía para la producción de los microtúbulos (40).

Estudios recientes han demostrado que ocurre una degradación intracelular de la colágena antes de que ésta sea secretada y que puede alcanzar valores hasta de un 20 - 25% del total de la proteína producida. La función de este proceso es desconocido, aunque se ha postulado, como un mecanismo para evitar que moléculas anormales (defectos en su estructura primaria, ensamble no adecuado, etc.) sean secretados.

Formación de la molécula.

La molécula de colágena se forma por la acción de las enzimas que separan, de la procolágena, las extensiones peptídicas amino y carboxilo terminales, esta conversión es un evento extracelular. La extensión amino terminal se separa primero y posteriormente se elimina la extensión carboxilo. Las enzimas que inter -

vienen en este proceso son: procolágena-N-peptidasa y procolágena -C-peptidasa, respectivamente y ambas requieren de Ca^{++} como cofactor.

La procolágena-N-peptidasa ha sido parcialmente purificada de ternera, tendones de embrión de pollo y del medio de cultivo de fibroblastos (41), esta enzima actúa en las cadenas pro α 1 y pro α 2 de la procolágena tipo I, aunque la enzima aislada de tendones de pollo actúa también en la colágena tipo II. Esto indica que hay especificidad en el sitio de acción de las tres diferentes especies de cadenas pro α y que tienen una secuencia similar de aminoácidos en dicho sitio. La procolágena-C-peptidasa ha sido identificada en el medio de cultivo de fibroblastos y en tendón de embrión de pollo, es una glicoproteína y es más pequeña que la procolágena-N-peptidasa. Aún cuando no han sido bien caracterizadas se calcula que sus pesos moleculares son de 80, 000 y 260, 000 daltones para procolágena carboxilo y amino peptidasas respectivamente. En la organización de las fibras de colágena el C-terminal de una molécula coincide con el N-terminal de otra, asociándose diagonalmente, debido a la carga de los aminoácidos que se encuentran en los extremos desplazándose aproximadamente 1/4 de su longitud, con lo que se tiene el espacio "D" característico de las fibras de colágena.

Este espacio provee probablemente un sitio para el depósito de cristales de hidroxapatita en la formación del hueso. Esta organización es importante para la formación de enlaces cruzados-intermoleculares entre los residuos de lisina y/o hidroxilisina.-

La modificación para la desaminación oxidativa de la lisina se efectúa en el 6º carbono, la hidroxilisina también puede sufrir esta modificación, esta reacción puede ser bloqueada en los animales cuya alimentación contenga β -aminopropionitrilo, procedente del guisante de olor. Las funciones aldehídicas de la lisina y de la hidroxilisina son fundamentalmente las responsables de la solidez de la trama formada por las moléculas de colágena.

Los enlaces entre las moléculas de colágena ocurren en dos ó tres pasos:

- 1.- La desaminación oxidativa del grupo ϵ -amino en algunos-residuos de lisina e hidroxilisina, obteniéndose aldehídos reactivos. La enzima que cataliza la reacción es la lisil-oxidasa, que ha sido purificada de aorta y cartílagos de pollo, ésta requiere de O_2 y Cu^{++} como cofactores- la enzima reacciona pobremente con cadenas α aisladas, actuando preferentemente sobre fibras de colágena nativa (42).
- 2.- Las uniones formadas pueden generar dos tipos de enlaces:
 - a) Enlaces intramoleculares, esto es, entre cadenas de la misma molécula y son formados por la condensación aldólica de dos aldehídos.
 - b) Enlaces intermoleculares, los cuales involucran una-condensación entre un aldehído derivado de lisina ó hidroxilisina y un grupo ϵ -amino de una segunda lisina, hidroxilisina ó hidroxilisina glicosilada, formando una base de Schiff.

Las bases de Schiff no son muy estables y pueden generarse con ellas otras uniones más estables, en las cuales hay un cambio de un doble enlace en la base de Schiff para obtener una cetona, otros cambios pueden ser realizados por hidratación y oxidación dando un nuevo péptido.

- 3.- Una reacción en la cuál se adiciona un grupo de hidridina a la cadena de aminoácidos de la molécula de colágena.

Si el componente aldehídico de la base de Schiff es derivado de la hidroxilisina el enlace es más estable que si el aldehído es formado de lisina.

Los principales pasos de la biosíntesis de la colágena y sus funciones básicas se resumen en la tabla II.

2.3.4.- Desórdenes de la colágena.

El movimiento transcelular de la procolágena está relacionado con las estructuras membranales del aparato de Golgi y se ha sugerido que tal movimiento está mediado por microtúbulos⁽⁴³⁾. 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, también se ha observado que estos compuestos retardan la conversión de procolágena a colágena.

Existen evidencias de que la colágena está implicada en muchas patologías del tejido conjuntivo, se ha observado que altera

TABLA II.- SINTESIS, PROCESAMIENTO, DEPOSITO Y ESTABILIZACION DE LA COLAGENA

	Requerimientos	
A.- Transcripción de los genes de cada cadena diferente de procolágena.		
B.- Traducción del ARNm para cada cadena de procolágena.		
C.- Modificaciones postraduccionales de procolágena.	Enzimas	Cofactores
1.- Eliminación de la secuencia "señal".	peptidasa de la-- señal NH ₂ terminal	
2.- Hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en las cadenas pro-α nacientes y en las cadenas pro-α libres en el lumen del R.E.R.	prolil 4-hidroxilasa prolil 3-hidroxilasa lisil-hidroxilalasa	oxigeno libre αcetoglutarato ac. ascórbico Fe ⁺⁺
3.- Glicosilación de los residuos de hidroxilisisina en las cadenas libres pro-α en el R.E.R.	galactosil-transferasa glucosil-transferasa	Mn ⁺⁺ UDP-azúcares
4.- Glicosilación de residuos de asparagina en la extensión COOH terminal.	glucosil-transferasa manosil-transferasa	UDP-glucosamina GDP-manosa
5.- Formación de enlaces disulfuro intercadena - en la porción carbonilo terminal de los propeptidos.		
6.- Formación de la triple hélice.		
7.- Las moléculas de procolágena son transportadas en las vesículas del R.E.R. a el complejo de Golgi.	energía	
8.- Secreción: las moléculas de procolágena son acumuladas en gránulos secretores sobre la superficie del complejo de Golgi, y estos gránulos son transportados a la superficie de la célula, donde la procolágena es liberada al espacio extracelular.	energía microtúbulos intactos	
9.- Moléculas de procolágena son convertidas a colágena en el espacio extracelular.	procolágena-N-peptidasa procolágena-C-peptidasa	Ca ⁺⁺ Zn ⁺⁺
D.- Las moléculas de colágena sufren espontáneamente fibrillogénesis. Cada molécula se asocia diagonalmente desplazandose 1/4 de la longitud de la molécula. Existe un hueco (0,6) entre cada asociación lineal de las moléculas.	conversión de procolágena a colágena. concentración fisiológica de sales e iones	
E.- Formación de enlaces intermolaculares derivados de lisina.	lisil-oxidasa	Cu ⁺⁺ oxigeno libre

(Am. J. Pathol. 98; 1: 234.1980)

ciones en la producción de colágena y en su degradación, están relacionadas con enfermedades como la cirrosis hepática y la fibrosis pulmonar. La cirrosis se manifiesta por una producción anormal de tejido conjuntivo rico en colágena, puede ser considerada como una respuesta de cicatrización del tejido hepático y es consecutiva a una inflamación producida por la ingesta crónica de alcohol o por un virus (A o B). Como ya se indicó anteriormente, la colágena determina la fuerza tensil y distensibilidad de los tejidos; por lo tanto, una anomalía en la flexibilidad y/o distensibilidad de los tejidos se han clasificado como desórdenes de la colágena.

La biosíntesis de la colágena involucra un gran número de reacciones post-traduccionales, por lo que se pueden presentar alteraciones no solo por defectos en la transcripción y traducción, sino también por defectos en algunas de las enzimas involucradas en cualquiera de las modificaciones, produciéndose fallas morfológicas debido a errores a nivel de síntesis, secuencia primaria de las cadenas, formación, estructura y estabilidad de la molécula de colágena, ensamblaje de las mismas para la producción de fibras, formación de las uniones entrecruzadas intra e intermoleculares, arreglo de las fibras en los tejidos o desequilibrio, así como alteraciones en las tasas de síntesis y degradación.

Estos desórdenes pueden ser hereditarios ó adquiridos, los primeros incluyen: el síndrome de Ehlers-Danlos, el cuál involucra diferentes defectos en el metabolismo de la colágena en la piel, gíngiva, tejido esquelético, tracto gastrointestinal, siste

ma cardiovascular, placenta y ojos. Entre los defectos hereditarios que no están incluidos en el síndrome de Ehlers-Danlos se encuentran:

- 1.- Defectos en el empaquetamiento de colágena que se presenta en el perro, el visón y en el gato.
- 2.- Dermatosparaxis ó deficiencia en procolágena-N-peptidasa principalmente se presenta en ganado vacuno y lanar.
- 3.- Deficiencia de lisil-oxidasa, la cuál se presenta en los ratones.
- 4.- Síndrome de Menke en humanos, que afecta principalmente al cabello.
- 5.- Cutis laxa en humanos.
- 6.- Síndrome de Marfán en humanos.
- 7.- Osteogénesis imperfecta, en la cuál se incluyen tres ó más entidades específicas en el hombre.

Las enfermedades adquiridas y los procesos de reparación que afectan al metabolismo de la colágena involucran a un tejido dañado, que responde rápido incrementando fibroblastos y células mesenquimatosas. Esta respuesta es localizada y se complica debido a la estimulación de la proliferación celular y por ende un aumento en la síntesis de matriz extracelular. Puede incluir cambios regulatorios en la proporción y/o tipo de la colágena sintetizada. Los cambios en la cantidad de colágena son más aparentes que los cambios de los tipos, ya que un exceso en la síntesis de la proteína es un problema mayor en órganos parenquimatosos tales como pulmón, hígado, riñón y tracto gastrointestinal. En la cirrosis-

hepática, el exceso de colágena es predominantemente una respuesta anormal de los procesos reparativos fisiológicos en el hígado y trae como consecuencia un daño prolongado al hepatocito.

En la lesión inflamatoria las fibras de colágena son capaces de inducir una respuesta fibrótica localizada y esto puede ser determinante en la iniciación del aumento de síntesis de esta proteína, seguida de una inflamación en los tejidos. Esta fibrosis puede ser reducida por: disminución en el depósito de fibrillas, por aumento en la fibrinólisis, farmacológicamente por disminución en la síntesis y estabilización de la colágena ó por aumento en la degradación de ésta. La clasificación de las enfermedades de la colágena a nivel molecular se presentan en la tabla III.

2.4.- Alteraciones producidas por el tetracloruro de carbono.

La fibrosis es el resultado final de la producción de fibras de colágena posterior a una inflamación, la cuál puede ser producida por agentes tóxicos ó físicos como temperatura, radiación e incisión; químicos como: tetracloruro de carbono, bleomicina, etc; ó biológicos como: reacción inmune secundaria a una infección.

En animales de experimentación, como en el caso de las ratas, la fibrosis hepática se puede producir por: traumas, suturas, introducción local de sustancias irritantes, alteraciones nutricionales como dietas bajas en colina, metionina y proteínas, acompañadas o no, de dietas bajas en grasas; administración de agentes tóxicos como etionina, un aminoácido antagonista de la metionina; tetracloruro de carbono; por ligadura del conducto biliar y por daño inmunológico.

TABLA III. ORIGEN Y NATURALEZA DE DEFECTOS DE LA COLAGENA.

DEFECTOS EN:	MANIFESTACION
A) Estructura de la molécula	
1. Síntesis post-ARN mensajero- de OH-prolina e OH-lisina.	a) Ehlers Danlos VI b) Escorbuto, anoxia
2. Eliminación de la extensión NH ₂ terminal del precursor - procólagena.	a) Ehlers Danlos VII b) Dermatosparaxis en ganado
3. Transcripción Cambios en los tipos de las- cadenas sintetizadas.	a) Osteogénesis imperfecta b) Artritis reumatoide
B) Estructura de la fibra.	
1. Formación de enlaces covalen- tes inter e intracadena (li- sil oxidasa)	a) Ehlers Danlos V b) Latirismo a) Homocistinuria b) Efecto de D-penicilamina
2. Interacción con otros compo- nentes del tejido conjuntivo	a) Síndrome de Marfán b) Escleromixedema a) Pseudoxanyoma elasticum
I) Proteoglicanos	
II) Glicoproteínas	
C) Velocidad de síntesis y/o degra- dación (Metabolismo).	
1. Cambio en la velocidad de - síntesis.	b) Esclerosis sint. progresiva b) Artritis Reumatoide. b) Fibrosis en cicatrices b) Fibrosis pulmonar b) Fibrosis hepática
2. Cambio en la velocidad de de- gradación.	b) Invasión panicular de cartílago en A.R.
3. Actividad colagenolítica au - mentada.	a) Osteoporosis b) Gangrena gaseosa b) Enfermedad periodontal

*a) Enfermedades Hereditarias

*b) Enfermedades Adquiridas

(Ramachandram G.N. Reddi.A.H. Biochemistry
of Collagen. Ed. Plenum. Press. N.Y. 385.
1976.)

El método más utilizado para la inducción de cirrosis hepática es el tratamiento con tetracloruro de carbono, se ha demostrado que éste es un hepatotóxico fuerte y es metabólicamente reducido por el citocromo P-450 a radicales triclorometilo como un intermediario reactivo (44).

También se ha observado que los niveles del citocromo P-450 hepático (componente principal del sistema de oxidación del hepatocito), se ven disminuidos por la acción del CCl_4 a animales a los cuales se les ha administrado en forma crónica y se les ha producido cirrosis hepática.

Los efectos más nocivos para el hepatocito producidos por el CCl_4 son:

- 1.- Disminución de piridin-nucleótidos.
- 2.- Unión covalente a proteínas y lípidos.
- 3.- Peroxidación de lípidos.

Esta hipótesis establece la formación de una cascada de radicales libres, similar a la auto-oxidación de ácidos grasos poli-insaturados. La adición del radical triclorometilo al doble enlace del ácido graso poli-insaturado resulta en la formación del radical alquil α triclorometilo, el cuál puede reaccionar con un doble enlace de otro ácido graso, originando un enlace cruzado, diferente del que se origina de una reacción con oxígeno, otros radicales endógenos o un donador de hidrógeno. Se ha sugerido que la peroxidación de los lípidos puede ser una consecuencia del daño celular. Inicialmente radicales tales como O^{-2} y H_2O_2 pueden ser metabolizados por varias enzimas como la superóxido dismutasa-

o la catalasa y la glutatión peroxidasa respectivamente, (45) inhibiendo la producción de radicales libres más activos. Una vez que la peroxidación de los lípidos se ha iniciado, los antioxidantes endógenos interfieren con la propagación de la cadena ya que estos son más fácilmente oxidados que los ácidos grasos poli-insaturados.

El glutatión es un tripeptido que se encuentra en todas las células de los mamíferos, generalmente en concentraciones de 0.5-10 mM. Las funciones del glutatión están relacionadas al grupo tiol y al γ -glutamil hidrato y la estabilidad es favorecida por los enlaces de γ -glutamil, el cuál no es atacado por α -peptidasas y protege al grupo tiol de una oxidación rápida. El carboxilo terminal de los residuos de glicina del glutatión protege al tripeptido de la acción de γ -glutamil-ciclotransferasa. Su función es destruir los radicales libres del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos. También es una coenzima de ciertas reacciones enzimáticas y está involucrada en el transporte de aminoácidos. La deficiencia de glutatión puede disminuir las defensas contra el daño de la oxidación, ya que interfiere con los radicales libres y puede conjugarse con intermediarios electrofílicos que son capaces de iniciar la peroxidación de los lípidos (46).

La forma derivada del glutatión está involucrada en la detoxificación de compuestos extraños y también en varias fases del metabolismo endógeno. La glutatión S-transferasa es una enzima con peso molecular entre 40, 000 y 50, 000 daltones, constituida por dos componentes que tienen puntos isoeléctricos cercanos a 7, uno

con características básicas y el otro ácidas. Se ha aislado y purificado de homogenado de hígado humano y se ha confirmado que esta enzima es un dímero constituido por monómeros que posiblemente contienen tres subunidades de cada uno. Cataliza la reacción de conjugación entre glutatión y muchos substratos secundarios. Generalmente estos últimos son electrofílicos e hidrofóbicos, al conjugarse con glutatión aumenta su solubilidad en agua y decrece su reactividad química lo que frecuentemente conduce a una excreción urinaria de compuestos derivados de acetil-cisteína.

Se ha demostrado que la disminución de glutatión hepático por debajo de la concentración mínima resulta en un aumento de NADPH dependiente de la peroxidación de lípidos endógenos "in vitro" e "in vivo". Se ha pensado que la forma de iniciación de esta reacción es mediante el oxígeno que está unido a un complejo fisiológico ó a un complejo que contiene fierro (47). Esta conclusión se confirmó posteriormente por experimentos con homogenados de hígado y hepatocitos aislados (48).

El daño de la membrana lisosomal con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas parece ser un paso consecutivo a la peroxidación de lípidos originando finalmente un daño celular. La peroxidación de lípidos microsomales produce pérdidas de la actividad de algunas enzimas como son: glucosa-6-fosfatasa, NADPH-citocromo c reductasa, citocromo P-450 y UDP-glucuronil-transferasa (49).

Benedetti y col. (50) sometieron a tratamiento con CCl_4 y $BrCCl_3$ a ratas, obteniendo aldehídos que se unían a proteínas microsomales y demostraron que productos similares unidos a protef

nas se obtenían por reacción de 4-hidroxinonenal con microsomas, - por lo que dedujeron que este compuesto es capaz de inhibir acti- vidades enzimáticas microsomales y síntesis de protefnas e incre- mentar consecuentemente la fragilidad de la membrana lisosomal.

Se ha demostrado que algunas sustancias tóxicas como CCl_4 , - BrCCl_3 y 1,1-dicloro etileno, inhiben la bomba de calcio microso- mal "in vivo" e "in vitro" y consecuentemente la peroxidación - de lípidos lo que resulta en una inhibición de las actividades del Ca^{++} microsomal.

La peroxidación de lípidos es un efecto primario y reversi- ble; sin embargo, puede iniciar una serie subsecuente de eventos- que pueden no ser reversibles y por lo tanto, conducir a un daño ce- lular irreversible. La destrucción de la bomba de Ca^{++} microsomal origina una acumulación de calcio intracelular, fenómeno que pare- ce ser un paso clave en la irreversibilidad del proceso (51).

2.5.- Tratamientos Utilizados para Interferir con la Síntesis o Acumulación de Colágena.

Como ya se mencionó anteriormente, un agente nocivo inicia - una cascada de reacciones celulares con cambios en el tejido daña- do y, como una respuesta del medio ambiente de este tejido puede- estimularse la afluencia y activación de fibroblastos que en un - momento dado producen un incremento en la proporción y concentra- ción local de macromoléculas estructurales como glicosaminoglica- nos y colágena. Debido a lo anterior, se han diseñado y estudiado compuestos que pueden interferir o inhibir selectivamente con el-

metabolismo de la colágena en un tejido dañado. En consecuencia, se piensa que estos compuestos tendrán un efecto principal en el área afectada donde la concentración de colágena es mayor en relación con los tejidos que le rodean. Se han probados numerosos fármacos con la intención de lograr una interfeerencia específica a nivel de síntesis, secreción, maduración y degradación de esta proteína.

Interferencia con la síntesis.

El ácido ascórbico es un cofactor de las enzimas que participan en la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina, por lo que se ha intentado provocar una deficiencia de este compuesto en el organismo ya que no afecta a la colágena depositada y no existen evidencias de que se incremente la degradación de la colágena y solamente afecta a la proteína sintetizada en condiciones de deficiencia (52). Los resultados obtenidos demostraron que se sintetizó una colágena que fue degradada rápidamente. Sin embargo, la deficiencia crónica de lisil-hidroxilasa produce hipotonia congénita, cutis laxa, piel frágil, hemorragias en cicatrices y arqueamiento del paladar. Además, se observó en primates, que la deficiencia del ácido ascórbico produjo desarrollo de escorbuto (53). Existe adicionalmente una gran variedad en la susceptibilidad a la deficiencia de vitamina C, por lo que éste enfoque ha resultado poco práctico.

La utilización de agentes quelantes como EDTA, desferrioxamina- β , Tirón, α , α' -dipiridil y o-fenantrolina dió como resultado una disminución en el depósito de colágena aunque posterior-

mente se reportó un aumento en la actividad de prolil-hidroxilasa. Recientemente Takeda y col. en 1979 sugirieron que la estimula - ción de la actividad de prolil-hidroxilasa por agentes químicos - puede estar relacionada con la actividad del oxígeno por el com - plejo del agente quelante sobre los iones $Fe^{2+/3+}$.

Por otra parte, se ha observado que el oxígeno usado por las enzimas respectivas en las reacciones de hidroxilación, se encuen - tran en una forma activada posiblemente como un anión superóxido- O_2^- . Por este motivo, no se observó ningún efecto cuando se utili - zó superóxido dismutasa. Otro factor a considerar es la poca es - pecificidad de los agentes quelantes para unirse con diferentes - metales dando origen a efectos secundarios como bloquear grupos- sulfhidrilo por dietiltiocarbonatos y D-penicilamina ó la induc - ción de funciones oxidativas hepáticas por o-fenantrolina.

En otros experimentos se incubaron cultivos de fibroblastos- con Cis-Hip y otros análogos de prolina, obteniéndose una proco - lágena no helicoidal que fue retenida en el R.E.R., de la célula. Debido a que la hidroxilación de los residuos de lisina es un pre - requisito para seguir con el paso de glicosilación y posterior - mente la secreción de la colágena, se consideró que la utilización de estos compuestos podrían interferir con la síntesis y secre - ción de la colágena, así como estimular su degradación. Sin embar - go, aunque los estudios realizados "in vitro" con análogos de pro - lina demostraron una inhibición de la síntesis de colágena, cuan - do se efectuaron en animales de laboratorio se obtuvieron datos con - tradictorios, por lo que los resultados obtenidos con estos com -

puestos se pueden separar en dos clases de efectos:

- a) Un efecto en el que existió inhibición de la acumulación de colágena sin que se presentaran efectos tóxicos.
- b) No se produjo efecto sobre la síntesis de colágena y se presentó una inhibición de la acumulación de ésta solamente a dosis tóxicas del compuesto.

La discrepancia entre los resultados observados "in vitro" y la alta toxicidad en animales, sugiere que existe una dependencia de la concentración de los análogos de prolina y de su internalización en la célula, así como de la cantidad de incorporación del compuesto en los propéptidos colagénicos. Por otra parte, se ha observado que la eliminación de prolina en la dieta no tiene efecto sobre los niveles del aminoácido libre, ya que la producción endógena a partir de glutamato, ornitina y arginina es suficiente para reemplazar la fuente exógena. Debido a lo anterior, el efecto de estos análogos se ve reducido debido a la concentración de prolina libre. Este efecto es más notorio en un tejido dañado, ya que para que el análogo tenga más efecto, deberá elevarse la dosis obteniéndose así un efecto tóxico del fármaco. Debido también a la inespecificidad de incorporación de los análogos a otras proteínas no colagénicas y con ello el origen de posibles trastornos en su actividad biológica, se ha disminuido considerablemente la aplicación terapéutica de dichos compuestos.

Inhibición de la secreción.

Otro enfoque para interferir con el metabolismo de la coláge na es afectando su transporte. La inhibición en la formación de -

los microtúbulos ó microfilamentos afecta el transporte de la colágena en la célula. La colchicina y la vinblastina son los fármacos que más se han empleado para interferir con este transporte, ya que - utilizando estos compuestos se puede tener una acción reversible del arreglo de los microtúbulos de la célula.

La colchicina es el fármaco más empleado y tiene actividad - en el tratamiento agudo de gota, pero su utilización en otros trastornos inflamatorios no ha sido efectiva ⁽⁵⁴⁾. En un estudio en - el cuál se administró colchicina a ratas en forma oral en una dosis de 6 mg/Kg para suprimir el edema inducido con carragenina, - se observó que el efecto producido por el fármaco, puede estar regulado por la omisión de algunas funciones de leucocitos polimorfonucleares ó puede estar relacionado por la inducción de enzimas lisosomales para interferir con los microtúbulos, implicando con esto alteraciones en la pinocitosis y la fagocitosis de células - inflamatorias.

Por otra parte, estudios realizados por Rojkind ⁽⁵⁵⁾ con ratas a las cuales se les administró colchicina conjuntamente con - CCl_4 se observó una inhibición en la síntesis y depósito de colágena hepática.

Estudios en pacientes con escleroderma sobre el efecto de este fármaco en la excreción de hidroxiprolina en orina demostraron que con la administración de colchicina a dosis toleradas por el - hombre no se inhibe la síntesis ni incrementa la degradación de - colágena en un estado fibrótico ⁽⁵⁶⁾. Sin embargo, Harris y Krane ⁽⁵⁷⁾ reportaron que en cultivos de células sinoviales la colchicina estimula la síntesis de novo de colagenasa. Además, el efecto-

"in vivo" de la colchicina sobre la síntesis de ambos tipos de -
proteínas, al menos en el tejido de granulación, fue contrario a -
lo reportado anteriormente. Lo que sugiere que la dosis terapéuti -
ca de la colchicina coincide con la dosis tóxica. Adicionalmente -
se ha observado que la colchicina se acumula en diferentes órga -
nos y tejidos corporales.

Por otra parte, se ha observado que, los anestésicos locales
procaína y lidocaína, han demostrado efectos inhibitorios sobre -
la síntesis de proteínas, ADN y ARN y se ha sugerido que presen -
tan adicionalmente una actividad antimicrobiana. En otros experi -
mentos se demostró que inhiben la secreción de proteínas plasmáti -
cas en rebanadas de hígados de rata y reducen la concentración de
histamina de la célula. Por otro lado, en estudios realizados en
cultivos de fibroblastos, utilizando anestésicos locales, se ob -
servó una inhibición de proteínas, posiblemente por interferencia
en el sistema microtubular, a través de un defecto en la membra -
na celular. Los mecanismos posibles que se proponen para explicar
el efecto de los anestésicos son: afectar la estabilidad y flui -
dez de la membrana celular, la conducción de sodio y el movimiento
de calcio en la célula; éste último dato implica un posible efec -
to en la despolimerización de los microtúbulos (58).

Control en la maduración de la colágena.

Otro mecanismo posible para interferir con el metabolismo de
la colágena, es controlar la maduración de la proteína, evitando
la formación de grupos aldehídicos a partir de la lisina y de la

hidroxilisina, las cuales son responsables de la solidez de la trama formada por las moléculas de colágena, a través de la formación de enlaces covalentes intra e intercadena. En la generación de estos grupos aldehídicos se involucra la actividad de la enzima lisil-oxidasa, ésta cataliza la desaminación oxidativa específica de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina e hidroxilisina, para generar los aldehídos reactivos que puedan reaccionar entre sí o bien con otros grupos NH_2 para formar bases de Schiff.

Entre los compuestos que se han empleado para este fin está el β -amino propionitrilo (BAPN), debido a que este fármaco produce una inhibición irreversible en la enzima lisil-oxidasa. El BAPN es un fármaco efectivo y no específico, el cuál interfiere con la estabilidad estructural de la molécula de colágena, estos estudios se realizaron en animales de laboratorio y fueron con el objeto de evitar la presencia de articulaciones inmóviles (59). En un estudio en pacientes con escleroderma a los cuales se les administró BAPN a una dosis de 2 g/día a tiempos cortos, no se observaron efectos tóxicos, pero en tratamiento prolongado un número significativo de pacientes presentaron sensibilidad al fármaco. También se observaron reacciones de alergia en la piel y anemia hemolítica. La toxicidad sistémica que produce el BAPN ha sido el mayor obstáculo para la utilización de este fármaco en el hombre.

Otra alternativa es el uso de D-penicilaminas ya que éstas afectan la estabilidad estructural de la colágena a varios niveles (ver figura 4). Estudios realizados en animales de laboratorio demostraron que este fármaco puede tener efecto a dosis bajas

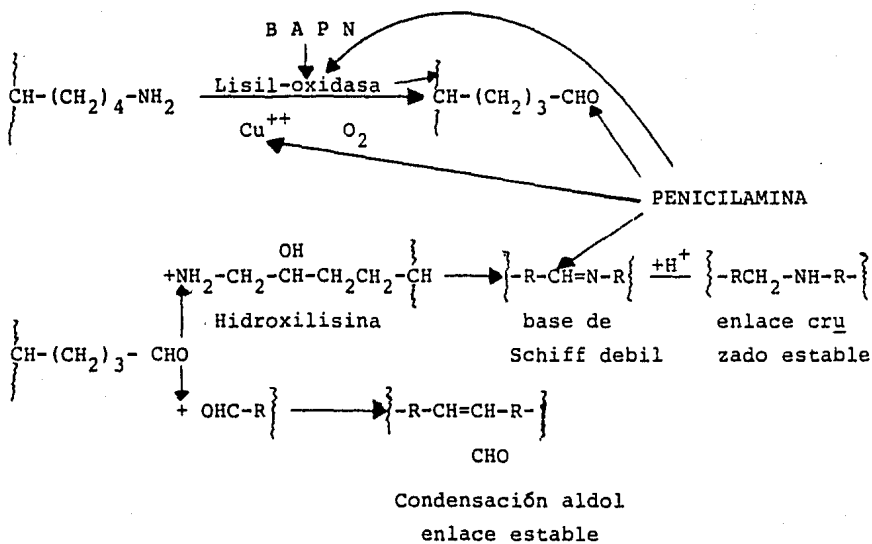


Figura 4. Interferencia del BAPN y D-penicilaminas, en la estabilidad estructural de la molécula de colágena.

(Chvapil M. Experimental modification of collagen synthesis and degradation and their therapeutic application. 212.1982)

por afectar la interacción con los derivados aldehídicos de la lisina, también despolimeriza los enlaces cruzados de las bases de Schiff no reducidas las cuales sirven para incrementar la estabilidad de la colágena, también inhibe directamente la lisil-oxidasa, mientras que a dosis altas se presentan propiedades quelantes con varios metales ⁽⁶⁰⁾. Al igual que con el BAPN existe una incidencia alta de hipersensibilidad y falta de especificidad del tratamiento. Debido a lo anterior, se evita su utilización en los pacientes.

Como ya se mencionó anteriormente, los sitios de acción del BAPN y D-penicilamina son diferentes, por lo que se pensó en la posibilidad de administrar ambos fármacos, para que se presentaran efectos acumulados con dosis menores de éstos. Los resultados no fueron favorables, se formaron derivados de penicilaminas los cuales interaccionaron con los aldehídos formados y mostraron propiedades latíricas.

Aumento de la degradación de colágena.

Debido a que existe para cada tejido una relación particular entre la síntesis y la degradación de colágena de forma natural, se pensó aumentar la proporción de degradación de la proteína como un tratamiento posible para interferir con la acumulación de colágena. Harris ⁽⁵⁶⁾ observó un aumento de colagenasa en el cultivo de células de membrana sinovial estimuladas con colchicina. También Chvapil ⁽⁵⁾ encontró un aumento de la actividad colagenolítica en tejido de granuloma de ratas tratadas con dosis altas -

de colchicina. Por otro lado, estudios realizados en pacientes - con cirrosis hepática alcohólica a los cuales se les administró - colchicina durante 12 y 42 meses, se observó una disminución en - algunos signos clínicos característicos de la enfermedad (6). Sin embargo, los resultados no muestran datos significativos de la - disminución de la mortalidad, así como una disminución del estado fibrótico de los pacientes. El empleo de éste fármaco en la cirro - sis hepática no se ha establecido por los efectos adversos deriva - dos del uso de dosis elevadas de colchicina.

Con relación a la utilización de agentes quelantes se obser - vó en un grupo de ratas tratadas con EDTA, que se incrementó la - concentración de hidroxiprolina excretada en la orina. Se asume - que el posible mecanismo de acción de los agentes quelantes sea: - por secuestro de los iones zinc en los tejidos, explicando con esto la excreción primeramente de zinc y posteriormente de hidro - xiprolina, además del aumento de la fragilidad de los lisosomas. - Sin embargo, al no tener acción específica el EDTA, los efectos - producidos por este tipo de fármacos impiden su utilización.

Otro mecanismo fue el propuesto por Deporter (61), en el - cuál se aumenta la degradación intracelular y la fagocitosis de - la colágena por los macrófagos activados, incrementando la activi - dad de éstos en el área de la lesión fibrótica. Sin embargo, los - macrófagos activados secretaron al mismo tiempo factores que esti - mulan la proliferación y actividad metabólica de los fibroblastos.

Como se mencionó anteriormente, el daño hepático perjudica - la digestión, absorción y activación de nutrientes, el etanol pue

de inducir un agotamiento selectivo de nutrientes, el cuál podría causar daño orgánico, para lo cuál se han utilizado infusiones - diarias de aminoácidos con las que se han reportado que disminuye la mortalidad. Sin embargo, la encefalopatía hepática constituye un riesgo potencial en la infusión de aminoácidos. Para minimizar la encefalopatía se usan mezclas ricas de aminoácidos de cadenas ramificadas y pobres en aminoácidos aromáticos, además de cambio de proteínas animales por proteínas vegetales. En la actualidad no existe un tratamiento para la detección de la fibrosis ó procesos cicatriciales, lo que si se ha desarrollado son terapias al - ternas que mejoran o alivian las complicaciones secundarias originadas por la cirrosis.

2.6.- Microtúbulos.

Como se mencionó anteriormente, la secreción de la colágenas a través del complejo de Golgi y depende del funcionamiento - normado por el sistema micotubular (62). En 1963, los investigadores Slaherback, Ledbetter y Porter (63) observaron por primera - vez gruesos filamentos a los cuales denominaron microtúbulos. Con ayuda de técnicas bioquímicas, microscópicas e inmunológicas, se - han puesto de manifiesto cuatro estructuras fibrosas principales - que están presentes en todos los tipos celulares:

- a) Microtúbulos, filamentos largos y gruesos.
- b) Microfilamentos, que se encuentran distribuidos principalmente hacia la superficie celular.
- c) Filamentos intermedios, denominados así debido a su diámetro.

d) Red microtrabecular, que es una malla de estructura delgada.

Los microtúbulos están formados por polimerización de dímeros de tubulina, éstos dímeros son asimétricos y están constituidos por dos subunidades denominadas α y β . Los dímeros se unen regularmente entre sí y forman un filamento; 13 de estos filamentos se asocian lateralmente en una hélice izquierda para dar lugar al microtúbulo que es un tubo largo y hueco cuyo diámetro exterior es del orden de 25 nm. Todas las subunidades están orientadas de la misma manera, por lo tanto, un extremo presenta subunidades α y el otro subunidades β . La estructura es polarizada, explicando con ésta característica muchas de las propiedades fisiológicas de los microtúbulos (64).

La concentración de tubulina libre puede disminuir hasta un valor crítico, por arriba de éste la asociación de tubulina entre sí es espontánea. Margulis y col. (65) demostraron que constantemente se añaden subunidades de tubulina en uno de los extremos del microtúbulo (denominado +) y simultáneamente se pierden en el otro extremo (denominado -). Este evento se efectúa cuando la subunidad de tubulina que ha fijado al trifosfato de guanosina (GTP) se une más fácilmente al extremo (+). La energía proporcionada por el GTP sirve únicamente para conseguir la polimerización de la tubulina, por lo tanto, los microtúbulos están en un equilibrio constante de asociación-disociación.

Se ha demostrado que la colchicina se une a las moléculas de tubulina causando el bloqueo del autoensamblaje. Algunos compues-

tos sintéticos como el Nocodazol presentan una actividad similar. En la mayoría de los tipos celulares los microtúbulos desaparecen cuando las células son tratadas con nocodazol por 15 a 30 min. - Una vez eliminado el fármaco aparecen nuevamente los microtúbulos, lo que indica que se trata de un fenómeno reversible.

Mediante experimentos realizados a temperaturas bajas y con luz ultravioleta se observó destrucción de los microtúbulos inhibiéndose el proceso mitótico. Se obtuvo el mismo resultado utilizando colchicina, uniéndose específicamente a los microtúbulos e impidiendo el movimiento cromosomal durante la mitosis y la meiosis. También se ha asociado a los microtúbulos con la movilización de material de secreción ya que en presencia de colchicina se observó un bloqueo en la liberación de histamina e insulina. Debido a que los microtúbulos forman parte de los cilios, flagelos y colas de espermias, y que estos se relacionan con la movilidad celular se ha observado que la colchicina produce un bloqueo de la orientación en el movimiento de las células ⁽⁶⁶⁾. Cuando se destruyen los microtúbulos de una célula, su periferia empieza a ondularse de forma irregular, se pierde su aspecto polarizado, por lo que, se deduce que los microtúbulos desempeñan un papel importante en la conformación del citoesqueleto.

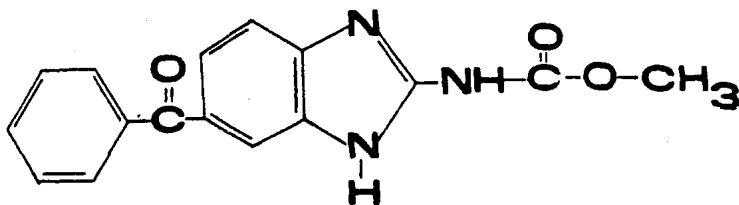
El sistema microtubular controla el tráfico citoplasmático de la inmensa mayoría de los organelos, determina su topografía ordenada, coordina la movilidad celular, determina la polaridad, la forma y el movimiento de las células, interviene directa o indirectamente a nivel de los receptores superficiales, por lo tan-

to, armoniza numerosos aparatos mecánicos, químicos y metabólicos de las células (64).

2.7.- Mebendazol.

2.7.1.- Propiedades Físicas.

El mebendazol [metil-N-(5-benzoil-2-benzimidazolil) carbamato] es un polvo amorfo amarillento, muy poco soluble en agua y en la mayor parte de los disolventes orgánicos, fácilmente soluble en ácido fórmico, benzaldehído, dimetil-sulfóxido, de sabor no degradable, con punto de fusión de 300°C, no es higroscópico y es estable al aire. Su fórmula desarrollada es la siguiente:



Este fármaco se desarrolló para tratar las infecciones por vermes redondos, como resultado de la investigación efectuada en Bélgica por Brugmans y col. en 1971 (67). Fué aprobado como un antihelmíntico de amplio espectro por la Food and Drug Administration (F.D.A.) en 1974, para usarse en el tratamiento de infecciones únicas o mixtas provocadas por Ascaris lumbricoides, Enterococcus

bius vermicularis, Trichuris trichiura y uncinariasis.

2.7.2.- Mecanismo de Acción.

Los experimentos realizados por Van Den Bossche y col. (68), demostraron que el mebendazol induce la desaparición de los microtúbulos citoplasmáticos causando cambios degenerativos en las células de absorción de los céstodos y nemátodos. Además, inhibe reversiblemente la captación de glucosa (69). Esto se refleja en una disminución de glucógeno almacenado en el parásito y la falta de éste da por resultado una disminución en la formación de trifosfato de adenosina (ATP), requerido como una fuente de energía necesaria para la reproducción y sobrevivencia del helminto. También se observa una alteración en la morfología ultraestructural del mismo ocasionada por un bloqueo en el transporte de los granulos secretorios del aparato de Golgi al citoplasma, acumulándose éstos y convirtiéndose en un citoplasma autolítico que libera enzimas proteolíticas e hidrolíticas, produciéndose la degeneración de las células del epitelio intestinal de parásito.

La inmovilización y muerte de los parásitos ocurre lentamente y la depuración del aparato gastrointestinal quizá sólo sea completa tres días después del tratamiento. Se observó que el fármaco no afecta la concentración de azúcar en la sangre de los huéspedes, incluso en dosis elevadas (70).

El fármaco inhibe el desarrollo de larvas de uncinarias "in-vitro" a una concentración de 50 mg/ml, concentraciones mayores carecen de efecto sobre las larvas plenamente formadas. Por otra-

parte, poco después de comenzar el tratamiento se ha observado - que los huevos de trichuria y uncinarias no se convierten en larvas. Por lo anterior se ha postulado que, la muerte del helminto - ocurre por uno ó mas de estos mecanismos: autólisis por libera - ción de enzimas hidrolíticas ó proteolíticas, problemas de absor - ción o digestión debido a alteraciones de las enzimas encargadas de estos procesos y/o bloqueo del transporte de materiales de las - glándulas secretoras.

2.7.3.- Farmacocinética.

Se ha observado que la cantidad del metabolito excretado por orina depende de la especie a la que se le administre; en perros fue del 1% mientras que en cerdos fue del 50% y en ratas se elimi - nó casi completamente sin alteración en las heces (71). La absor - ción del mebendazol en el tracto gastrointestinal es mínima. Se - realizaron estudios farmacocinéticos en voluntarios sanos a los - que se les administró una dosis de 0.1 mg/Kg de peso de mebenda - zol radiactivo (C^{14}) demostrandose que solamente se absorbió del - 5 al 10 % de la dosis y se excretó en la orina, el resto, se eli - minó en las heces sin cambio. Los niveles máximos en plasma repre - sentaron el 0.5% o menos de la radiactividad administrada y se al - canzaron durante las primeras 2 a 4 horas, la mayor parte del com - puesto no presentó cambios (71).

Por otra parte, Dawson y col. (72) realizaron estudios para - determinar la biotransformación del mebendazol en humanos. Se les administró el fármaco en cuatro diferentes dosis y formas farma - céuticas: 1) 5 tabletas de 100 mg, 2) 25 ml. de suspensión al 2 %,-

3) 5 cápsulas de 100 mg disperso el polvo en 0.9 ml de aceite y 4) un supositorio de 500 mg. Se analizó la orina observándose que son cuatro los metabolitos del mebendazol que se excretan: I) metil N-(5-benzoil-2-benzimidazolil) carbamato, II) 2-amino-5(6)-benzoilbenzimidazol, III) metil-5(6)[α -hidroxibenzil]benzimidazol carbamato y IV) 2-amino-5(6)[α -hidroxibenzil]benzimidazol; también determinaron que por vía oral solo se excreta del 1.33 al 1.85 % de la dosis administrada, mientras que por vía rectal no se obtuvo la presencia de alguno de los metabolitos. Concluyendo con esto que la eficiencia y biodisponibilidad del tratamiento con el fármaco depende de la forma farmacéutica administrada y que el mayor metabolito excretado en orina en el humano es el compuesto IV.

En el caso de quiste hidatídico en ratones, se administró mebendazol en dosis elevadas (50 mg/Kg/día), los animales estudiados no presentaron efectos adversos. Por otro lado, en pacientes con infección y expulsión masiva de nemátodos se presentaron síntomas pasajeros de dolor abdominal y diarrea, estos síntomas se correlacionaron con la gran cantidad de parásitos presentes en los pacientes.

2.7.4.- Efecto Antimicrotubular.

En los estudios realizados en ascaris que habfan sido tratados con mebendazol se encontró al compuesto unido a proteínas con pesos moleculares de aproximadamente 100, 000 y 50, 000 - 60, 000 daltones. El fármaco se encontró principalmente en el esófago y células intestinales del parásito debido a que el compuesto es ab

sorbido en el ascaris por dichos sitios. Por otra parte, los pesos moleculares de las proteínas corresponden al dímero y monómero de la tubulina, se explica con esto un posible mecanismo de la muerte del parásito, ya que la tubulina forma los microtúbulos y éstos participan en varias funciones celulares importantes en el transporte de materiales dentro de las células (71). Otros estudios realizados por Friedman y Platzer (73) que fueron comprobados posteriormente por Van Den Bossche (71) en 1980 confirmaron que el mebendazol se une a las subunidades de tubulina en un sitio cercano ó estructuralmente igual al punto de unión de la colchicina impidiendo la formación de microtúbulos.

2.7.5.- Toxicología.

La toxicidad del mebendazol por vía oral fue evaluado en varias especies de animales: en ratones, ratas y cobayos la LD₅₀ fue 1.28 g/Kg y en conejos, perros y gatos de 0.64 g/Kg. En estudios realizados en pollos no se observaron efectos colaterales con dosis de 1 ó 1.28 g/Kg y estudio clínicos realizados en ovejas no mostraron alteraciones con dosis de 300 mg/Kg.

En otros estudios realizados en ratas se observó que el mebendazol no afecta la fertilidad, con una dosis administrada de 40 mg/Kg por 14 y 60 días antes y después de la gestación, durante el período de lactancia (3 semanas) no se vió afectada la mortalidad, embarazo, ingesta de alimento y peso de las ratas reproductoras, tampoco se observaron diferencias en el número de descendientes, peso de las crías al nacer e incremento de peso de las mismas (71).

3.- ANTECEDENTES.

Como se mencionó anteriormente la administración del mebendazol (CBZ) ha sido generalmente en tratamientos agudos. Sin embargo, existen evidencias de su administración en forma crónica, en un estudio realizado en 40 pacientes con oncocercosis, en el sur-este de Chiapas, a los cuales se les administró una dosis de --- 2 g/día del fármaco durante 12 meses, no se observaron efectos secundarios durante el tratamiento y los resultados obtenidos fueron favorables (74).

En un estudio realizado en animales de laboratorio para evaluar la dosificación más adecuada del CBZ, se reportó que la vía intraperitoneal, es una forma favorable de administración, sin embargo, la característica de poca solubilidad del fármaco en agua, hace difícil la utilización de ésta vía. Aunque el CBZ es completamente soluble en dimetil sulfóxido (DMSO) se restringe el empleo de este solvente, ya que éste es tóxico. Por otra parte, la administración del fármaco por vía oral en dosis de 250 ppm en el alimento fue bien tolerado por los animales. Se valoraron los efectos producidos por la administración crónica del CBZ en ratas, a las dosis previamente determinadas por vía oral, analizándose hígado, pulmón y esternón. No se observaron alteraciones significativas ya que el fármaco muestra una absorción mínima (0.5-1.0%) por vía intestinal y se metaboliza principalmente en el hígado. Los valores bioquímicos obtenidos en esos órganos con relación a la síntesis de proteínas totales, los valores de celularidad y concentración de colágena se encuentran dentro de los valores norma-

les: Histológicamente se observó una leve esteatosis en el hígado que se incrementó ligeramente en las etapas avanzadas (90 y 150 - días) de la administración. Esto se puede correlacionar con los - estudios reportados sobre agentes bloqueadores de microtúbulos - que producen una acumulación de lipoproteínas de muy baja densi - dad (LMBD) y de otras proteínas. También en pulmón se encontró un pequeño infiltrado de células inflamatorias a las mismas etapas - de tratamiento. Sin embargo, histológicamente no se observaron al - teraciones morfológicas durante todo el tratamiento (8).

Por otra parte, se ha observado que los modelos utilizados - para inducir cirrosis hepática a ratas con CCl_4 produce en los - animales acumulación de líquido ascítico, pérdida de peso corpo - ral e incremento de colágena hepática. Los animales que recibie - ron 10 inyecciones de CCl_4 mostraron una reversibilidad de la ci - rrosis, mientras que animales a los cuales se les administró 20 - inyecciones de CCl_4 presentaron hígado graso retraimiento del ór - gano y una fibrosis consistente. Por consiguiente, el contenido - de colágena aumentó de tres a cuatro veces con respecto a los hí - gados normales. Además, se observó un incremento del 25% en el - contenido de ADN, así como un aumento en la capacidad biosintéti - ca del hígado. Los resultados histológicos concuerdan con los bio - químicos, encontrándose claramente la formación de bandas de colá - gena desde las 5 inyecciones. A las 20 inyecciones se observa la - formación de nódulos, pérdida de la arquitectura lobular, esteato - sis, necrosis celular, gruesos haces de colágena, presencia de in - filtrado inflamatorio, células adipocíticas y un alto contenido--

de fibroblastos (9).

En otro estudio realizado en ratas con cirrosis hepática que posteriormente fueron alimentadas con CBZ (250 ppm) se observó - una disminución en el contenido de colágena hasta obtener valores semejantes a los normales, mientras que en el grupo tratado únicamente con CCl_4 , se mantuvo el contenido de colágena hepática. Al comparar los diferentes tiempos de tratamiento (2, 3 y 6 semanas) en ambos grupos de animales (cirróticos y tratados con CBZ) los - estudios morfológicos revelaron que la fibrosis en el grupo con - CCl_4 fue más lenta en desaparecer que en el grupo tratado con CBZ, el cuál no mostró fibrosis en las últimas etapas de tratamiento, - pero sí cierto desorden en la organización celular y presencia de infiltrado inflamatorio en algunas zonas del hígado.

El fármaco está siendo utilizado en pacientes con cirrosis - hepática y en los resultados hasta el momento obtenidos (75), se puede observar:

- a) Disminución de la concentración de colágena después de 6- meses de tratamiento con CBZ.
- b) Disminución de los niveles de prolina sérica.
- c) Disminución de la colestasis.
- d) Aumento de la concentración de hemoglobina.
- e) Mejoría en el tiempo de protombina.
- f) Aumento en los niveles de albúmina sérica y disminución - de globulinas.
- g) Histológicamente, una disminución de la fibrosis pericelular y de la vena centrolobulillar.

4.-HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

En el estudio patológico de la cirrosis hepática por alcohol, el hígado se encuentra en el humano con un contenido abundante de fibroblastos que sintetizan activamente colágena. Esta proteína es excretada al espacio extracelular por vía microtubular. Debido a estas consideraciones, si el mebendazol se utiliza prolongadamente en éste u otro padecimiento en el que se presenta un desequilibrio en la síntesis y/o degradación de colágena, se podría contrarrestar el efecto fibrosante que caracteriza ésta y a otras enfermedades del tejido conjuntivo.

En base a los estudios previos de administración crónica del fármaco y el tratamiento de la cirrosis hepática experimental con el compuesto, se planteó la siguiente hipótesis: Se espera que el mebendazol tenga efecto primario sobre la producción de colágena hepática, debido a que inhibe la polimerización de tubulina y en consecuencia la formación de microtúbulos, impidiendo la secreción de proteínas que requieren de dicho sistema para su transporte, y en este caso en particular, de la colágena.

Los objetivos planteados en esta tesis son:

- 1.- Evaluar la capacidad del mebendazol para inhibir la secreción de colágena en la cirrosis hepática experimental a través de su actividad antimicrotubular.
- 2.- Determinar el posible efecto protector del compuesto administrado simultáneamente al desarrollo del protocolo de inducción de cirrosis hepática experi-

mental.

- 3.- Evaluar diferentes períodos de tratamiento, mediante distintas determinaciones bioquímicas y encontrar el tiempo en que el fármaco muestre actividad antifibrosante.

Los diferentes parámetros a determinar son los siguientes:

- 1) Valoración del grado de cirrosis hepática mediante cuantificación de la concentración de colágena por el método de determinación de hidroxiprolina en hidrolizados ácidos de tejidos.
- 2) Determinación del efecto del fármaco sobre la concentración de proteínas, por medio de la cuantificación de prolina como marcador de proteínas totales.
- 3) Determinación de la celularidad tisular por cuantificación de ADN, para detectar posibles alteraciones en la cantidad de células en el hígado.
- 4) Determinación de las alteraciones morfológicas, así como evolución de la cirrosis, por medio de cortes histológicos en los diferentes tiempos de tratamiento, utilizando técnicas de tinción convencionales como son hematoxilina y eosina y tricrómica de Massón.

3.- MATERIALES Y METODOS.

El material biológico para el desarrollo de esta tesis consistió de ratas machos de la cepa Sprague-Dawley de 6 semanas de edad y de aproximadamente 100 g., de peso corporal.

Los reactivos empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y del mejor grado disponible, siendo en su mayoría de grado analítico. El mebendazol (metil-N-(5-benzoil-2-benzimidazolil)carbamat) "CBZ", fue donado por los Laboratorios Janssen Pharmaceutic - de México; de los Laboratorios Merck, se obtuvieron la cloramina-T, el reactivo de difenil-amina, el 4-dimetil-amino-benzaldehído y la ninhidrina; de los Laboratorios Sigma de México se obtuvo el metil-celosolve.

Inducción de la cirrosis.

La cirrosis hepática experimental se indujo por medio de la administración de una dosis de 0.2ml. de una dilución 1:7 de tetracloruro de carbono (CCl_4) en aceite de olivo, por vía intraperitoneal tres veces por semana (9).

Formación de los grupos experimentales.

Se generaron 4 grupos de ratas que se clasificaron de la siguiente manera:

- A) Grupo Control: animales que no fueron agredidos y tuvieron alimentación normal.
- B) Grupo con Mebendazol: grupo al que se le administró mebendazol incorporado en el alimento (250 ppm).

C) Grupo con Tetracloruro de carbono: animales que recibieron te
tracloruro de carbono.

D) Grupo con Mebendazol y Tetracloruro de carbono: animales tra-
tados con tetracloruro de carbono y alimenta -
ción con mebendazol.

De cada grupo se sacrificaron de cuatro a seis animales a -
diferentes tiempos, después de haber sido iniciado el tratamien-
to:

a) 10 días equivalente a 5 inyecciones con CCl_4 .

b) 22 días " 10 " "

c) 35 días " 15 " "

d) 45 días " 20 " "

Obtención del hígado.

Cada rata se pesó previamente a la anestesia con cloroformo-
y luego se efectuó un corte transversal. El hígado se obtuvo com-
pleto por disección y se pesó, se separó el lóbulo mayor para ser
cortado en rebanadas finas, dos fragmentos de tejido se fijaron -
en formalina neutra al 10% para los estudios histológicos. El res
to del lóbulo se dejó en solución salina para posteriormente hacer
las determinaciones bioquímicas.

Análisis bioquímico.

Los análisis bioquímicos realizados incluyeron:

a) Cuantificación de la concentración de colágena en los tejidos-
para determinar el grado de fibrosis en el hígado (determina -
ción de hidroxiprolina).

- b) Determinación de la concentración de ADN con el objeto de valorar posibles cambios en la celularidad del tejido.
- c) Cuantificación de proteínas totales para determinar las posibles alteraciones en las proteínas no colagénicas (determinación de prolina).

Cuantificación de colágena tisular por determinación de hidroxiprolina en hidrolizados ácidos de los tejidos.

Para la determinación cuantitativa de hidroxiprolina se empleó el método de J.F.Woessner Jr. (76) en el cual se puede determinar en materiales biológicos una concentración de una parte de hidroxiprolina en 4 000 partes de aminoácidos. Por lo tanto, este método puede ser utilizado para el estudio de la distribución de hidroxiprolina en diferentes tejidos y fluidos tisulares.

Se tomaron muestras de aproximadamente 100mg de tejido fresco, se deshidrataron por incubación a 100° C en una estufa (Thelico) hasta obtener peso constante (72 Hrs.). Posteriormente los tejidos se hidrolizaron con ácido clorhídrico 6N (HCl 6N) dentro de ampollitas de vidrio selladas al vacío, que se incubaron a 100°C durante 48 Hrs. Después de la incubación, los hidrolizados se filtraron y se evaporaron a sequedad. Finalmente las muestras se resuspendieron en 2ml. de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7 y se tomaron alícuotas apropiadas (25, 50 y 100 μ l) para la determinación colorimétrica.

Preparación de soluciones:

Estándar.- Se pesaron 25 mg de L-hidroxiprolina secada al vacío en 25ml de agua. Los estándares se prepararon de inme-

diato antes de ser usados, diluyendo esta solución -
con agua bidestilada hasta obtener una concentración-
de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Amortiguadora.- Se disolvieron los siguientes reactivos:

ácido cítrico monohidratado	50.0 g
ácido acético glacial	15.0 ml
acetato de sodio trihidratado	120.0 g
hidróxido de sodio	34.0 g

Se aforó con agua bidestilada a 1 000.0 ml

Antes de aforar se ajustó el pH a 6.0 y se almacenó en
refrigeración con tolueno.

Cloramina T.- Se preparó una solución 0.05 M inmediatamente antes
de usar, disolviendo 1.4 g de cloramina T en 20 ml de
agua bidestilada a lo que se le agregaron 30 ml de me-
tilcelosolve y 50 ml de solución amortiguadora.

Metilcelosolve.- Corresponde al solvente orgánico éter monoetilí-
co de etilen glicol.

Acido perclórico.- Se preparó una solución 3.15 M diluyendo 27 ml
de ácido perclórico al 70% (grado reactivo) en 100 ml-
de agua bidestilada.

p-Dimetil-amino benzaldehído.- Se preparó una solución fresca al-
20% agregando metilcelosolve a 20g de p-dimetil-amino -
benzaldehído (grado reactivo) hasta un volúmen final -
de 100 ml. Puede calentarse a 60°C para facilitar la -
solubilización.

Técnica.-

Cada alícuota del hidrolizado se llevó a 2 ml con agua bidestilada, se adicionó 1 ml de cloramina T y se agitó e incubó a temperatura ambiente por 20 min. Después, se agregó 1 ml de ácido perclórico y se agitó e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente se agregó 1 ml de p-dimetil-amino benzaldehído agitando fuertemente y se calentó a 60°C por 20 min. Se enfrió con agua corriente por 5 min y se determinó la absorbancia a 557 nm en un fotocolorímetro (Spectronic 2 000 Bausch & Lomb).

Paralelamente con cada grupo de determinaciones se desarrolló una curva estándar de hidroxiprolina con una solución de 10 $\mu\text{g/ml}$, tomándose volúmenes correspondientes a 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 μg .

Cuantificación de proteínas totales por determinación de prolina en hidrolizados de los tejidos.

Para la determinación cuantitativa de prolina se empleó el método de Trolly Lindsley ⁽⁷⁷⁾, que es también aplicable en muestras de tejidos y fluidos biológicos.

Preparación de soluciones.-

Estándar.- Se pesaron 11.5 mg de prolina secada al vacío en 10 ml de agua bidestilada. Se diluyó una alícuota de la solución hasta una concentración final de 1 $\mu\text{mol/ml}$.

Acido fosfórico.- Se preparó una solución 6N diluyendo 11.6 ml de ácido fosfórico al 85% (grado reactivo) en 100 ml de agua bidestilada.

Ninhidrina.- Se preparó mezclando los siguientes reactivos:

1.25 g de ninhidrina.

30.0 ml de ácido acético glacial.

20.0 ml de ácido fosfórico 6N.

Técnica.-

De los tejidos hidrolizados previamente se tomaron diferentes alícuotas de las muestras y se llevaron a 1.5 ml con agua bidestilada. Se adicionaron 1.5 ml de ácido acético y 1.5 ml de solución de ninhidrina a cada tubo.

Se agitaron los tubos y se incubaron en baño maría por 60 min. a ebullición. Se enfriaron con agua corriente y se determinó la absorbancia a 515 nm en un fotocolorímetro.

Paralelamente con cada grupo de determinaciones se desarrolló una curva estándar de prolina con una solución 1.0 μ mol/ml, tomándose volúmenes correspondientes a 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 μ moles.

Determinación de ADN.

La determinación de ADN se realizó según el método de difenil-
-amina de Burton (78).

Se pesaron 100 mg de tejido fresco y se homogeneizaron con 10 ml de solución salina. Se tomaron alícuotas del homogenado de 0.2 ml y se llevaron a un volúmen final de 0.5 ml y concentración final 0.5 M con ácido perclórico, para hidrolizarse durante 20 min. a 70°C. Para cada determinación se elaboró una curva estándar de ADN de timo de ternera en un intervalo de concentraciones-

de 10 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se adicionó a todas las muestras 1 ml de solución de trabajo que se preparó de la siguiente manera:

Reactivo A.-

1.5 g de difenil-amina.

100 ml de ácido acético glacial.

1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Reactivo B.-

16 mg/ml de acetaldehído en agua.

La solución de trabajo contenía 100 μl del reactivo B por cada 20 ml de reactivo A.

Las muestras se agitaron e incubaron a 30°C de 16 a 20 Hrs.- Posteriormente se centrifugaron a 12 500 rpm y al sobrenadante se le determinó su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Zeiss).

Análisis morfológico.

Para la realización de los estudios morfológicos se tomaron fragmentos de cada uno de los hígados de todos los grupos (control y experimentales).

Los tejidos se fijaron en solución de formalina neutra (pH= 7.4) y a las 24 Hrs. se cambiaron a una solución amortiguadora de fosfatos.

Se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes semifinos de 6 μ . Se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E), así como con la tinción tricrómica de Massón de acuerdo con las técnicas convencionales de histología ya conocidas.

6.- RESULTADOS.

Inicialmente se establecieron diferentes parámetros bioquímicos para determinar el posible efecto protector del mebendazol, - administrado simultáneamente a la inducción de cirrosis hepática experimental. Se determinó individualmente el peso corporal, el peso del hígado y el del lóbulo mayor. No se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados y los controles. Posteriormente se procedió a realizar las determinaciones bioquímicas respectivas como se describió en la sección de Materiales y Métodos.

Los valores normales se obtuvieron de un grupo control que se generó con ratas sin tratamiento, con edades equivalentes a los grupos experimentales con 5, 10, 15 y 20 inyecciones de CCl_4 . Debido a que las concentraciones de prolina e hidroxiprolina no mostraron variación de una edad a otra, los datos se promediaron obteniéndose así los valores normales comparativos, así como las desviaciones estándar respectivas. En la figura 5 se presentan los cortes histológicos de los hígados de las ratas normales, se observó que al igual que en los valores bioquímicos no se encontraron cambios morfológicos ó desorden celular a las diferentes edades de los animales.

Grupo Tratado con CCl_4 .

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos al evaluar el grupo con CCl_4 . Como puede observarse, a las 10 inyeccio-

Figura 5.- A) y B) Cortes histológicos del parénquima hepático de ratas normales. Cortes transversales en microscopía de luz. 78.7 X. Tinción de hematoxilina y eosina. a) Hepatocitos, b) Espacio porta, c) Vena central y d) Sinusoides.

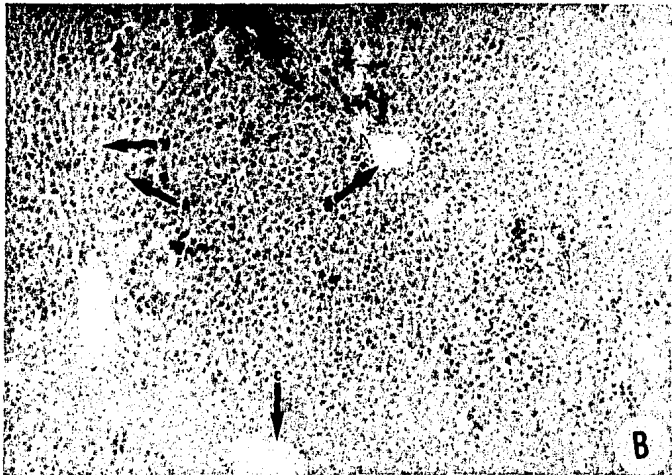
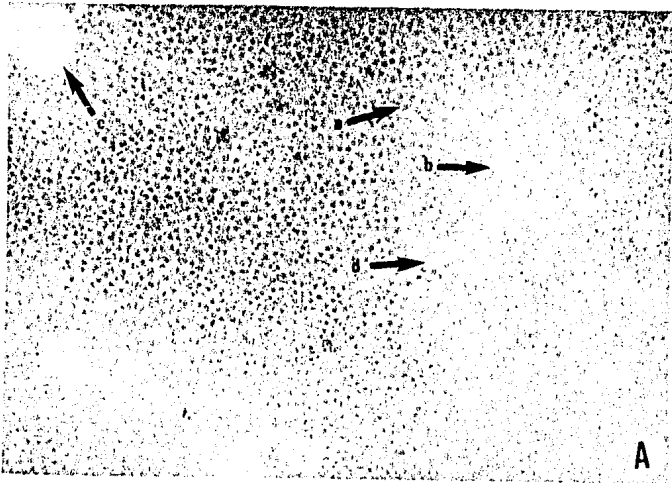


TABLA IV.- DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE COLAGENA EN HIGADOS DE RATAS CON CIRROSIS EXPERIMENTAL INDUCIDA CON TETRACLORURO DE CARBONO (CCl₄) a).

GRUPO	Prolina en Proteínas Totales (mg/gts)	Hidroxiprolina en Colágena (mg/gts)	Relación Pro/OH-Pro	Colagena / Proteínas Totales
NORMAL	34.66 ± (5.41) b)	1.04 ± (0.22)	34.27 ± (6.98)	1.25 ± (0.33)
CCl ₄ (iny)				
5	31.26 ± (3.72)	1.36 ± (0.16)	23.01 ± (3.34)	1.80 ± (0.24)
10	32.35 ± (3.13)	3.18 ± (0.53)	10.19 ± (1.92)	4.31 ± (0.87)
15	31.92 ± (1.85)	3.10 ± (0.32)	10.38 ± (1.08)	4.13 ± (0.48)
20	36.24 ± (6.47)	5.07 ± (0.66)	7.19 ± (1.21)	6.13 ± (1.16)

a) Grupo de ratas Sprague-Dawley machos de 6 semanas de edad que recibieron CCl₄ intraperitoneal (dilución 1:7 en aceite de olivo).

b) Los valores entre paréntesis, representan la desviación estándar. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Los valores representan los resultados obtenidos utilizando de 4 a 6 animales por experimento.

nes la concentración de hidroxiprolina fue de $3.18 \pm (0.53)$ mg/gts (miligramos/gramos de tejido seco), mientras que a las 20 inyecciones la concentración ascendió a $5.07 \pm (0.66)$ mg/gts. Es evidente que el grado de fibrosis es mayor, así como la evolución de la cirrosis, obteniéndose valores cuatro veces más altos que los normales. Por otro lado, la concentración de prolina utilizada como marcador de proteínas totales no mostró diferencias significativas con respecto al valor normal, siendo de $36.24 \pm (6.47)$ mg/gts para los animales tratados con 20 inyecciones y de $34.66 \pm (5.41)$ mg/gts para los animales controles. En consecuencia, la relación-Pro/HO-Pro, la cuál indica la proporción de proteínas colagénicas con respecto a las proteínas totales se vió afectada, disminuyendo conforme aumentó la hidroxiprolina, de $34.27 \pm (6.98)$ (normal) a $10.19 \pm (1.92)$ para los animales tratados con 10 inyecciones de CCl_4 y hasta $7.19 \pm (1.12)$ para los animales que recibieron 20 inyecciones. Con respecto al porciento de colágena en relación a las proteínas totales, se observó un incremento del 244 % comparado con el valor normal [normal: $1.25 \pm (0.33)$; 10 inyecciones: $4.31 \pm (0.87)$]. Este aumento alcanzó valores de 390 % a las 20 inyecciones [$6.13 \pm (1.16)$].

Los resultados obtenidos en las determinaciones de la concentración de colágena y ADN se presentan en la tabla V. La concentración de colágena se incrementó gradualmente de $7.72 \pm (1.61)$ mg/gts (valor normal), hasta $37.62 \pm (4.88)$ mg/gts de colágena (20 inyecciones de CCl_4), para ADN también se vieron incrementados de $8.99 \pm (2.20)$ mg/gts a $20.07 \pm (1.34)$ mg/gts. Como puede -

TABLA V.- VALORES PARA LAS CONCENTRACIONES DE COLÁGENA Y ADN EN RATAS INDUCIDAS CON CCl_4 .

GRUPO	Colágena (mg/gts)	ADN (mg/gts)	Relación: Colágena/ ADN
NORMAL	7.72 ± (1.61)	8.99 ± (2.20)	0.86
CCl_4 (iny)			
5	10.14 ± (1.20)	14.43 ± (2.15)	0.70
10	22.69 ± (3.76)	12.17 ± (1.57)	1.86
15	23.01 ± (2.33)	15.59 ± (2.86)	1.48
20	37.62 ± (4.88)	20.07 ± (1.39)	1.87

observarse tanto las concentraciones de colágena como de ADN se incrementaron; sin embargo, debido a que éste incremento no fue proporcional en los dos parámetros, la relación entre ambos si se modificó, variando de 0.86 a 1.87.

Con relación a los estudios histológicos correspondientes, los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. Se observó una correlación morfológica con las determinaciones bioquímicas de colágena a los diferentes tiempos. A las 5 inyecciones se puede observar una esteatosis moderada sin presencia de bandas de colágena, mientras que a las 10 inyecciones la esteatosis es menor pero se acompaña de necrosis celular y existe la formación de bandas de colágena las cuales son más aparentes a las 15 inyecciones. A las 20 inyecciones la fibrosis es predominante, la arquitectura lobular se destruye por la formación de nódulos irregulares que impiden el funcionamiento del órgano, existiendo también necrosis celular.

Grupo Tratado con Mebendazol.

En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de los animales tratados crónicamente con CBZ en la dieta. Como puede observarse no se modificó significativamente la concentración de prolina en proteínas totales (normal: $34.66 \pm (5.41)$ mg/gts y a 45 días: $33.32 \pm (5.92)$ mg/gts); a los 35 días de tratamiento se determinó un ligero aumento [$38.18 \pm (2.80)$ mg/gts] el cuál está dentro del valor normal. En cuanto a la concentración de hidroxiprolina en colágena, se apreció que, los va-

Figura 6.- Cortes histológicos del parénquima hepático de ratas tratadas con CCl_4 . Cortes transversales en microscopía de luz. 78.7 X. Tinción de hematoxilina y eosina. A) 5 inyecciones, B) 10 inyecciones, C) 15 inyecciones y D) 20 inyecciones. a) Hepatocitos, b) Espacio porta, c) Vena central, d) Sinusoides, e) Infiltrado celular, f) Fibras de colágena y g) Vacuolas lipídicas.

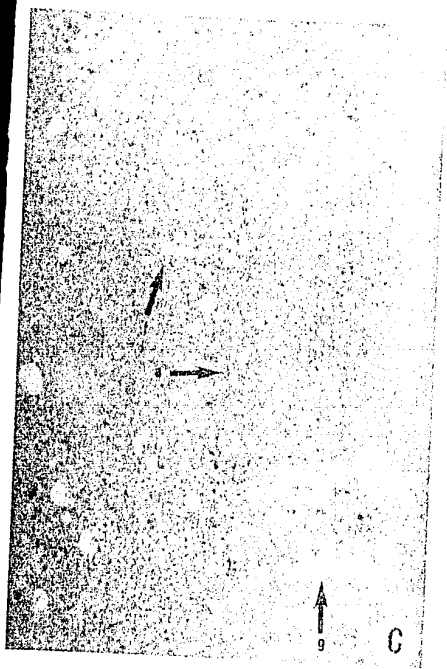
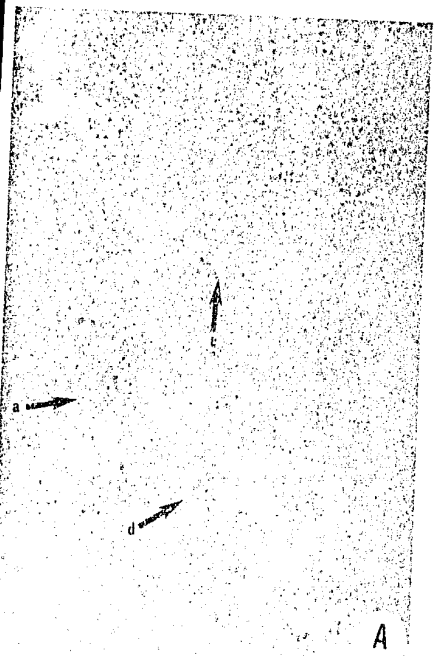


TABLA VI.- DETERMINACION DE PORCENTAJE DE COLAGENA EN HIGADOS DE RATAS
SOMETIDAS A DIETAS CRONICAS DE CBZ ^{c)}.

GRUPO	Prolina en Proteínas Totales (mg/gts)	Hidroxiprolina en Colágena (mg/gts)	Relación Pro/OH-Pro	Colágena / Proteínas Totales %
NORMAL	34.66 ± (5.41)	1.04 ± (0.22)	34.27 ± (6.98)	1.25 ± (0.33)
CBZ (días)				
10	27.57 ± (3.32)	1.02 ± (0.29)	28.22 ± (5.92)	1.61 ± (0.62)
22	34.99 ± (3.89)	1.21 ± (0.16)	29.29 ± (3.48)	1.41 ± (0.16)
35	38.18 ± (2.80)	0.86 ± (0.12)	47.18 ± (8.01)	0.92 ± (0.15)
45	33.32 ± (5.92)	1.11 ± (0.24)	30.50 ± (2.77)	1.35 ± (0.13)

c) Grupo de ratas Sprague-Dawley machos de 6 semanas de edad que recibieron CBZ en la dieta (250 ppm).

lores permanecieron sin modificarse durante el tratamiento, con excepción del grupo tratado a los 35 días, en donde existió una ligera disminución de $1.04 \pm (0.22)$ mg/gts a $0.86 \pm (0.12)$ mg/gts, igualmente se encuentra dentro de las variaciones obtenidas para el valor normal. Por consiguiente el índice Pro/HO-Pro a los 35 días del tratamiento se vio incrementado, ya que el ligero aumento en prolina, así como la disminución en hidroxiprolina hacen más aparente ésta relación [normal: $34.27 \pm (6.98)$ y a 35 días: $47.18 \pm (8.01)$]. En los demás tiempos del tratamiento no se observaron cambios que fueran significativos [22 días: $29.29 \pm (3.48)$ y a 45 días: $30.50 \pm (2.77)$]. Con respecto al porcentaje de colágeno en relación a las proteínas totales no se observaron variaciones significativas en los valores, [normal: $1.25 \pm (0.33)$; 45 días: $1.35 \pm (0.13)$]. Sin embargo, la disminución a los 35 días está relacionada nuevamente con las variaciones en los valores de hidroxiprolina y prolina obtenidos para este tiempo del tratamiento (ver tabla VI).

En la tabla VII se presentan los valores obtenidos en las determinaciones de la concentración de colágena y ADN del grupo al que se le administró en forma crónica CBZ. La concentración de colágena en este grupo de animales se observó sin modificaciones considerables, el valor a los 35 días del tratamiento con CBZ disminuyó de $7.72 \pm (1.61)$ mg/gts (normal) hasta $5.79 \pm (2.35)$ mg/gts (35 días). Esta disminución puede ser debida a una dilución en la concentración de colágena con respecto a las proteínas totales.

TABLA VII.- VALORES PARA LAS CONCENTRACIONES DE COLAGENA Y ADN EN RATAS
CON DIETAS CRONICAS DE CBZ.

GRUPO	Colágena (mg/gts)	ADN (mg/gts)	Relación Colágena/ ADN
NORMAL	7.72 ± (1.61)	8.99 ± (2.20)	0.86
CBZ (días)			
10	7.63 ± (2.34)	13.31 ± (3.21)	0.57
22	8.95 ± (1.21)	17.18 ± (0.56)	0.52
35	5.79 ± (2.35)	17.78 ± (3.66)	0.33
45	8.20 ± (1.76)	14.78 ± (3.65)	0.55

Por otra parte, la concentración de ADN se observó incrementada, éste aumento fue máximo a los 35 días [normal: $8.99 \pm (2.20)$ mg/gts; 35 días: $17.18 \pm (3.66)$ mg/gts]. Sin embargo, a los 45 días disminuyó a $14.78 \pm (3.65)$ mg/gts. Por consiguiente la relación de colágena/ADN se modificó, disminuyendo ligeramente de 0.86 (normal) a 0.55 (45 días); a los 35 días se obtuvo el menor valor debido a la ligera disminución en la concentración de colágena y al incremento en la de ADN.

En relación al análisis histológico (figura 7), se observó a los 10 días que la arquitectura lobular y apariencia de los hepatocitos fue normal. Sin embargo, a los 22 días aparece una ligera esteatosis acompañada de infiltrado de células mononucleares, que se hace más aparente y alcanza su máximo a los 35 días del tratamiento. Finalmente, a los 45 días la arquitectura lobular y apariencia general del hígado presenta características normales.

Grupo Tratado Simultáneamente con CCl_4 y CBZ.

En la tabla VIII se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del grupo tratado simultáneamente. La concentración de prolina en proteínas totales no sufrió variaciones [valor normal: $34.66 \pm (5.41)$ mg/gts; 22 días: $35.85 \pm (3.34)$ mg/gts y 45 días: $36.46 \pm (3.22)$ mg/gts]. Sin embargo, la concentración de hidroxiprolina sí varió, incrementando lentamente de $1.04 \pm (0.22)$ mg/gts (normal) a $1.60 \pm (0.27)$ mg/gts (22 días), hasta $2.55 \pm (1.15)$ mg/gts (45 días). Los valores anteriores representan un 54 y 145 % de aumento en los animales tratados a los 22 y 45 días respectivamente.

Figura 7.- Cortes histológicos del parénquima hepático de ratas tratadas únicamente con CBZ. Cortes transversales en microscopía de luz. 78.7 X. Tinción hematoxilina y eosina. A) 10 días de CBZ, B) 22 días de CBZ, C) 35 días de CBZ y D) 45 días de de CBZ. a) Hepatocitos, b) Espacio porta, c) - Sinusoides y d) Infiltrado celular.

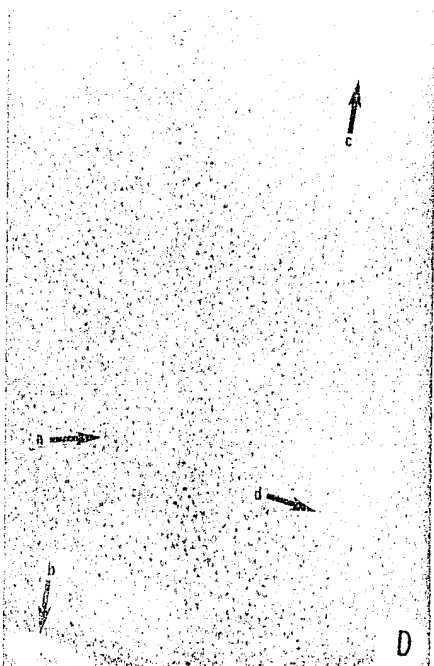
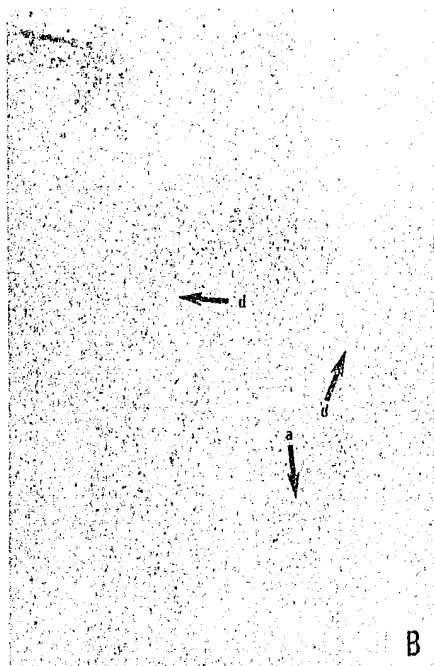
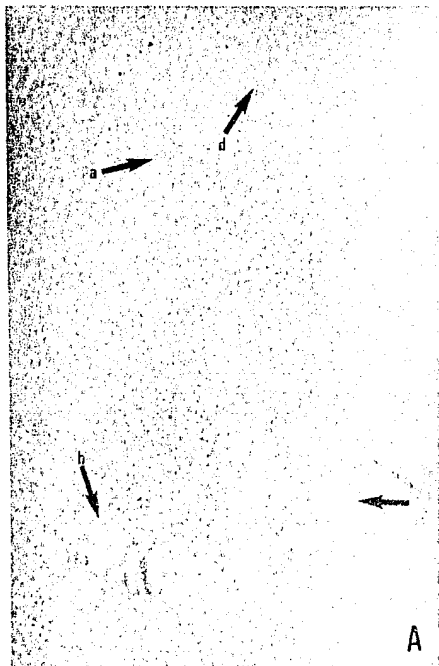


TABLA VIII.- DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE COLAGENA EN HIGADOS DE RATAS SOMETIDAS A DIETA CRONICA DE CBZ SIMULTANEAMENTE CON CCl_4 ^{d)}.

GRUPO	Prolina en Proteínas Totales (mg/gts)	Hidroxiprolina en Colágena (mg/gts)	Relación Pro/OH-Pro	Colágena/ Proteínas Totales
NORMAL	34.66 ± (5.41)	1.04 ± (0.22)	34.27 ± (6.98)	1.25 ± (0.33)
CCl_4 + CBZ				
iny días				
5 10	31.89 ± (3.11)	1.09 ± (0.17)	29.45 ± (3.31)	1.39 ± (0.17)
10 22	35.85 ± (3.34)	1.60 ± (0.27)	22.87 ± (3.84)	1.84 ± (0.30)
15 35	32.74 ± (7.67)	1.82 ± (0.38)	19.09 ± (6.57)	2.47 ± (0.92)
20 45	36.46 ± (3.22)	2.55 ± (1.15)	16.79 ± (6.45)	2.91 ± (1.31)

d) Grupo de ratas Sprague-Dawley machos de 6 semanas de edad que recibieron CBZ en la dieta (250 ppm) simultáneamente con CCl_4 intraperitoneal (dilución 1:7 en aceite de olivo).

mente. Debido a lo anterior, se modificó la relación Pro/HO-Pro - disminuyendo de $34.27 \pm (6.98)$ (normal) a $22.87 \pm (3.84)$ (22 días), hasta $16.79 \pm (6.45)$ (45 días). El descenso fue proporcional a la disminución en la concentración de hidroxiprolina. Recíprocamente, el porcentaje de colágena con relación a proteínas totales se elevó paulativamente de $1.25 \pm (0.33)$ (normal) a $1.84 \pm (0.30)$ (22 días) y hasta $2.91 \pm (1.31)$ (45 días).

En la tabla IX se muestran los resultados obtenidos en la - evaluación de la concentración de colágena y ADN. Se observó, que la concentración de colágena se incrementó de $7.72 \pm (1.61)$ mg/gts (normal) hasta $18.89 \pm (8.57)$ mg/gts (45 días). Es evidente que - el grado de fibrosis se modificó conforme se incrementó la concen - tración de colágena hasta alcanzar un aumento del 145 %. Sin em - bargo, este incremento fue menor que el observado para el grupo - tratado únicamente con CCl_4 que fue de 390 %.

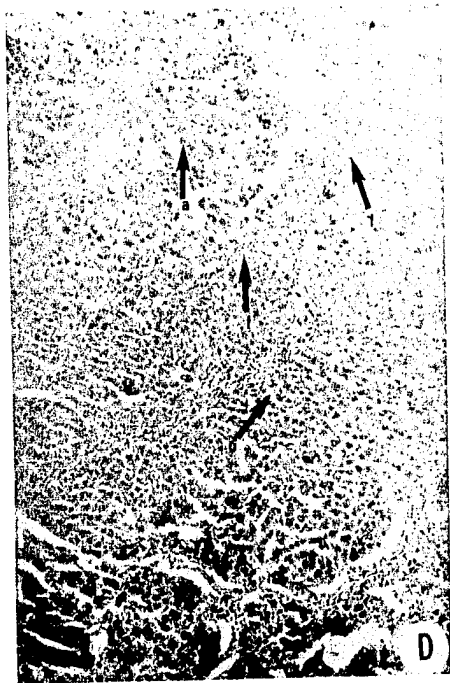
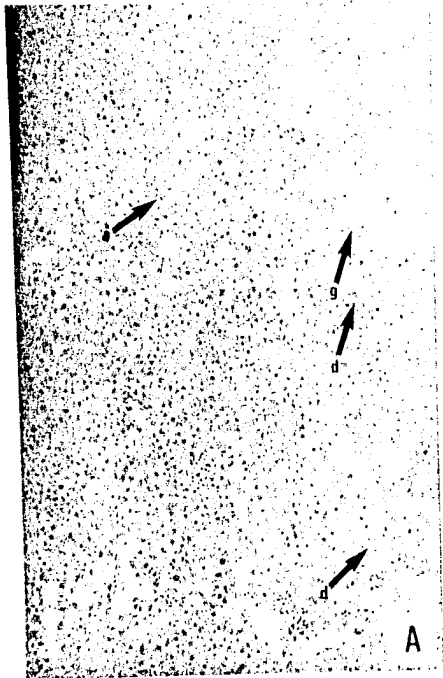
Por otra parte, la concentración de ADN se elevó ligeramente, del valor normal: $8.99 \pm (2.20)$ mg/gts hasta $11.29 \pm (0.98)$ mg/gts a los 45 días. Por lo tanto, la relación de colágena/ADN también - mostró variaciones, el valor obtenido a los 10 días (0.72) se en - cuentra dentro del valor normal (0.86), posteriormente se incremen - tó lentamente ya que las concentraciones de colágena y ADN se ele - varon, aunque no en forma proporcional, mostrando valores de 1.01 a los 22 días y de 1.67 a los 45 días.

En la figura 8 se presenta el análisis histológico de los - grupos tratados simultáneamente. Los resultados obtenidos concuer - dan con los datos bioquímicos. Se puede observar a los 10 días -

TABLA IX.- VALORES DE LA CONCENTRACION DE COLAGENA Y ADN EN
RATAS CON DIETA DE CBZ SIMULTANEAMENTE CON CCl₄.

GRUPO		Colágena (mg/gts)	ADN (mg/gts)	Relación Colágena/ADN
NORMAL		7.72 ± (1.61)	8.99 ± (2.20)	0.86
CCl ₄ + CBZ				
iny	días			
5	10	8.03 ± (1.22)	11.10 ± (1.78)	0.72
10	22	11.92 ± (2.13)	11.80 ± (3.58)	1.01
15	35	13.49 ± (2.85)	12.48 ± (1.93)	1.08
20	45	18.89 ± (8.57)	11.29 ± (0.98)	1.67

Figura 8.- Cortes histológicos del parénquima hepático de ratas tratadas simultáneamente con CCl_4 y CBZ. Cortes transversales en microscopía de luz. - 78.7 X. Tinción de hematoxilina y eosina. A)- 10 días de CBZ y 5 inyec. B) 22 días de CBZ y 10 inyec. C) 35 días de CBZ y 15 inyec. D) - 45 días de CBZ y 20 inyec. a) Hepatocitos, - b) Espacio porta, c) Vena central, d) Sinu - soides, e) Infiltrado celular, f) Fibras de - colágena y g) Vacuolas lipídicas.



una ligera esteatosis sin presencia de bandas de colágena, la cuál se ve disminuida a los 22 días del tratamiento con la aparición simultánea de ligeras bandas de colágena. Posteriormente, a los 35 días estas bandas son más aparentes y se observa infiltrado celular mononuclear. Finalmente a los 45 días el cuadro es de una fibrosis moderada, sin la presencia de necrosis celular, existe la formación de nódulos al igual que bandas de colágena. Sin embargo, estos resultados no son comparativos ni predominantes como se determinó en el grupo tratado únicamente con CCl_4 .

Por otra parte en la figura 9 se presentan en forma gráfica los resultados obtenidos de la evaluación de la concentración de colágena, así como del porcentaje de colágena con relación a las proteínas totales en los tres grupos estudiados. Como se observa en la gráfica, los valores del grupo tratado con CCl_4 son mayores en todos los tiempos, mientras que en el grupo tratado con CCl_4 y CBZ los valores están por debajo del grupo cirrótico (CCl_4).

En la figura 10 se encuentran los resultados de las relaciones de colágena/ADN y de Pro/HO-Pro de todos los grupos analizados, se observa claramente como el grupo tratado con CCl_4 y CBZ no iguala los valores obtenidos para el grupo con CCl_4 .

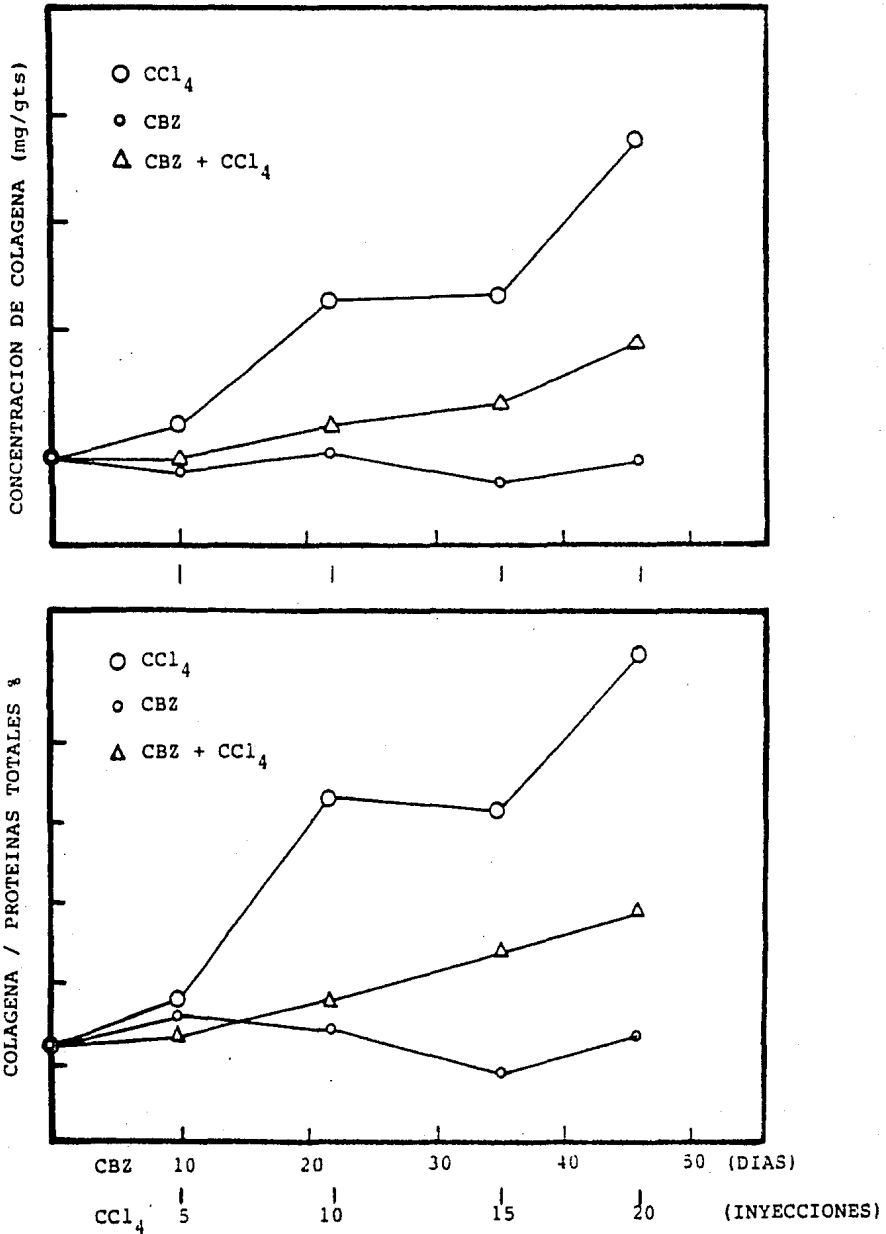


Figura 9.

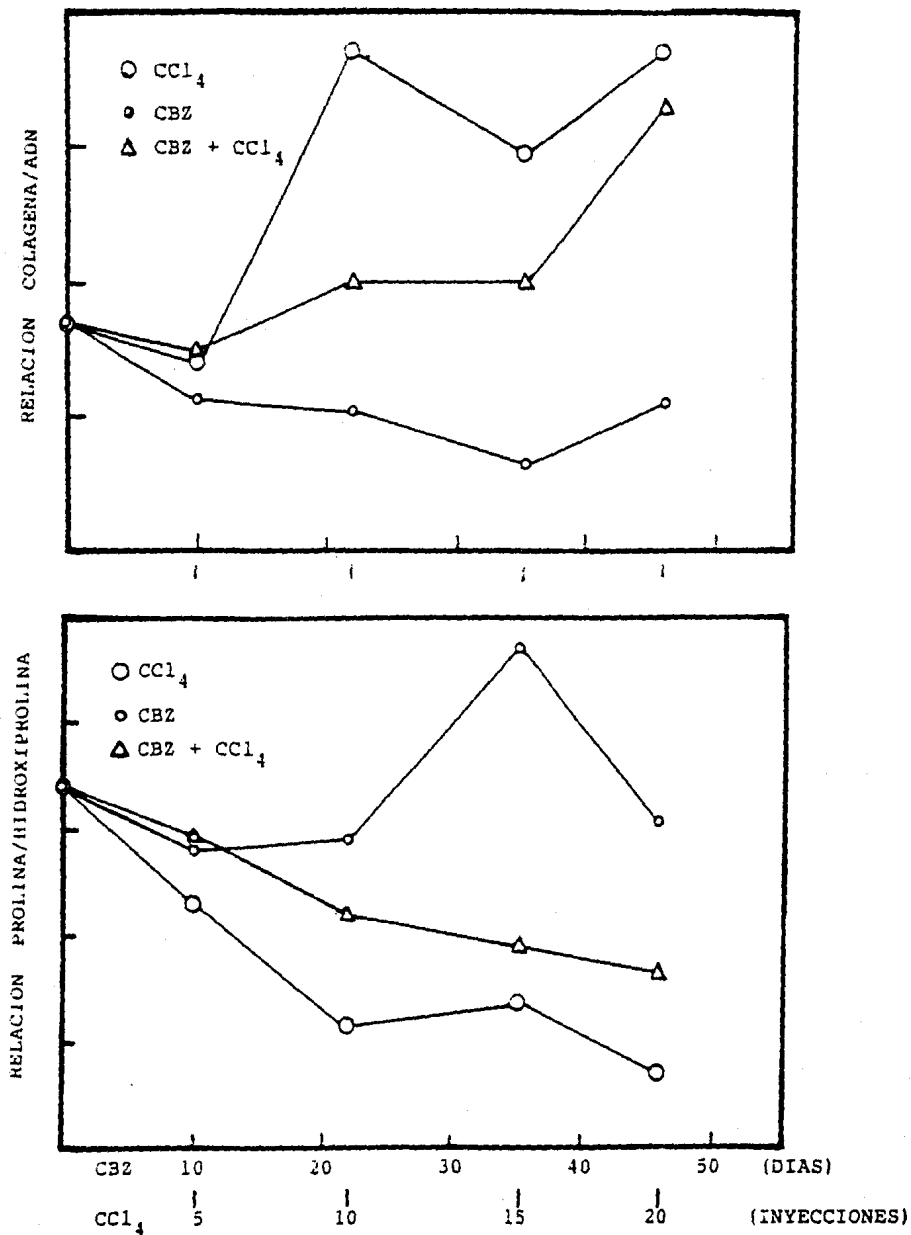


Figura 10.

7.- DISCUSION DE RESULTADOS.

El mebendazol fue aceptado para su utilización como antihelmíntico de amplio espectro en 1973, para ser empleado en el tratamiento de parasitosis intestinales. Brugmans y col. (67) sintetizaron el compuesto con ciertas características químicas que lo hicieron muy poco soluble en agua (se obtiene una solución saturada de mebendazol al 0.05 - 0.1%). Se ha reportado que el compuesto es soluble en dimetil sulfóxido; sin embargo, éste solvente es sumamente tóxico y produce alteraciones orgánicas. Debido a lo anterior, se elaboró un protocolo en el que el mebendazol fue administrado oralmente en la dieta (250 ppm).

Como se observa en los resultados correspondientes al estudio bioquímico del grupo tratado crónicamente con mebendazol (CBZ), los valores de la concentración de proteínas totales y colágena no mostraron variaciones significativas, encontrándose los datos dentro del valor normal excepto a los 35 días del tratamiento, en donde se observó un ligero aumento en la concentración de proteínas totales y una ligera disminución en la concentración de colágena. Esta disminución puede deberse a un efecto de dilución con respecto a las proteínas totales que como consecuencia incrementa la relación Pro/HO-Pro, además se detectó un incremento máximo en la concentración de ADN. Histológicamente se observó una ligera esteatosis que igualmente fue máximo a este tiempo del tratamiento. Posteriormente estos cambios desaparecieron obteniéndose valores a los 45 días dentro del normal. Las alteraciones producidas-

durante el tratamiento posiblemente se deban a que como ya se reportó (79), compuestos que tienen actividad antimicrotubular pueden producir una acumulación de las vesículas secretoras encontrándose en éstas lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD). Estos fármacos producen un bloqueo e nivel de secreción y no de síntesis de proteínas.

Como ya se había demostrado, el CBZ no produce alteraciones bioquímicas ni morfológicas en varios órganos corporales de animales experimentales cuando se administra crónicamente (8). Debido a su pobre absorción intestinal (0.5 - 1.0%), no se producen efectos secundarios, ni colaterales en el organismo de pacientes con nemátodos intestinales tratados con el medicamento (69).

Por otra parte, un grupo de pacientes con oncocercosis se les administró CBZ (2g/día) durante 12 meses, siendo favorables los resultados y no se produjeron efectos secundarios en ninguno de los pacientes durante el tratamiento (74).

Con respecto al grupo tratado con CCl_4 se observó un incremento en las concentraciones de hidroxiprolina, colágena, porción de colágena con relación a proteínas totales, concentración de ADN y en consecuencia en la relación Colágena/ADN. Todos estos parámetros demuestran que a los animales de este grupo si se les indujo cirrosis hepática. La evolución de esta cirrosis fue rápidamente observándose bioquímica e histológicamente los cambios producidos aún desde las 5 inyecciones de CCl_4 . A las 20 inyecciones la concentración de colágena fue cuatro veces más alta que para el gru-

po normal. Como se ha reportado (44,45) la administración intraperitoneal de CCl_4 en los animales produce cirrosis hepática, debido a que éste compuesto es un hepatotóxico potente y es metabolizado por el citocromo P-450 a radicales triclorometilo como un intermediario reactivo. La secuencia de eventos que conducen a la necrosis celular hasta ahora no se ha definido. Se han considerado tres efectos principales:

- 1.- Disminución de piridin nucleótidos.
- 2.- Unión covalente a proteínas y lípidos.
- 3.- Peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos puede causar:

- a) Daño en la membrana lisosomal liberando enzimas hidrolíticas.
- b) Disminución de la actividad enzimática de la glucosa 6-fosfatasa, NADPH - citocromo c -reductasa, citocromo P-450 y UDP-glucuronil transferasa.
- c) Formación de compuestos que pueden ser capaces de inhibir la actividad enzimática microsomal, síntesis de proteínas y aumentar la ósmosis de lisomas
- d) Destrucción de la bomba de Ca^{++} microsomal.

Existen diferentes métodos para inducir cirrosis hepática en los animales de laboratorio (administración de sustancias irritantes como carragenina, cambios nutricionales, por suturas, ligamento del conducto biliar, etc.). La cirrosis producida por la admi-

nistración de CCl_4 es la que presenta mayor similitud con respecto a los cambios producidos por cirrosis alcohólica en el humano. La concentración de colágena a las 5, 10, 15 y 20 inyecciones de CCl_4 en este grupo fue de 31%, 193%, 198% y 387% mayor que para el grupo normal.

Los resultados obtenidos en el grupo tratado simultáneamente con CCl_4 y CBZ demostraron un incremento gradual de la concentración de colágena, el cuál fue de 4%, 54%, 74% y 144% mayor que el valor normal a las 5, 10, 15 y 20 inyecciones de CCl_4 y CBZ simultáneamente en el alimento.

Es importante hacer notar que el incremento en la concentración de colágena y el porcentaje de ésta con respecto a las proteínas totales en el grupo tratado simultáneamente fue menor que el obtenido para el grupo tratado únicamente con CCl_4 . Igualmente el aumento de la concentración de ADN fue menor, este marcador de la celularidad tisular, indica que el número de células es menor, lo que puede deberse a una disminución en la población de fibroblastos y de células inflamatorias, que podría traer como consecuencia una menor concentración de colágena hepática.

Histológicamente, son claras las diferencias entre ambos grupos. Se puede observar en el grupo cirrótico (CCl_4) la presencia de bandas de colágena desde las 5 inyecciones, posteriormente la formación de nódulos y en la última etapa del tratamiento, se obtuvo necrosis celular, así como el predominio de nódulos, infiltrado celular y abundancia de colágena. Mientras que en el grupo tratado simultáneamente se observó inicialmente, una esteatosis -

sin presencia de fibras de colágena, posteriormente estas fibras aparecen formando bandas finas, además de encontrarse infiltrado celular. Al compararse estas fibras entre ambos grupos a los diferentes tiempos analizados, se observó, que la cantidad y grosor de las bandas de colágena son menores en el grupo tratado simultáneamente que en el grupo tratado únicamente con CCl_4 .

Estos resultados sugieren que el mebendazol administrado de manera conjunta con CCl_4 interfirió con el depósito y secreción de colágena al espacio extracelular, ya que se sabe que la colágena es una protefna que requiere del sistema microtubular para su secreción. Es posible que la inhibición de la secreción de colágena produzca una acumulación de la protefna en el interior de la célula y mediante un mecanismo de retroalimentación se suprima o disminuya la síntesis de colágena. Por otra parte, ha sido reportado por varios grupos de investigación el mecanismo de acción del mebendazol como agente con acción antimicotubular:

Van Den Bossche ⁽⁷¹⁾ demostró que el compuesto se une a las subunidades de tubulina en un sitio cercano o estructuralmente igual al de la colchicina e inhibe la formación de microtúbulos. Los estudios "in vitro" realizados por Laclette y col. ⁽⁷⁾, con mebendazol y colchicina sobre la polimerización de tubulina demostraron que existe una afinidad mayor entre el mebendazol y la tubulina que entre colchicina y tubulina. También se demostró que el mebendazol actúa sobre los microtúbulos preformados y el número de sitios de unión por dímero de tubulina estimado por diali -

sis en equilibrio fue de un sitio de unión de mebendazol por dímero de tubulina, con una constante de afinidad de $28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Los experimentos realizados en 1984 por Barrowman y col. (80) sobre la inhibición de la polimerización de la tubulina de Ascaris suum ("in vitro") con benzimidazoles y colchicina, sugieren que la inhibición de la polimerización observada por el albendazol 2-amino sulfona y tiabendazol es menor, debido a la pérdida del grupo -carbamato de la posición 2 del anillo imidazol, el cual puede ser estéricamente análogo al grupo $-\text{NHCOCH}_3$ de la colchicina. Cuando se incubó la colchicina marcada con C^{14} y posteriormente se adicionó mebendazol se recobró el 95 % de la radiactividad de la colchicina, por lo que se demostró que el mebendazol tiene el mismo sitio de acción que la colchicina, además de una afinidad mayor, se sugiere que la unión mebendazol/colchicina para la tubulina es un sitio cercano a los grupos sulfhidrilos, ya que se ha reportado que este grupo es importante para la estructura y funcionalidad de la molécula, siendo necesaria para la polimerización.

El compuesto ya ha sido utilizado en un grupo de pacientes en el tratamiento de la cirrosis hepática, los resultados obtenidos han sido favorables (75), por lo que se está continuando este estudio en pacientes con períodos más largos de tratamiento.

8.- CONCLUSIONES.

- 1.- Las siguientes propiedades fisico-químicas y farmacológicas - del fármaco, que posiblemente intervienen en los resultados - obtenidos en este trabajo son:
- a) La mínima solubilidad del compuesto en agua (0.05 - 0.1%).
 - b) La baja absorción intestinal (0.5 - 1.0 %).
 - c) Al ser absorbido es conducido al hígado, por lo tanto, el primer sitio de acción del compuesto será en este órgano.
 - d) La concentración máxima en suero se alcanza durante las - primeras 2 a 4 horas.
 - e) El compuesto absorbido es eliminado en la orina durante - las 17 horas posteriores a su ingesta.
 - f) La mayor parte del compuesto que no es absorbido, es eli-
minado en las heces sin cambio.
 - g) No se ha descrito hasta el momento que el compuesto se -
acumule en ningún tejido.
 - h) Es posible que a las dosis en las que se ha administrado-
el compuesto, éste no ha alcanzado en distintas partes -
del organismo niveles que pudieran producir cambios apa -
rentes.
 - i) Los benzimidazoles a muy bajas concentraciones inhiben la
polimerización de tubulina de nemátodos y en general, és-
ta es más susceptible a la inhibición que la tubulina de -
mamíferos (81). En base a esto, podría ser que dentro de -
un mismo organismo existieran distintos tipos de tubulina

con afinidades diferentes al mebendazol y que por éste -
hecho no se presentaran efectos en otros órganos.

2.- Mediante los resultados mostrados en este trabajo, podemos -
proponer que el mebendazol tiene un efecto protector sobre el
desarrollo de la cirrosis producida por tetracloruro de carbo
no.

3.- Las características farmacológicas que presenta el mebendazol,
como baja absorción intestinal, mínimas reacciones adversas y
y un posible efecto protector sobre el desarrollo de la cirro
sis hepática, permiten considerar al fármaco como un compues
to utilizable en el tratamiento de algunas enfermedades en -
las cuales esté implicada la colágena, al mismo tiempo, ayu
dar a implementar pruebas de diagnóstico para detectar esta -
dios tempranos de la fibrosis ó aquellas patologías fibrosan
tes para las cuales no existe hasta la fecha un tratamiento -
adecuado.

9.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Spiegelman, M. y Erhardt, C.L.: Mortality in the United States by cause. Editado por C'L' Erhardt y J.E. Berlin: Mortality and morbidity in the United States. Cambridge, M.A. Harvard University Press, 21-38. 1974.
- 2.- Pequiot, G.: About the geographical aspects of cirrhosis, in alcohol und leber, Symposium International, oct. 1970 in Friebourg, 1. F.K. Schattaver, édit., Stuttgart-New York, 1971.
- 3.- Robbins, S.L.: Hígado y vías biliares en: Patología estructural y funcional. Editorial Interamericana S.A.: 951 - 1019, - 1975.
- 4.- Caroli, J., Ribet, A. y Paraf, A. : Tratado de enfermedades del aparato digestivo. vol. I. Enfermedades del hígado, páncreas y vías biliares. Ed. Toray-masson. 1979.
- 5.- Chvapil, M.: Experimental modification of collagen synthesis and degradation and their therapeutic application. Collagen in health and disease.:206 - 217. 1982.
- 6.- Kershenovich, D., Uribe, M., Suarez, I. et al: Treatment of cirrhosis with colchicine. Gastroenterology, 77: 532-536. - 1979.
- 7.- Laclette, J.P., Guerra, G. y Zetina, C.: Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. Biochemical and Biophysical Research Communications. 92, 2: 417 - 423. 1980.
- 8.- Morales, B. y Díaz de León, L.: La administración crónica de mebendazole y sus efectos en diferentes órganos corporales de la rata. Tesis para obtener el título de Biólogo. Fac. Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 1984.
- 9.- Santamaría, P. y Díaz de León, L.: Efecto del mebendazole sobre la síntesis de colágena en la cirrosis hepática experimental. Tesis para obtener el título de Biólogo. Fac. de Ciencias Esc. de Biología, Universidad Veracruzana. 1984.
- 10.- Lieber, C.S. French, S.M.D. Charles, H. y Halsted, M.D.: Ethanol, the liver and the gastrointestinal tract. Annals of Internal Medicine. 95, 2: 198 - 221. 1981.

- 11.- Medelzon, J.H.: Biologic concomitants of alcoholism. New Eng. J. Med. 283: 24, 71, 1970.
- 12.- Blair, A. H. y Valee, B.L.: Some catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase. Biochemistry. 5: 2026 -34.1966.
- 13.- Popper, H. y Lebeber, C.S.: Histogenesis of alcoholic fibro - sis and cirrhosis in the baboon. Am. J. Pathol. 695-716.1980.
- 14.- Israel, Y. Orregon, H. y Khanna, J. M.: Alcohol induced sus - ceptibility to hypoxic liver damage: Possible role in the pa - thogenesis of alcoholic liver disease? In: Fisher, M.M. Ran - kin, J. G. eds. Alcohol and the liver. New York, Plenum Press. 323 - 346. 1977.
- 15.- Lieber, C. S.: Alcohol and the liver. In: Arias, I. M. Fren - kel, M. and Wilson, J. H. eds. The liver Annual 4, 130-186. - 1980.
- 16.- Miwwa, G.T. Levin, W. Thomas, P. E. y Lu, A. Y. H.: The direct oxidation of ethanol by a catalase and -alcohol dehydrogenase - free reconstituted system containing cytochrome P-450. Arch.- Biochem. Biophy. 187: 464 - 475. 1978.
- 17.- Lieber, C.S.: Alcohol and liver: 1984 Update. Hepatology. 4 - 6: 1243 - 1260. 1984.
- 18.- Thompson, J.A. y Reitz, R.C.: Studies on the acute and chronic effects of ethanol ingestion on choline oxidation. Ann N.Y. - Acad. Sci. 273: 194 - 204. 1976.
- 19.- Patek, A.J. Jr. Bwory, S. y Hayesm, K.C.: Cirrhosis of choli - ne deficiency in the rhesus monkey. Possible role of dietary - cholesterol. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 148: 370 - 4. 1975.
- 20.- Leo, M.A. Sato, M. y Lieber, C.S.: Effect of hepatic vitamin - A. Depletion on the liver in men and rats. Gastroenterology. - 84: 562 - 572. 1983.
- 21.- Hasumura, Y. Teske, R. y Lieber, C.S.:Characteristic of ace - taldehyde oxidation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. - 251: 4908 - 13. 1976.
- 22.- Rubin, E. Beatti, D.S. y Lieber, C.S.: Effects of ethanol on - the biogenesis of mitochondrial functions. Lab. Invest. 23: - 620 - 7. 1970.

- 23.- Díaz de León, L. Ehrenpreis, M.N. Kershenobich. D. y Rojkind, M.: Liver injury and liver fibrogenesis. En: Developments in nutrition and metabolism. (Avogaro, P., Sirtori, C.R. y Tremoli, E., Eds), Biomedical Press, N.Y. pp 269-280. 1979.
- 24.- Baraona, E. y Lieber, C.S.: Effects of alcohol on hepatic transport of proteins. Ann. Rev. Med. 33: 281-292. 1982.
- 25.- Jahn, W.: Visualization of a filamentous network in cryosections of liver tissue. Eur. J. Cell. Biol. 20: 301-304. 1980.
- 26.- Rojkind, M. y Martínez-Palomo, A.: Increase in type I and III colagens in human alcoholic liver cirrhosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 539 - 543. 1976.
- 27.- Holt, K. Bennett, M. y Chojkier, M.: Acetaldehyde stimulates collagen and non collagen protein production by human fibroblats. Hepatology. 4; 5: 843 - 848. 1984.
- 28.- Popper, H.: Pathologic aspects of cirrhosis. Am. J. Pathol. - 87: 228 - 264. 1977.
- 29.- Pérez-Tamayo, R. y Montfort, I.: The susceptibility of hepatic collagen to homogenous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. Am. J. Pathol. 100; 2: 427 - 442. 1980.
- 30.- Woodhead-Galloway, J.: Collagen the anatomy of a protein. London. The Camelot Press Ltd. Southampton, 2-7. 1980.
- 31.- Trelstad, R.L.: La colágena. Mundo Científico. La Recherche. - 1: 284 - 295. 1981.
- 32.- Prockop, D.J. y Guzmán, N.A.: Collagen diseases and biosynthesis of collagen. Hospital Practice. 61 - 68. 1977.
- 33.- Minor, R.R.: Collagen metabolism. Am. J. Pathol. 98; 1: 228 - 277. 1980.
- 34.- Prockop, D.J. Kivirikko, K.I. Tuderman, L. y Guzmán, N.A.: - The biosynthesis of collagen and this disorders. N. Engl. J. Med. 301: 13 - 23, 77 - 85. 1979.
- 35.- Martin, G.R. Timpl, R. Müller, P.K. y Kühn, Klaus.: The genetically distinct collagens. T I B S. 285 - 287. 1985.
- 36.- Tuppenniemi, T.M., Pustola, U. y Anttinen, H.: Afinity chromatography of lysyl hydroxylase on concanavalin A-agarose. -

- Biochim. Biophys. Acta 483: 215 - 219. 1977.
- 37.- Risteli, J., Trygvason, K. y Kivirikko, K.I.: Prolyl 3-hydroxylase: partial characterization of the enzyme from rat Kidney cortex. Eur. J. Biochem. 73: 485 - 492. 1977.
- 38.- Gryder, R.M. Lamon, M. y Adams, E.: Sequence position of 3-hydroxyproline in basement membrane collagen: isolation of glycyL-3-hydroxyprolyl-4-hydroxyproline from swine kidney. J. Biol. Chem. 250: 2470 - 2474. 1975.
- 39.- Riesteli, L. Myllylä, R. y Kivirikko, K.I.: Affinity chromatography of collagen glycosyltransferases on collagen linked to agarose. Eur. J. Biochem. 67: 197 - 202. 1976.
- 40.- Kruse, N.J. y Bornstein, P.: The metabolic requirements for transcellular movement and secretion of collagen. J. Biol. Chem. 250: 4841 - 4847. 1975.
- 41.- Leung, M.K.K. Fressler, L.I. Greenberg, D.B. y col.: Separate amino and carboxyl procollagen peptidases in chick embryo tendon. J. Biol. Chem. 254: 224 - 232. 1979.
- 42.- Siegel, R.C. y Fu, J.C.: Collagen cross-linking.: purification and substrate specificity of lysyl oxidase. J. Biol. Chem. 251: 5579 - 5785. 1976.
- 43.- Martin, G.R. Buyers, P.H. y Piez, K.A.: Procollagen. Advances in Enzymology, 42: 167 - 191. 1975.
- 44.- Murray, M. y Farrell, G.C.: Different effects of carbon tetrachloride toxicity and cirrhosis on substrate binding to rat hepatic microsomal cytochrome P-450. Biochem. Pharmacol. 33: 4: 687 - 689. 1984.
- 45.- Younes, M. y Siegers, C-P.: Interrelation between lipid peroxidation and hepatotoxic events. Biochem. Pharmacol. 33; 13: 2001 - 2003. 1984.
- 46.- Meister, A.: Roles and function of glutathione. Biochemical Society Transactions. 10: 78 - 85. 1982.
- 47.- Younes, M. Albercht, M. y Siegers, C-P.: In: Oxygen radicals in chemistry and Biology (Eds. W. Bors, M. Saran and D. Tait), de Gruyeter, Berlin, in press.

- 48.- Anundi, I. Höqberg, J. y Stead, A.H. Acta Pharmac. Tox. 45.-
45. 1979.
- 49.- Höqberg, J. Bergstand, A. y Jakobsson, S.V. Eur. J. Bio. -
Chem. 37: 51. 1973.
- 50.- Benedetti, A. Fulceri, R. Ferrali, M. Ciccoli, L. y col. - -
Biophys. Acta. 712: 628. 1982.
- 51.- Farber, J.L. Life Sci. 29. 1289. 1981.
- 52.- Barnes, M.J.:Function of ascorbic acid in collagen metabolism
Annals of the New York Academy of Sciences: 258: 264-77.1975.
- 53.- Margarelli, P.C. Jr y Hunte, B.: Black death: an ascorbic -
acid deficiency disease in penaeid shrimp. Comparative Bio -
chemistry and Physiology 63A: 103 - 108. 1979.
- 54.- Guttadauria, M. Diamond, H. y Kaplan, D.: Colchicine in the
treatment of scleroderma. Journal of Rheumatology 4: 272 -6.
1977.
- 55.- Rojkind, M. y Kershenovich, D.: Effect of colchicine on colla
gen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver
slices. Biochemica et Biophysica Acta. 378: 415-23. 1975.
- 56.- Harris, E.D. Jr. y Hoffman, G.S.: Colchicine: effects upon -
urinary hydroxyproline excretion in patients with scleroderma.
Metabolism. 24: 529 - 535. 1975.
- 57.- Harris, E.D. Jr. y Krane, S.M.: Effects of colchicine on colla
gen in cultures of rheumatoid synovium. Arthritis and Rheumatism.
14: 669 - 84. 1971.
- 58.- Nicolson, G. Smith, J.R. y Poste, G.:Effects of local anesthe
tic on cell morphology and membrane associated cytoskeletal -
organization in Balb/3T3 cell. J. Cell. Biol. 68: 395. 1976.
- 59.- Peacock, E.E. Jr y Madden, J.W.: Some studies on the effect -
of β -amino-propionitrile on collagen in healin wounds. -
Surgery. 60: 7 - 12. 1966.
- 60.- Nimmi, M.E.: Mechanism of inhibition of collagen cross-lin
king by penicillamine. Proceeding of the Royal Society of -
Medicine. 70: 65 - 72. 1970.

- 61.- Deporter, D.A.: The role of the macrophage in collagen resorption during chronic onflamamation. A New Look at an Old Hypothesis. Agents and Actions. 9: 168 - 71. 1979.
- 62.- Ehrlich, P.H. Ross, R. y Bornstein, P.: Effects of antimicrotubulatory agents on the secretion of collagen. J. Cell. Bioll. 62: 390 - 405. 1974.
- 63.- Ledbetter, M.C. y Porter, K.R.: A microtubule in plant cell - fine structure. J. Cell. Bioll. 19: 239 - 250. 1963.
- 64.- Brabander, M.J.: El citoesqueleto y la vida celular. Mundo científico. 3; 28: 922 - 933. 1980.
- 65.- Margulis, R.L. y Kieffer, B.I.: Mitotic mechanism based intrinsic microtubule behaviour. Nature. 272: 450 - 452. 1978.
- 66.- Olmsted, J.B. y Boris, G.: Microtubules. Ann. Rev. Biochem. - 42: 507 - 540. 1973.
- 67.- Brugmanas, J.P. Thienpont, D.C. y Van Wijngarden, I.: Mebendazole in enterobiasis. Radiochemical and pilot clinical study in 1278 subjects. J. Am. Med. Ass. 217: 313 - 316. 1971.
- 68.- Van Den Bossche, H.: The molecular basics of anthelmintic action. In: Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relations. New York: Elsevier-North Holland Publishings Com. - 533 - 572. 1976.
- 69.- Fierlafijn, E.: Mebendazole in enterobiasis. J. Am. Med. Ass. 218: 1051. 1971.
- 70.- Van Den Bossche, H.: Biochemical effects of the anthelmintic drug mebendazole. In, Comparative Biochemistry of Parasitism (Van Den Bossche, H. ed.). Academic Press, Inc. New York, 139 - 157. 1972.
- 71.- Van Den Bossche, H.: Mebendazole and related anthelmintics. - Advances in Pharmacology and Chemotherapy. 19: 67-127. 1982.
- 72.- Dawson, M. y Watson, T.R.: The effects of dose form on the bioavailability of mebendazole in man. Br. J. Clin. Pharmac. 19: 87 - 90. 1985.
- 73.- Friedman, P.A. y Platzer, E.G.: Interaction of anthelmintic benzimidazoles with Ascaris suum embryonic tubulin. Biochem.-Biophys. Acta. 630: 271 - 278. 1980.

- 74.- Rivas-Alcalá, A.R. Greene, B.M. y Taylor, H.R.: 12 Month follow-up of mebendazole therapy for onchocerciasis. *Lance*. Nov. 7. 1043. 1981.
- 75.- Ocampo, J.O. López, H.H. y Díaz de León, L.H.: Efecto del carbamato de benzimidazole sobre el metabolismo de colágena en la cirrosis hepática. Tesis de Especialidad en Medicina Interna. Centro Hospitalario "20 de Noviembre". I.S.S.T.E. México. 1984.
- 76.- Woessner, J.F.: The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportion of this iminoacid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 440 -447. 1961.
- 77.- Troll, M. y Lindsley, J.: A photometric method for the determination of proline. *J. Biol. Chem.* 215: 655 - 660. 1955.
- 78.- Burton, K.: Determination of DNA concentration with diphenylamine; en: *Methods in Enzymology* section VII. (Colowick S.P. y Kaplan N.O, Eds). Academic Press. Inc. New York. 163- 168.- 1968.
- 79.- Birkett, C.R. Coulson, C. y Pogson, C.: Inhibition of secretion of proteins and triacyl-glycerol from isolate rat hepatocyte mediated by benzimidazole carbamate antimicrotubular agents. *Chem. Pharmacol.* 30: 1629 - 1633. 1981.
- 80.- Barrowman, M.M. Marriner, S.E. y Bogan, J.A.: The binding and subsequent inhibition of polymerization in Ascaris suum (in vitro) by benzimidazole anthelmintics. *Biochem. Pharmac.* 33. 19: 3037 - 3040. 1984.
- 81.- Dawson, P.J. Gutteridge, W.E. y Gull, K.: A comparison of the interaction of anthelmintic benzimidazoles with tubulin isolated mammalian tissue and the parasit nematode Ascardia galli. *Biochem. Pharmac.* 33, 7: 1069 - 1074. 1984.