

241 41



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

EFEECTO DE CARBAMATO DE BENZIMIDAZOL
(CBZ) SOBRE LA LIBERACION DE COLAGE-
NASAY COOPERATIVIDAD INMUNOLOGICA
DE CELULAS MONONUCLEARES Y
FIBROBLASTOS.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LINA PATRICIA ROSAS MEDINA

México, D. F.

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	
1 Cirrosis Hepática	1
1.1 Incidencia	2
1.2 Patología	4
1.3 Posibles Evoluciones	6
1.4 Tratamiento	8
2 Generalidades de Tejido Conjuntivo	10
2.1 Elastina	10
2.2 Proteinglicanos	11
2.3 Fibronectina	11
2.4 Colágena	12
2.4.1 Biosíntesis	18
2.4.2 Colagenasas	19
2.4.3 Metabolismo	20
2.4.4 Papel de la colágena en la cirrosis	21
3 Aspectos Inmunológicos	23
3.1 Los Macrófagos	23
3.1.1 Fagocitosis	23
3.1.2 Quimiotaxis	26
3.2 Papel de los macrófagos en la fagocitosis y la producción de enzimas	27
3.3 Posible papel inmunológico en la cirrosis hepática	28
4 Propiedades de algunos imidazoles	30
4.1 Levamisol	31
4.2 Carbamato de Benzimidazole (CBZ) o Mebenda zol	32
FUNDAMENTO DEL TEMA	36
ANTECEDENTES	38
HIPOTESIS DE TRABAJO	41

	Pág.
OBJETIVOS DE TRABAJO	42
MATERIAL Y REACTIVOS	43
METODOS	45
I. Parámetros Desarrollados	45
1. Obtención de los macrófagos peritoneales de rata de la cepa Sprague-Dawley	45
2. Obtención de macrófagos de sangre periférica de rata	45
2.1 Preparación de Ficoll-Hypaque	45
2.2 Utilización de la solución de Ficoll-Hypaque en la obtención de macrófagos de sangre periférica de rata	46
3. Establecimiento y propagación de cultivos celulares	47
3.1 Obtención de cultivos de fibroblastos	47
3.2 Mantenimiento y propagación del cultivo de macrófagos de la línea celular J774.1	47
4. Purificación de colágena de piel de rata	48
5. Obtención de colágena radiactiva por acetilación con anhídrido acético tritiado	50
6. Determinación de la actividad colagenolítica, en sobrenadantes de cultivos celulares	50
7. Ensayo de quimiotaxis en placas de agarosa	51
8. Determinación de fagocitosis, en células mononucleares con eritrocitos de carnero y partículas de látex	51
9. Electroforesis en geles de poliacrilamida y determinación de material radiactivo por autorradigrafía	51
9.1 Preparación de geles para electroforesis	51
9.2 Método para preparar las muestras de electroforesis	53

	Pág.
9.3 Preparación de Buffer Stock para electroforesis	54
9.4 Preparación de los geles para autorradiografía	54
II. Efecto del mebendazol sobre células mononucleares	56
III. Efecto del mebendazol sobre la actividad de colagenasa en sobrenadantes de cultivos celulares :	57
1. Sobrenadante de células mononucleares estimuladas con mebendazol	57
2. Sobrenadante de fibroblastos estimulados con mebendazol	58
3. Cooperatividad entre ambas entidades celulares	58
IV. Cuantificación de la actividad de colagenasa	60
V. Medición de la migración "espontánea" de células mononucleares en presencia de CBZ	62
VI. Cuantificación de la capacidad fagocítica de los macrófagos	64
RESULTADOS	66
DISCUSION	91
CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFIA	102

INTRODUCCION

1. CIRROSIS HEPATICA

La Cirrosis Hepática continúa siendo un problema de salud pública en México, y se ubica dentro de las diez primeras causas de muerte entre la población en general y ocupa el segundo lugar en el grupo comprendido entre los 35 y los 55 años de edad.

La causa más frecuente de que se produzca la cirrosis hepática es la ingesta crónica de alcohol; sin embargo, no es la única etiología pudiéndose desarrollar por otras causas tales como la Hemosiderosis y las reacciones secundarias a fármacos (1).

El término "Cirrosis" se aplica a todos los padecimientos esclerosantes del hígado, progresivos o no, en los que la destrucción de las células hepáticas se asocia con un aumento real o aparente del estroma de tejido conjuntivo, aunado a una regeneración y retracción de los vasos (2).

Los mecanismos que inducen la aparición de cirrosis son múltiples: el alcohol o la hepatitis viral pueden ser cirróticos por una lesión hepatocelular primaria; sea ésta crónica, aguda o persistente debido a una obstrucción a nivel biliar, portal o incluso suprahepático. Debido a esto, podemos decir que es necesaria la unión de tres procesos para producir una cirrosis:

- 1) Una alteración hepatocelular constante a partir de un evento o lesión primaria.

- 2) Una reacción mesenquimatosa
- 3) Una regeneración parenquimatosa.

El primer proceso es imprescindible para el desarrollo de una cirrosis, aunque aparezca en algún momento no conocido de la evolución de la enfermedad (3,4).

El hígado normal solo tiene unas cuantas fibras reticulares formando el espacio de Disse, por lo que toda lesión del hepatocito incrementa el tejido conjuntivo en el espacio porta y alrededor del lobulillo, observándose además un aumento de células "inflamatorias" (linfocitos, plasmocitos, fibroblastos, células de Kupffer y polimorfonucleares). Esta fibrogénesis y la multiplicación celular constituyen la llamada reacción mesenquimatosa.

Por otra parte, la destrucción del parénquima celular produce colapsos parenquimatosos lo cuál conduce a mayor fibrosis, pudiendo afectar a una sola lámina parenquimatosa o a amplias zonas del hígado.

A nivel del espacio porta, la alteración inicial consiste en una proliferación fibroblástica y linfoidea con una neoformación de fibras colágenas las cuales a medida que la cirrosis progresa rodean a las células hepáticas constituyendo un nódulo (5).

1.1 INCIDENCIA

Entre las complicaciones del alcoholismo, la cirrosis ocu

pa un lugar especial en vista de la severidad de la enfermedad y el número de pacientes implicados (6). Estudios estadísticos indican que en áreas urbanas de Estados Unidos, la cirrosis hepática es la cuarta causa de muerte en individuos jóvenes y adultos; además, la relación entre cirrosis y alcoholismo es directa observándose cambios paralelos en los índices de muerte y consumo de alcohol (7,8,9;92).

Así, el consumo de alcohol en un rango de 160g por día de 6 a 10 años presenta una incidencia de cirrosis del 8%, la cuál aumenta a 21% después de 11 a 15 años de ingesta. Por otra parte, si el consumo es mayor de 180g por día durante más de 15 años la incidencia alcanzada es del 51% (8). Es claro que la incidencia del daño en el hígado aumenta con la cantidad y duración del consumo de alcohol; sin embargo, ésta no es la única causa que produce cirrosis (7,8), uno de los factores principales y aún no bien conocido es la susceptibilidad del individuo tal vez determinada genéticamente. Existen otros factores como una nutrición deficiente, el posible papel de componentes no alcohólicos de las bebidas consumidas y las hepatotoxinas presentes en estos individuos son quizás importantes, pero su papel real aún no se encuentra bien establecido (6).

Dentro de la epidemiología de la cirrosis (10), se ha encontrado que la incidencia varía no solo de país a país, sino entre grupos étnicos de la misma zona geográfica, encontrándose también que existe una mayor susceptibilidad en el sexo femeni-

no en cuanto al desarrollo de la cirrosis bajo las mismas condiciones de ingesta alcohólica (11).

1.2 PATOLOGIA

La Cirrosis Alcohólica también llamada Cirrosis de Laennec, está caracterizada clínicamente y biológicamente por un cuadro de insuficiencia hepatocelular; histológicamente por signos de necrosis, inflamación y fibrosis, así como de una esteatosis, casi siempre previas a que el estado cirrótico esté todavía constituido (12, 13).

La insuficiencia hepatocelular y todos los síntomas o manifestaciones que la acompañan son debidos a una destrucción o inhibición funcional de una cantidad importante de tejido hepático. Se calcula que del 33 al 66% de los cirróticos mueren esencialmente de insuficiencia hepatocelular.

Este cuadro puede presentarse de dos formas evolutivas diferentes: aguda y crónica.

Evolución Aguda. En ésta existen varios factores desencadenantes de origen "exógeno" que descompensan el equilibrio normal como pueden ser:

- Accidentes causantes de una isquemia hepática, como hemorragias digestivas, epistaxis, "shock" y colapso de cualquier origen.

Infecciones, principalmente intestinales con síndrome enteroperitoneal.

- Desequilibrios volémicos e hidroelectrolíticos bruscos.
- Hepatitis virales sdbitas.

Evolución Crónica. Sus causas son menos evidentes e incluyen:

- Persistencia de la causa de la lesión celular por intoxicación alcohólica.
- Estructura del nódulo cirrótico con vascularización imperfecta e insuficiente.
- Existencia de un proceso "autoperpetuado", propio de la cirrosis (5).

Necrosis. El hígado con su enorme número de enzimas y funciones metabólicas, es vulnerable a toda clase de ataques tóxicos o microbiológicos. Las causas más importantes de necrosis hepática aguda son la hepatitis por virus y las acciones tóxicas de productos químicos y drogas (1). Cuando el hígado graso está acompañado por cirrosis la incidencia de la necrosis es mayor, por lo que la destrucción estructural del hígado es más pronunciada (14, 15).

El aspecto más típico de la necrosis celular debida al alcohol es el cuerpo hialino de Mallory, constituido por acúmulos eosinófilos intracitoplasmáticos, perinucleares, de forma irregular, de tamaño variable, únicos o múltiples los cuales al parecer se hallan constituidos de mucoprotefnas semejantes a la queratina.

Inflamación. La reacción inflamatoria es una infiltración leucocitaria de los espacios portas del lóbulo, algunas veces con acúmulos delimitando el emplazamiento de pequeños lugares necróticos intralobulares. La particularidad de este infiltrado inflamatorio es que existe una importante proporción de polinucleares

neutrófilos en sus inicios.

La intensidad de esta infiltración, adquiere algunas veces aspectos verdaderamente leucemoides. En un estadio más tardío de la evolución, las células predominantes son linfocitos, plasmocitos y macrófagos.

Fibrosis. El tejido fibroso proviene de la proliferación fibroblástica activa y no es una simple condensación del estroma en colapso; se caracteriza por una esteatosis que puede ser severa y en muchos casos es visible en los hepatocitos la sustancia hialina alcohólica.

A medida que evoluciona la enfermedad, el hígado se hace cada vez más pequeño, hasta constituir un órgano fibrótico que muchas veces pesa menos de 1200g. Cuando se acumula el tejido fibroso, desaparece la grasa; por lo tanto, el hígado adopta color cada vez más pardo, desapareciendo la sustancia hialina alcohólica característica de la necrosis celular (1,5).

1.3 POSIBLES EVOLUCIONES

La mayoría de signos y síntomas en la cirrosis dependen de tres factores:

- 1) Disminución de la capacidad funcional del hígado
- 2) Alteraciones en el tamaño del hígado
- 3) Aumento de la presión en el sistema porta.

1) Un factor común en la cirrosis es la anemia que puede origi-

narse a partir de una producción disminuida de eritrocitos o un incremento en la destrucción de los mismos, probablemente relacionada a hiperesplenismo. El sangrado gastrointestinal debido a la ruptura de várices puede conducir a una anemia crónica por deficiencia de hierro (2).

La anemia megaloblástica puede producirse por una dieta inadecuada de ácido fólico y menos frecuente de vitamina B₁₂, o debido a una alteración en su absorción (16). Muchos pacientes con cirrosis tienen una tendencia para retener sodio y agua, atribuible solo en parte al hiperaldosterismo secundario (17).

La leucocitosis con polimorfonucleares, hipoalbuminemia, hipocoagulación, la ictericia con colestasis (aumento del colesterol y las fosfatasa alcalinas), son muy frecuentes; bilirrubina, transaminasas y fibrinógeno elevados son otras anomalías biológicas (5).

2) El hígado en el alcohólico crónico puede adquirir grandes proporciones por la acumulación progresiva de grasa, el órgano aumenta de volumen y se torna cada vez más amarillo hasta que, en casos extremos llega a pesar de 5 a 6 Kg. Frecuentemente se acompaña de cicatrización y a medida que la lesión evoluciona el hígado disminuye de volumen gradual pero progresivamente y se vuelve finamente nodular hasta adoptar el aspecto clásico llamado claveteado; presenta color amarillo anaranjado con cicatrización difusa y se constituye un órgano fibrótico que pesa menos de 1200g. (1).

3) La fisiopatología de la hipertensión portal, la retención de fluido y la ascitis están interrelacionadas (18).

La hipertensión portal es una consecuencia casi constante del cambio arquitectónico del hígado cirrótico.

Cuando se desarrolla hipertensión portal, se acompaña de una serie de cambios, entre los cuales hay tres que predominan:

- a) Ascitis
- b) Formación de vías venosas colaterales
- c) Esplenomegalia

En una serie de pacientes con cirrosis, el 46% presentaron ascitis, 23% hemorragia gastrointestinal a consecuencia de vías venosas colaterales anómalas, 18% signos y síntomas de insuficiencia hepática, y el 9% ictericia (19).

1.4 TRATAMIENTO

El tratamiento de cirrosis alcohólica requiere de esfuerzos para detener la progresión del daño al hígado y para manejar sus complicaciones como sangrado, encefalopatía hepática, ascitis, anemia, síndrome hepatorenal y malignidad hepática primaria.

La abstención racional del consumo de alcohol y la ingesta de una dieta nutritiva han sido discutidas en relación al daño del hígado en ingestas agudas de alcohol donde estos parámetros fueron evaluados en su capacidad para detener e invertir el

daño hepático (18).

El uso de drogas específicas, como esteroides anabólicos, fueron eficaces en algunos casos (20,21). La administración de prednisona incrementó el intervalo de muerte en pacientes con cirrosis alcohólica si presentaban ascitis (22).

El tratamiento de las formas graves es aleatorio, y tiene bases empíricas, con la asociación de antibióticos antibacterianos, antituberculosos, corticoides, anabólicos a dosis elevadas, con un aporte de vitaminas B₁, B₆, B₁₂ y ácido fólico con un efecto favorable en un cierto número de casos (23).

Estudios de cirrosis hepática experimental inducida en ratas con tetracloruro de carbono para evaluar al mebendazol como un fármaco alternativo en el tratamiento de esta enfermedad demostraron una inhibición de la secreción y depósito de fibras de colágena en el hígado, comprobándose a su vez, que el mebendazol no produce alteraciones bioquímicas o morfológicas en diferentes tejidos y órganos (24).

2. GENERALIDADES DE TEJIDO CONJUNTIVO

El tejido conjuntivo proporciona la matriz de soporte de casi todos los órganos del cuerpo. Está constituido por una población característica de células, rodeadas por fibras y material amorfo o sustancia basal. Las fibras están formadas por colágena y elastina y la sustancia basal consiste primordialmente de proteinglicanos.

Las células del tejido conjuntivo puede dividirse en 2 grandes poblaciones: las células residentes derivadas del mesénquima y las células inmigrantes que aparecen de manera transitoria en el tejido conjuntivo (25).

2.1 ELASTINA

La elastina es el componente principal de las fibras elásticas y se encuentra en todos los órganos del cuerpo, siendo particularmente abundante en los tejidos elásticos. La elastina es sintetizada como un precursor soluble de 70 000 a 75 000 daltones (Tropoelastina), formada de una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 800 residuos.

La tropoelastina es sintetizada por la traducción de ARN mensajero correspondiente en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso y se estructura en el espacio extracelular en forma de fibras a través de su interacción con glicoproteínas micro

fibrilares y otros componentes de la matriz extracelular (26, 27).

2.2 PROTEINGLICANOS

Los proteinglicanos son polisacáridos unidos covalentemente por una proteína central y presentan características de polianiones por lo que se tiñen con colorantes basófilos convencionales. El análisis estructural de los proteinglicanos ha sido difícil debido a la heterogeneidad de estas moléculas.

Los proteinglicanos son generalmente sintetizados y secretados por células derivadas del mesénquima y tienen una tasa de recambio más elevada que otras proteínas matriciales, tanto durante el crecimiento como en la etapa adulta.

Se ha descrito que los proteinglicanos interactúan electrostáticamente con una gran variedad de moléculas catiónicas y a través de tal interacción participan en el transporte de electrolitos y agua (25).

2.3 FIBRONECTINA

La fibronectina es una proteína presente en la matriz intersticial, en la membrana basal, en el plasma y en otros fluidos del cuerpo. La molécula de fibronectina es un heterodímero con subunidades de un peso molecular de 210,000 y 240,000 daltones unidas cerca del extremo carboxilo terminal por enla-

ces disulfuro.

La fibronectina promueve la adhesión de muchos tipos de células a diferentes sustratos "in vitro"; v.gr.: gelatina, por lo que se considera que "in vivo" promueve la adhesión de células a colágena. La fibronectina interviene también en la adhesión de algunas células a fibrina ya que puede unirse covalentemente al coágulo con la participación de la transaminasa glutámica plasmática (28).

2.4 COLAGENA

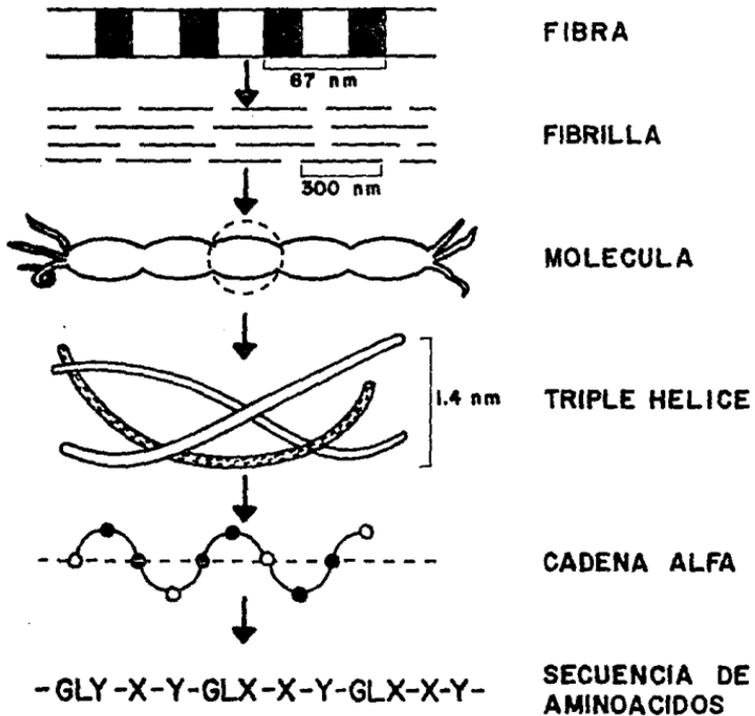
La colágena es la proteína más abundante de los tejidos conjuntivos y participa en una gran variedad de funciones mecánicas y estructurales (29,30).

La colágena es una proteína constituida por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadena α , cada una de estas cadenas adopta una estructura helicoidal que gira hacia la izquierda con aproximadamente tres aminoácidos por vuelta. A su vez, las tres cadenas helicoidales giran hacia la derecha dando origen a una estructura super-helicoidal más compleja.

La unión de las tres cadenas forma una molécula parecida a un "rollo" con aproximadamente 1.4 nm de diámetro. Cada cadena α contiene aproximadamente 1050 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 100,000 daltones y una longitud de 300 nm, Ver figura 1, (30, 31).

Figura. 1

ESTRUCTURA PERIODICA DE LA FIBRA DE COLAGENA



(Traducido. R. Mundo Científico.
1:28, 7. 1981)

Un análisis de la composición de aminoácidos de una preparación de tropocolágena pura obtenida de piel humana, muestra varias características sobresalientes (32):

- 1) Un contenido alto de glicina (33%), alanina (12%) y prolina (13%).
- 2) Bajo contenido de cisteína y tirosina
- 3) Ausencia de triptofano
- 4) Presencia de hidroxilisina (6%) e hidroxiprolina (9-11%).

La fórmula molecular de una cadena α es representada como (Gly - X - Y)₃₃₃, donde la naturaleza de estos componentes más frecuentes son: Glicina-Prolina-Hidroxiprolina-, explican las cualidades de rigidez y estabilidad de la molécula, cualidades que son naturalmente la base de la duración de los tejidos ricos en colágena (los acoplamientos estereoquímicos debido a la estructura cíclica de la prolina y de la hidroxiprolina, y la naturaleza compacta de la glicina, son los que proporcionan la rigidez de la triple hélice) (30,33,34).

El grupo hidroxilo de la hidroxiprolina permite el establecimiento de puentes de hidrógeno (enlaces químicos débiles) entre las cadenas α que constituyen la triple hélice. La molécula de colágena debe pues su estabilidad en gran parte al grupo hidroxilo de la hidroxiprolina (30).

La hidroxilisina puede ser glicosilada por adición de galactosa y glucosa, generando residuos glucosil-galactosil-hidro-

xilisina. Estas reacciones son catalizadas por la glucosil y galactosil transferasas; la galactosil-transferasa ha sido parcialmente purificada, y la glucosil-transferasa ha sido aislada de un homogenado protefnico (33).

Aunque todas las colágenas tienen propiedades comunes, cada tipo de colágena es genéticamente distinta, está caracterizada por su composición química, propiedades funcionales, interacción con otras macromoléculas, patología, morfología y distribución (35).

TIPOS DE COLAGENA

Colágena tipo I. Fue la primera colágena identificada y la más abundante, siendo el principal componente estructural de piel, tendón y hueso.

Colágena tipo II. Es la principal protefna estructural del cartílago, está formada de tres cadenas polipeptídicas idénticas. Se ha encontrado también en el humor vítreo y la retina.

Colágena tipo III. Fue originalmente detectada en piel fetal, donde es particularmente abundante; también se le encuentra en bazo, pulmón, útero y tejido conjuntivo reticular.

Colágena tipo IV. Es específica de membranas basales las cuales son estructuras extracelulares; se localiza rodeando músculos, nervios y grasa. Presenta dominios globulares que

no son eliminados durante el procesamiento extracelular de la protefna.

Colágena tipo V. Se asemeja a las colágenas intersticiales. La presencia de un dominio no helicoidal a lo largo de la molécula, la hace susceptible a un ataque por proteasas tal como la pepsina. Este tipo de colágena se ha localizado en membranas sinoviales (36), hueso, cartilago y alrededor de las células de músculo liso.

Colágena tipo VI. Tiene una estructura molecular única, se encuentra como microfibrillas en el intersticio del tejido conjuntivo.

Colágena tipo VII. Es llamada también como colágena "de cadena grande", es solubilizada por digestión con proteasas, está formada por estructuras diméricas en antiparalelo.

Colágena tipo VIII. Conocida como colágena EC, aún no se encuentra del todo caracterizada.

Colágena tipo IX. Llamada también colágena tipo M o colágena HMW - LMW, es un constituyente menor de las colágenas de cartilago. Al igual que colágena tipo VIII, no está lo suficientemente caracterizada.

Colágena tipo X. Conocida como cadena corta o tipo G, es el mayor producto del cultivo de condrocitos y de regiones calcificadas de cartilago. Ver tabla 1, (37).

TABLA I

CARACTERISTICAS Y LOCALIZACION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENA

TIPO	CADENAS	CARACTERISTICAS	FORMA DE AGREGACION	LOCALIZACION
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	NAS ABUNDANTE	PEQUEÑAS BANDAS DE FIBRAS DE 67 nm	PIEL, HUESO, ETC.
II	$\alpha 1(II)$	NAS ABUNDANTE	PEQUEÑAS BANDAS DE FIBRAS DE 67 nm	CARTILLAGO, HUMOR VITREO
III	$\alpha 1(III)$	FORMA RETICULAR EN CARTILLAGO, ABUNDANTE	PEQUEÑAS BANDAS DE FIBRAS DE 67 nm	PIEL, VASOS SANGUÍNEOS, ORGANOS INTERNOS, 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	—	CADENAS LARGAS	DIMERO FLS*	FIBRAS DE ANCLAJE
VIII	$\alpha 1(VIII)$	PEQUEÑA HELICE EN TANDEM	—	ALGUNAS CELULAS ENDOTELIALES
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	ES EL MENOR EN PROTEINA DE CARTILLAGO; CONTIENE UNIDOS GLICOSAMINOGLICANOS	—	CARTILLAGO
X	$\alpha 1(X)$	CADENAS CORTAS	—	CARTILLAGO MINERALIZADO E HIPERTROFICO

*EL TERMINO FLS SE REFIERE A LAS MOLECULAS DE COLAGENA ARREGLADAS EN ANTIPARALELO

(TIBS. 287, 1985)

2.4.1 BIOSINTESIS

La síntesis de esta proteína que constituye el componente principal de la mayor parte de los tejidos conjuntivos en el organismo, es muy compleja. Se han realizado numerosos estudios e investigaciones para llegar a conocer los mecanismos involucrados en la biosíntesis y secreción de esta proteína estructural, la cual se distingue de otras debido a que sufre un gran número de modificaciones postraduccionales, poco comunes en otras proteínas.

Los diferentes pasos involucrados en la síntesis de colágena se puede dividir en:

A) Eventos Intracelulares.- El primer paso en la formación de la cadena polipeptídica es la transcripción y traducción de los ARN mensajeros que codifican para colágena, los cuales se unen a los polisomas unidos al retículo endoplásmico rugoso (RER) de la célula, con las cadenas nacientes vectorialmente orientadas hacia la cisterna de este organelo subcelular. La incorporación de aminoácidos en las cadenas nacientes vía ARN de transferencia, procede por los mecanismos comunes de la síntesis de proteínas, con la excepción de hidroxiprolina e hidroxilisina, los cuales se derivan por la hidroxilación enzimática de residuos específicos de prolina y lisina durante el crecimiento de la cadena polipeptídica.

Estos eventos, así como la adición de azúcares (glucosa, galactosa, etc.) y la formación de puentes disulfuro se llevan a cabo en las cisternas y aparato de Golgi. El precursor biosintético de la colágena extracelular se conoce como procolágena.

B) Eventos Extracelulares.- Existen enzimas que transforman la molécula de procolágena, denominadas procolágena peptidasas, que inciden en los extremos amino y carboxilo terminales generando tropocolágena, que contiene telopeptidos con peso molecular de 300,000 daltones. Las moléculas de tropocolágena se agregan en el espacio extracelular y se unen covalentemente entre sí a través de condensaciones aldólicas (aldehídos derivados de residuos de lisina) formando fibras durante la fibrilogenesis (32).

2.4.2 COLAGENASAS

Las colagenasas son proteinasas neutras específicas, las cuales inician el rompimiento de fibras de colágena nativa por desdoblamiento de un sitio único. El depósito y lisis de colágena juegan un papel importante en una variedad de condiciones normales y patológicas incluyendo remodelación tisular e inflamación crónica (38).

La interferencia farmacológica específica con el metabo-

bolismo de colágena está relacionada a varios eventos característicos de la síntesis, secreción, maduración y degradación de esta protefna.

Existen dos clases de colagenasas:

- 1) Las de origen vertebrado que son endopeptidasas, escinden una cadena simple en un punto de aproximadamente de tres cuartos de largo de la molécula a partir del amino terminal, dividiendo así la molécula en dos fragmentos.
- 2) Las colagenasas de origen bacteriano, atacan la molécula de colágena en sus partes terminales reduciendo ésta a pequeños fragmentos. (39).

2.4.3 METABOLISMO

La degradación de la colágena en condiciones fisiológicas y patológicas es el resultado de la acción de una enzima altamente específica: la colagenasa, aunada a una posterior participación de otras proteasas. La actividad colagenolítica es el resultado de la síntesis, secreción, activación e inhibición de esta enzima (Gross, 1976] (40).

Las enfermedades hereditarias del metabolismo de la colágena ya sea por alteración en la síntesis o degradación, están clasificadas en cuatro categorías:

- 1) Anormalidades genéticas en el DNA que codifica para procolágena.
- 2) Defectos a nivel de transcripción o traducción del RNAm para procolágena.
- 3) Falla parcial o total de las modificaciones post-traduccionales intra o extracelulares de la procolágena.
- 4) Variaciones en la actividad de la colagenasa determinadas genéticamente.

En cuanto a las enfermedades adquiridas, estas pueden resultar de anormalidades en la respuesta inmune celular contra colágena. El equilibrio entre el rango de síntesis y degradación de colágena determina el depósito neto de esta proteína; así, la estimulación controlada de la actividad de colagenasa o elastasa en los mamíferos debería ser de importancia vital en el resultado final de las enfermedades fibrosantes (39).

2.4.4 PAPEL DE LA COLAGENA EN CIRROSIS.

En la cirrosis el contenido de colágena en el hígado se encuentra siete veces por arriba de lo normal. Macroscópicamente la superficie del hígado que en condición normal es lisa, se torna en nódulos gruesos rodeados de grandes bandas de colágena.

Durante la evolución de la cirrosis, la colágena es depositada en exceso en el tracto portal y/o alrededor de la vena

central inicialmente. Después abarca todo el lóbulo del hígado uniendo estas estructuras y comprometiendo con ello la función del hepatocito impidiendo el paso de componentes del plasma a estas células y viceversa (39).

3. ASPECTOS INMUNOLOGICOS

3.1 LOS MACROFAGOS

Los macrófagos fueron reconocidos como células defensoras del organismo frente a las agresiones bacterianas, por Metchnikoff en 1901. Su origen es punto de debate y no está del todo aclarado, se acepta que sus precursores se encuentran en médula ósea dando lugar a los monocitos sanguíneos, los cuales al llegar a los tejidos y entrar en actividad fagocítica se convierten en macrófagos (41,42). Estos pueden existir en diferentes estadios de activación, variando su capacidad secretoria, su actividad oxidativa en respuesta a estímulos, y su habilidad citotóxica.

Los macrófagos son influenciados por una gran variedad de factores in vivo, y pueden ser modulados por sustancias tales como los lipopolisacáridos y el interferón gamma (43).

3.1.1 FAGOCITOSIS

Los macrófagos son entidades celulares altamente especializadas para llevar a cabo la función de ingestión y destrucción de partículas mediante el proceso de la fagocitosis, que requiere de movimiento coordinado de membranas y citoplasma (45).

Durante la fagocitosis, las partículas que están ligadas a los receptores de la membrana celular, son introducidas (vol-

TABLA II

PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES (44)

Hormonas Polipeptídicas:

- Interleucina 1- α y 1- β (1L-1)
- Interferón- α e Interferón - γ
- Factores de crecimiento de fibroblastos
- Factores activadores de fibroblastos

Componentes del Complemento (C):

- Vía clásica; C1, C4, C2, C3, C5
- Vía alterna: Factor B, Factor D, Properdina
- Fragmentos activos generados por proteasas de macrófagos: C3a, C3b, C5a, Bb

Factores de Coagulación:

- Vía intrínseca: IX, X, V, Protrombina
- Vía extrínseca: VII

Otras Enzimas:

- Proteasas neutras: activador del Plasminógeno, Elastasa, Colagenasas, convertasa de Angiotensina, otras.
- Lipasas: Lipasa lipoproteína, Fosfolipasa A₂
- Glucosaminidasa: Lisozima
- Hidrolasas ácidas lisosomales: Proteasas, Lipasas (deoxi) ribonucleasas, Fosfatasas, Glicosidasas, Sulfatasas.
- Deaminasa: Arginasa

continúa..

TABLA II

PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES (44)

Inhibidores de Enzimas y Citocinas:

- Inhibidores de proteasas: α -2-macroglobulina, α -1-antitripsina, Inhibidores de activador de plasminógeno, Inhibidores de plasmina, Inhibidor de collagenasa.
- Inhibidor de fosfolipasa: Lipomodulina (macroscortina)
- Inhibidores de IL-1

Proteínas de Matriz Extracelular o Adhesión Celular:

- Fibronectina
- Proteína de enlace-gelatina de 95 kD

Lípidos Bioactivos:

- Productos de ciclo-oxigenasa: Prostaglandina E_2 (PGE_2), Prostaglandina $F_2\alpha$, Prostaciclina, Tromboxano.
- Productos de lipoxigenasa: Ácido monohidroxi-eicosatetraenoico, Ácido dihidroxi-eicosatetraenoico, Leucotrienos B₄, C, D, E.

viéndose un fagosoma o vacuola fagocítica) y finalmente son digeridas (después de la fusión del fagosoma con el lisosoma).

La penetración de partículas ligadas a receptores Fc o a receptores inespecíficos parece estar controlada por microfilamentos citoplásmicos y requiere de energía para llevarse a cabo (46).

3.1.2 QUIMIOTAXIS

Los monocitos y los macrófagos son células móviles con un desplazamiento semejante a las amibas y por tanto con la capacidad de migrar a través de los tejidos. Esta migración puede ser aleatoria o con una dirección muy precisa hacia algún estímulo químico, en cuyo caso es conocida con el nombre de quimiotaxis.

La quimiotaxis requiere de energía y es iniciada por el contacto de la membrana celular con compuestos quimiotácticos específicos. Estos inducen una mayor producción de energía por la glucólisis y la motilidad posterior, la cuál al parecer depende de la formación de miofilamentos al igual que la polimerización de la actina (46). La movilidad puede sin embargo ser espontánea, esto es, sin necesitar de ningún estímulo específico. Se ha demostrado que los macrófagos poseen esta capacidad.

La participación de los microtúbulos en la quimiotaxis

es aún debatida debido a hallazgos contradictorios (47,48), los microfilamentos por otra parte está plenamente demostrado que sí intervienen en esta actividad.

3.2 PAPEL DE LOS MACROFAGOS EN LA FAGOCITOSIS Y LA PRODUCCION DE ENZIMAS.

La regulación de la respuesta inmune contra un antígeno, constituye un proceso complicado que involucra interacciones de los macrófagos, linfocitos B y las subclases de linfocitos T.

Los macrófagos desempeñan un papel central en la inhibición y la regulación de la respuesta inmunitaria "in vivo" e "in vitro", como son:

- A) Aumento de la respuesta por anticuerpos
- B) Aumento de la inmunidad mediada por células
- C) Los mecanismos mediante los cuales se produce el aumento de las respuestas de linfocitos debido a los macrófagos son:
 1. Procesamiento y presentación de los antígenos
 2. Generación de linfocitos T cooperadores
 3. Factores "activantes de linfocitos"
 4. Activación estimulada por los mitógenos y por el cultivo de linfocitos mixtos
 5. Supresión por los macrófagos de las respuestas de los linfocitos.

Para llevar a cabo estas actividades se requiere de viabilidad de las células linfoideas, así como de requerimientos

genéticos para la interacción de macrófagos-linfocitos.

Los macrófagos además pueden liberar toda una gama de enzimas hidrolíticas que contribuyen a los procesos inflamatorios, en particular a los crónicos. Estas enzimas liberadas pueden ser entre otras hidrolasas ácidas (catensinas, hialuronidasas), colagenasas y el activador de plasminógeno (46).

Además, los macrófagos intervienen en la liberación de enzimas lisosomales como: proteasas, RNAasas, DNAasas, lipasas, estearasas, lisozimas, fosfatasas, etc. (49).

3.3 POSIBLE PAPEL INMUNOLOGICO EN LA CIRROSIS HEPATICA

El alcohol y su metabolito mayor el acetaldehido son moléculas muy pequeñas para ser inmunógenos. Algunas evoluciones clínicas son atribuibles a disturbios inmunes en pacientes con hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria y ligeramente en cirrosis alcohólica.

La inmunidad mediada por células está alterada, esto se comprobó por una prueba in vitro de la función celular supresora y la relación de célula cooperadora/supresora, siendo estas anormalidades inespecíficas ya que se encuentran en muchos desórdenes clínicos y posiblemente refleje alteraciones sistémicas. La hiperglobulinemia no es rara en la cirrosis alcohólica y su alteración más significativa es el incremento de IgA en suero; esto está relacionado con la ingesta de alcohol y el da-

ño en el hígado.

Un estudio realizado en el King's College Hospital en Londres, sugiere que las mujeres jóvenes son mucho más susceptibles a hepatitis alcohólica y cirrosis que los hombres, y que estas pacientes presentan una alta incidencia de auto-anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti-músculo liso. Además, pacientes con antígenos de histocompatibilidad HLA B8 y DR3 tienden a presentar una forma acelerada de daño en el hígado si se ingiere alcohol, aún cuando estos datos no han sido confirmados (50).

El depósito de complejos inmunes en el glomérulo de pacientes con cirrosis alcohólica ha sido bien establecido (51). Este depósito incluye Cuerpos de Mallory, los cuales son antígenos relacionados principalmente con la cirrosis de origen alcohólico aunque su presencia no es específica de esta enfermedad (52).

Una característica histológica de enfermedad alcohólica de hígado es la presencia de cuernos de inclusión intracitoplásmicos eosinofílicos hialinos (Cuerpos de Mallory) formados de filamentos intermedios, siendo ésta una evidencia que sugiere su acción como estímulo antigénico en la iniciación o perpetuación de daño al hígado alcohólico (50).

4. PROPIEDADES DE ALGUNOS IMIDAZOLES.

Los derivados de imidazol han sido desarrollados recientemente como potentes agentes antiparasitarios, antineoplásicos, antimicóticos, inmunomoduladores, etc, y la mayoría de ellos muestran efectos sobre la respuesta inmune en humanos y animales. Sin embargo, se ha reportado que los efectos observados pueden ser completamente opuestos de un derivado a otro.

Entre ellos, el levamisol ha sido el primer agente inmunomodulador químico en ser introducido en la práctica clínica con bastante éxito (53). Las consecuencias inmunotoxicológicas del uso de derivados de imidazol se desconocen hasta el momento.

El tiabendazol ha sido sugerido como un adyuvante potencial en la terapia de cáncer (54,55), mientras que el nifidazol mostró ser un potente inhibidor de la respuesta inmune celular, particularmente en la fase de inducción. La mayoría de los imidazoles como por ejemplo el ketoconazol, metronidazol y miconazol (53, 56), se encontró que son inhibidores del metabolismo de drogas en el hígado.

Las reacciones de hipersensibilidad son complicaciones comunes en muchos agentes inmunomoduladores (57), muchos de éstos inducen reacciones no específicas como fiebre, escalofríos, malestar e hipotensión. Estas reacciones se desarrollan al principio de la terapia inmunomoduladora, probablemente inducidas por

interleucina-1, una monocina producida principalmente por macrófagos activados y conocida entre otros nombres como la sustancia pirogénica endógena.

La inducción de reacciones específicas de hipersensibilidad por agentes inmunomodulantes es hipotética, aunque se han determinado niveles elevados de IgE en suero de pacientes tratados con levamisol (58).

4.1 LEVAMISOL

El cloruro de levamisol, es un polvo blanco cristalino estable, con peso molecular de 240.75, soluble en agua e hidrolizable en solución alcalina (59). Presenta una vida media en el plasma humano de aproximadamente cuatro horas, es metabolizado en el hígado y eliminado totalmente del cuerpo en un lapso de dos días; siendo sus metabolitos excretados en orina y una pequeña parte con las heces (60).

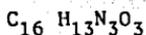
El levamisol posee propiedades inmunoestimuladoras reportadas por Renoux and Renoux (59,60). Sus propiedades inmunológicas confirman su capacidad para disminuir el daño de las funciones inmunes, por lo que se ha propuesto su uso como un "inmunonormalizador" potencial (61), su actividad incluye la regulación mediada por células T. Cuando es administrado en enfermos inmunodisfuncionales, el levamisol es capaz de alterar una gran variedad de funciones del macrófago, por ejemplo

disminuye la movilidad y la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos (62,63).

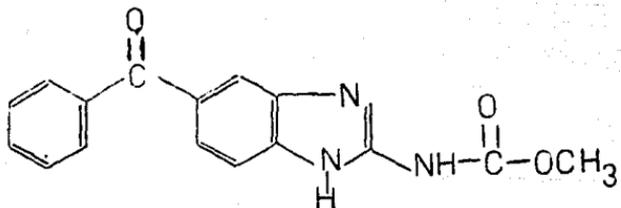
4.2 CARBAMATO DE BENZIMIDAZOLE (CBZ) o MEBENDAZOL.

El mebendazol o (metil-N-(5-benzoil-2-benzimidazolil) carbamato) (Janssen Farmacéutica), es un polvo amorfo amarillento. Forma cristales a partir de ácido acético y metanol, es casi insoluble en agua, su solubilidad en dimetil sulfóxido es de 2.4 g/100 ml; y presenta punto de fusión de 288.5°C. Su peso molecular es de 295.30.

Fórmula condensada:



Fórmula desarrollada:



Uso terapéutico aceptado: como antihelmíntico de amplio espectro. El mebendazol es pobremente absorbido a partir del tracto intestinal y la cantidad de mebendazole y sus metabolitos excretados por vía urinaria depende de la especie que se trate (ver Tabla III).

TABLA III

EXCRECION DE MEBENDAZOL. Y METABOLITOS

ESPECIE	DOSIS ORAL (mg/Kg)	TIEMPO DES- PUES DEL TRA TAMIENTO. (HRS)	EXCRECION (% DE DOSIS ADMINISTRADA)		
			HECES	ORINA	TOTAL
RATA	2.5	24	82.7	5.1	87.8
	10.0	0 - 96	85.6	5.8	91.4
		0 - 96	92.1	12.6	104.7
PERRO	10.0	0 - 96	90.5	0.9	91.4
CERDO	1.0	0 - 96	45-64	32-48	93-96

(Department of drug metabolism, Janssen Pharmaceutica).

La absorción reportada en humanos varía entre 0.5 y 1.0% (64).

El mebendazol en ratas, se excreta casi sin modificaciones en las heces. Por el contrario, estudios realizados en humanos después de recibir una dosis oral de 200 mg/día por tres días demostraron que sí existen modificaciones. Los niveles en plasma no excedieron de 30 ng de CBZ/ml y 90 ng/ml de amino-derivado (65). En la orina se observó que son cuatro los metabolitos del mebendazol que se excretan:

- 1) metil N-(5-benzoil-2-benzimidazolil) carbamato.
- 2) 2-amino-5(6)-benzoilbenzimidazol.
- 3) metil-5(6)(α -hidroxibenzil) benzimidazol carbamato.
- 4) 2-amino-5(6)(α -hidroxibenzil)benzimidazol.

Después de la administración oral de 1.5 g de CBZ a voluntarios en ayuno, sólo se encontró en plasma a concentraciones menores o iguales a 5 ng/ml (66).

Toxicología. Farmacológicamente, se ha demostrado que el mebendazol es casi una sustancia inerte y en los modelos de toxicidad realizados, no presenta efectos sobre el sistema nervioso central, ni efectos analgésicos, hipnóticos o anticonvulsivos, (Janssen Farmacéutica, 1972; Marsboom, 1973) (67).

No obstante, existen otros parámetros no determinados, como sería el efecto de su administración crónica.

El mebendazol comparte con otros derivados del benzimidazol la habilidad para enlazarse a tubulina y así inhibir el ensamble de los microtúbulos (Hoebeke et al, 1976; Friedman

and Platzter, 1978; Ireland et al, 1979) (67). De hecho es uno de los fármacos que presenta una mayor afinidad por estos elementos intracelulares (68) y solamente es superado por fármacos con actividades francamente antimetabólicas y por ende antitumorales como el nocodazole.

FUNDAMENTO DEL TEMA

La causa más frecuente de que se produzca la cirrosis hepática es la ingesta crónica de alcohol; otras causas son la hepatitis, la hemosiderosis y las reacciones secundarias a fármacos. El desarrollo de la cirrosis implica necrosis celular que posteriormente se transforma en grandes depósitos de tejido fibroso dentro de la estructura del hígado y generalmente dará por resultado alteraciones en la circulación hepática produciendo algunas de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad.

La dinámica de esta fibrosis implica tanto la síntesis y el depósito, así como una disminución en la degradación de la colágena hepática. Por lo tanto, cualquier fármaco que incida de manera favorable en uno o varios de estos factores podría coadyuvar a la mejor evolución de la enfermedad.

En este plan se han ensayado varios compuestos entre los cuales destaca la colchicina la cuál ha demostrado su eficacia para mejorar el funcionamiento hepático. Sin embargo, esta mejoría funcional no necesariamente se acompaña de cambios morfológicos que indiquen la resolución de la enfermedad(93).

Recientemente se ha valorado un compuesto que es el Carbamato de Benzimidazol (Mebendazol) el cuál ha demostrado ser efectivo a nivel experimental en animales, observándose en algunos casos de mejoría a nivel histológico de la fibrosis he-

pática, quedando por aclarar el o los mecanismos por los cu
les se produce dicha mejoría. Por tanto, creemos que es de
gran interés el tratar de dilucidar el mecanismo de acción de
este fármaco "antifibrótico", pues esto lograría que se le
diera un uso más racional y quizás pudiera ser utilizado en
otras patologías que impliquen la presencia de fibrosis.

ANTECEDENTES

La cirrosis hepática es un padecimiento progresivo y crónico cuyas características son la necrosis hepatocelular y el posterior depósito de colágena en el intersticio hepático.

Hasta la fecha no se conoce el mecanismo fisiopatológico íntimo por el cual se produce y mantiene esta enfermedad, aunque se ha demostrado en algunos casos que aún cuando se eliminan los supuestos agentes etiológicos la evolución del padecimiento continúa. En base a estas observaciones se ha postulado que existe una alteración a nivel inmunológico que "perpetúa" la destrucción del hepatocito (46).

Los datos que apoyan la teoría inmunológica para "perpetuar" el daño hepático se apoya en diversas alteraciones observadas en pacientes con cirrosis hepática como son: la presencia de anticuerpos dirigidos de las membranas de los hepatocitos (46, 69, 70), alteración de la respuesta de células NK (71), alteración de la distribución de subpoblación de linfocitos T (72), alteración de la distribución de linfocitos T/B (46), aumento de Ig A (46,73), presencia de complejos inmunes (74), alteración de la respuesta de la hipersensibilidad retardada (75), etc.

El Carbamato de Benzimidazol (Mebendazol) ha sido ampliamente utilizado como antihelmíntico en tratamiento subagudos.

Recientemente se ha ensayado como posible tratamiento en la cirrosis hepática experimental inducida en ratas con tetracloruro de carbono (76,77), habiéndose observado que su administración crónica produce:

- a) Aumento en el número de células mononucleares en el hígado.
- b) Desaparición de los tabiques fibrosos de la cirrosis moderada y mejoría y adelgazamiento de estos tabiques en la cirrosis avanzada.
- c) Disminución en la síntesis de colágena hepática.

El mebendazol posee como característica unirse con mucha afinidad a la tubulina, por lo que impide la polimerización de los microtúbulos, estructuras necesarias para la secreción y posterior depósito de la colágena. Sin embargo, la disminución de la secreción de colágena no explicaría por sí misma la desaparición de la fibrosis ya establecida.

Como este fármaco pertenece a la familia de los benzimidazoles algunos de cuyos miembros (v.gr.: Levamisol) poseen una actividad inmunomoduladora (78), se postula que el mebendazol empleado crónicamente pudiera influir en el sistema inmune. Esta hipótesis se apoya en la observación de un incremento en el número de células mononucleares en el hígado de animales cirróticos tratados con mebendazol.

La desaparición de los tabiques fibrosos observado en la cirrosis hepática tratada con mebendazol podría deberse

a un incremento de la colagenasa, enzima específica encargada de la hidrólisis de la colágena. Algunas células del sistema inmune son capaces de producir esta enzima como son los monocitos, los macrófagos y células polimorfonucleares (79, 80), así como factores que estimulan la producción de colagenasa por otras células (81). Otra posibilidad es un incremento en la capacidad fagocítica de algunas de estas células lo cual se ha observado con el levamisol (82).

Otro dato que favorece la posible acción del mebendazol sobre el sistema inmune, es que se ha demostrado que algunos compuestos semejantes como el ketoconazol presenta la característica de unirse a los receptores membranales para glucocorticoides, impidiendo la acción de estos y alterando por lo tanto la respuesta inmune, habiéndose identificado que la capacidad para bloquear a dichos receptores se localiza en el anillo del benzimidazol (83).

HIPOTESIS DE TRABAJO

Debido a las similitudes que presenta el Mebendazol com
parado con el Levamisol, se espera que produzca acciones pare
cidas a éste sobre células del sistema inmune como:

- a) Aumento de la secreción de colagenasa en los macrófagos.
- b) Inducción de los macrófagos para liberar factores que estimulen la producción de colagenasa en los fibroblastos.
- c) Aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos.

De corroborarse todos estos factores en conjunto ayudarán a explicar la mejoría de la fibrosis observada en la Cirrosis Hepática Experimental.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Con el propósito de evaluar las consideraciones planteadas en nuestra hipótesis de trabajo se establecieron los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar el efecto de Mebendazol sobre células mononucleares.
- 2) Determinar la actividad de colagenasa en:
 - a. Sobrenadante de células mononucleares estimuladas con mebendazol.
 - b. Sobrenadante de fibroblastos estimulados con mebendazol.
 - c. Cooperatividad entre ambas entidades celulares y mebendazol.
- 3) Medición de la migración espontánea de células mononucleares en presencia de mebendazol.
- 4) Estudiar el efecto del mebendazol sobre la capacidad fagocítica de las células mononucleares, así como la estimulación de su actividad secretora.

MATERIAL Y REACTIVOS

El material biológico utilizado para la realización de este trabajo fué:

- Células mononucleares, obtenidas de sangre periférica de rata o humano.
- Macrófagos de la línea celular J 774.1, de origen murino. (American Tissue Culture Colection)
- Fibroblastos humanos de líneas establecidas.
- Eritrocitos de carnero y/o partículas de látex.
- Ratas macho, de la cepa Sprague-Dawley.

REACTIVOS

- Mebendazol: metil-N-(5-benzoil-2-benzimidazolil) carbamato, "CBZ" donado por los Laboratorios Janssen Pharmaceutic de México.
- Colágena radioactiva (tritio), obtenida en el laboratorio.
- Colagenasa bacteriana (Sigma).
- Medio de Cultivo Dulbecco Modificado (D-MEM) (Gibco).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco).
- Tripsina (Sigma)
- Tris-HCl 0.05 M (Merck).
- Acido etilen-diamino tetraacético (EDTA) (Merck).
- Acido Acético (Merck).
- Metanol (Merck)
- Fosfato de Sodio (Merck).

- Hidróxido de sodio (Merck).
- Histopaque-1077 (Sigma).
- Agarosa (Sigma).
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) (Merck)
- Solución Bray, preparada en el laboratorio.
- Reactivos: Fijador y Revelador para fotografía (Kodak).
- Reactivos para Electroforesis:

Poliacrilamida, Tris-HCl a pH = 8.8 y pH = 6.8, Dodecil sulfato de sodio (SDS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), Persulfato de amonio para electroforesis, Colorante azul de Coomassie, (Bio-Rad Laboratories).

Estos reactivos fueron del mejor grado disponible, así como de diferentes fuentes comerciales.

METODOS

I. PARAMETROS DESARROLLADOS

1. Obtención de macrófagos peritoneales de rata de la cepa Sprague-Dawley.

La obtención de los macrófagos en condiciones de esterilidad se llevó a cabo mediante la inyección de solución salina fría en la cavidad peritoneal de ratas y a las que se les dió masaje con el objeto de "desprender" a los macrófagos en la solución. Después con una jeringa se sustrajo la solución que contenía a los macrófagos y se vació cuidadosamente en un tubo de ensayo, y se le adicionó medio D-MEM con SFB al 10%. Finalmente se contaron los macrófagos y fueron colocados en cajas petri e incubados a 37°C, con una atmósfera parcial de 5% de CO₂ y 80% de humedad, en un incubador metabólico NAPCO.

2. Obtención de macrófagos de sangre periférica de rata. Bajo condiciones de esterilidad y con una jeringa que contenía heparina, se obtuvo sangre periférica de rata mediante punción cardiaca, con el fin de obtener células mononucleares, utilizando para ello la técnica de separación por gradientes con Ficoll-Hypaque.

2.1 Preparación de Ficoll-Hypaque:

a) Se utilizó Ficoll 400 (Pharmacia) (Sigma F-4375) al 9% en agua destilada.

- Se pesaron 135g de Ficoll y se pusieron a disolver en 1500 ml de agua fría a 4 °C; la disolución se realizó en el cuarto frío y se dejó agitando durante 18 hrs.
- b) Se utilizó Hypaque que es Diatrizoato de sodio (Sigma S-4506); 15.50g disueltos en 31 ml de agua destilada.
 - Se trabajó con 13 frascos de Hypaque al 50 % y de un catorceavo frasco se tomaron 21 ml, con objeto de tener 424 ml de Hypaque; a este volumen se le agregaron 201 ml de agua destilada y se mezcló muy bien. Al final se tienen 625 ml de Hypaque que al mezclarlos con el Ficoll da una concentración final del 33.9 %.
- c) Se adicionaron los 1500 ml del Ficoll a los 625 ml del Hypaque y se mezcló bien.
- d) Con un densitómetro se ajustó la densidad de la solución a 1.076 - 1.078, añadiendo agua destilada en cantidades pequeñas.
- e) La solución de Ficoll-Hypaque se esterilizó durante 10 minutos a 10 lb de presión y 120 °C.
- f) La solución de Ficoll-Hypaque estéril se distribuyó en frascos ámbar estériles y se refrigeraron hasta su uso.

2.2 Utilización de la Solución de Ficoll-Hypaque en la obtención de Macrófagos de sangre periférica de rata:

- A 10 ml de sangre de rata, recolectada con heparina se adicionaron 10 ml de medio Dulbecco y se mezclaron bien por inversión.
- En tubos de ensayo estériles, se adicionaron 3 ml de solu

ción de Ficoll-Hypaque y 6 ml de la mezcla de sangre con medio Dulbecco, ésta última se adicionó lentamente.

- Se centrifugaron los tubos a 2500 - 3000 rpm/20 minutos.
- Después de la centrifugación, con una pipeta Pasteur se aspiró cuidadosamente la interfase opaca de la capa superior de 0.5 cm, que contiene las células mononucleares.
- La interfase opaca se transfirió cuidadosamente a un tubo estéril y se adicionaron 10 ml de medio Dulbecco, se agitaron y se centrifugó a 2500 - 3000 rpm/10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante, y el botón se resuspendió en medio Dulbecco, se centrifugó a 2500 - 3000 rpm/5 minutos.
- Estos pasos se llevaron a cabo con el objeto de eliminar de esta capa, los residuos de Ficoll-Hypaque que son tóxicos para las células.
- Por último el botón se resuspendió en medio D-MEM con SFB al 10%, quedando así las células mononucleares listas para su uso.

3. Establecimiento y Propagación de Cultivos Celulares.

3.1 Obtención de Cultivos de Fibroblastos.

Se llevó a cabo mediante resiembras de líneas preestablecidas en el laboratorio, con el fin de ser probados con los sobrenadantes de células mononucleares estimuladas con mebendazol.

3.2 Mantenimiento y Propagación del cultivo de macrófagos de la línea celular murina J 774.1, de origen murino (American Tissue Culture Colection).

Se llevó a cabo utilizando para ello medio D-MEM con SFB al 10% y manteniendo las condiciones de cultivo de 37°C, una atmósfera parcial de 5% de CO₂ y 80% de humedad, en un incubador metabólico NAPCO.

4. Purificación de Colágena de piel de rata.

La extracción y purificación de colágena a partir de piel de rata, se realizó de acuerdo al método de Gross (1958). Se fragmentó la piel lo más pequeño posible y se deslipidizó con cloroformo y etanol. Posteriormente se filtró la piel en gasa y para eliminar el cloroformo y el etanol se lavó con ácido acético 0.5 M varias veces. Se sometió a digestión con pepsina (1mg/ml) incubando a 4°C durante 72 horas con agitación constante. Después se centrifugó a 18000 rpm/30 minutos (rotor SS34) y el sobrenadante obtenido se precipitó con NaCl al 5% durante 24 horas. Inmediatamente se volvió a centrifugar a 16000 rpm/40 minutos y el precipitado se resuspendió en Tris-HCl 0.05M y NaCl 0.45M y se agitó a 4°C durante 48 horas. Se centrifugó a 18000 rpm/30 minutos y el sobrenadante se precipitó nuevamente con 1.0M NaCl durante 24 horas a 4°C. Se centrifugó a 18000 rpm/30 minutos a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en ácido acético 0.5M. Se dializó nuevamente

contra buffer de Tris-HCl 0.05M y NaCl 1.7M realizando varios cambios del buffer durante 24 horas, se centrifugó a 18000 rpm/30 minutos y el sobrenadante se dializó contra Tris-HCl 0.05M y NaCl 2.7M.

Se centrifugó nuevamente y el precipitado obtenido se resuspendió en ácido acético 0.5M y se dializó posteriormente contra ácido acético 0.5M durante 48 horas. Con cambios cada 3 horas. Se centrifugó a 18000 rpm/60 minutos a 4°C para eliminar el material insoluble y después se liofilizó. Para determinar la pureza de la preparación de colágena, se tomaron 400µg de la colágena liofilizada y se resuspendieron en ácido acético 0.5M. Se tomó una alícuota apropiada para electroforesis en geles de poliacrilamida. Debido a que se observaron varias bandas por debajo de las cadenas alfa, se decidió repetir el proceso de purificación de la colágena, como se describió anteriormente.

El material liofilizado se dializó contra ácido acético 0.5M con cambios cada 24 horas durante 3 días. Posteriormente se dializó contra H₂O destilada (2 cambios cada 12 horas) y nuevamente contra ácido acético 0.01M (3 cambios en 24 horas) y se centrifugó a 17000 rpm/60 minutos.

Con el objeto de determinar la estabilidad y pureza de la colágena obtenida, se realizaron incubaciones de la colágena durante 20 horas, a 30°C y se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida. Una vez que se obtuvo el grado de pureza requerido para la colágena, se procedió a la acetilación de la misma (84).

5. Obtención de Colágena Radiactiva por Acetilación con anhídrido acético Tritoado. Acetilación de colágena (Lefevye, Slegers and Claeys, 1978). Se llevó a cabo con ^3H -anhídrido acético (100mCi/mM) utilizando 205 mg de colágena dializada primero contra ácido acético 0.005M durante 24 horas y después contra ácido acético 0.01M. Finalmente los 205 mg de colágena se disolvieron en 90 ml de ácido acético al 0.01 M a 4 °C toda la noche. El ^3H -anhídrido acético (0.98 mCi/mg, 25.5 mg en 3 ml de benzeno) se añadió por goteo durante 3 horas con agitación continua.

Se ajustó el pH de la solución de colágena a 8.0 agregando K_2HPO_4 1.0M y NaOH 1.0M. La reacción se terminó una hora después de haber agregado todo el anhídrido acético ajustando el pH de la solución a 4.0 con ácido acético glacial.

La colágena acetilada se dializó contra un volumen de 1.0 litro de agua destilada, con cambios frecuentes (500 ml/hora)

Posteriormente se dializó la colágena contra ácido acético 0.5 M/24 horas a 4 °C y después contra ácido acético 0.005M.

Finalmente, esta preparación de colágena acetilada se utilizó en los ensayos para determinar la actividad colagenolítica de los sobrenadantes de células mononucleares (85).

6. Determinación de la Actividad Colagenolítica, en los sobrenadantes de cultivos celulares.

Se utilizaron los sobrenadantes de células mononucleares para demostrar su actividad colagenolítica, mediante un ensayo

que utiliza sustrato radioactivo fijado a plástico y midiendo su liberación como producto de degradación, siguiendo para ello el Método de Johnson Wint (86).

7. Ensayo de Quimiotaxis, en placas de agarosa.

Se midió la capacidad de quimiotaxis mediada por mebendazol o algún factor liberado por las células mononucleares, utilizando la Prueba de Migración en Placas de Agarosa, mediante la Técnica de Clausen Modificada (87).

8. Determinación de Fagocitosis: en células mononucleares con eritrocitos de carnero y partículas de látex.

La cuantificación de la capacidad fagocítica se realizó utilizando macrófagos de la línea celular J 774.1 adheridos a portaobjetos, mediante la ingesta de eritrocitos de carnero y partículas de látex expuestos a diferentes concentraciones de mebendazol durante 2 horas a 37°C. Finalmente las laminillas fueron lavadas con solución salina con objeto de eliminar material no fagocitado y que pudiera interferir en la cuantificación y tinción por medio del Método de May Grünwald Giemsa, quedando así listas para ser cuantificadas.

9. Electroforesis, en geles de poliacrilamida y determinación de material radiactivo por autoradiografía.

9.1 Preparación de geles para electroforesis.

Los geles utilizados en la metodología fueron al 10% de poliacrilamida, y están constituidos por dos fases: La fase

superior que actúa como gel concentrador de la muestra y la fase inferior que funciona como gel separador de la muestra.

Fase Inferior. Es la primera en ser preparada y adicionada a la cámara de electroforesis y para lo cual se requiere de los siguientes reactivos que son mezclados en un matraz en el orden que aparece a continuación:

- 7.5 ml de acrilamida al 30%
- 5.6 ml de Tris-HCl pH = 8.8
- 7.7 ml de agua bidestilada
- 1.4 ml de agua bidestilada (en lugar de urea)
- 0.45 ml de SDS al 10%
- 15 µl de TEMED
- 150 µl de persulfato de amonio grado para electroforesis.

Una vez obtenida y colocada la mezcla en la cámara de electroforesis, se deja gelificar.

Fase Superior. Se prepara en un matraz y al igual que la fase inferior no debe alterarse el orden de los reactivos al irse adicionando.

- 1.0 ml de acrilamida al 30%
- 1.9 ml de Tris-HCl pH = 6.8
- 4.1 ml de agua bidestilada
- 0.5 ml de agua bidestilada (en lugar de urea)
- 7 µl de SDS al 10%
- 7.5 µl de TEMED
- 50 µl de persulfato de amonio grado para electroforesis.

Terminada la mezcla se adiciona a la cámara de electroforesis y se coloca el "peine" que dará origen a los carriles en los cuales se colocarán las muestras; éste se deja gelificar y con cuidado se retira el "peine". Por último el sobrenadante de la mezcla se quita por medio de tiras de papel filtro que son introducidas en cada carril quedando así el gel listo para ser utilizado.

Se colocan las muestras previamente tratadas en los carriles y se cubren con Buffer Stock de Electroforesis y se corren a un voltaje de 40 volts por gel.

9.2 Método para preparar las muestras de electroforesis.

Se toman alícuotas de 150 μ l del sobrenadante de cada concentración de CBZ y se trabajó cada muestra por duplicado. Se adicionaron 20 μ l de tripsina a cada muestra y se incubaron a 37°C/10 minutos, después se adicionaron 20 μ l de inhibidor de tripsina de soya (observaciones previas demostraron que sin activación previa no se observaba degradación colagenolítica) y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente se adicionaron 10 μ l de colágena y las muestras se incubaron a 37°C/24 horas.

Las muestras fueron desnaturalizadas a ebullición por 10 minutos previa adición de 60 μ l de una solución que contenía: colorante de azul de bromofenol 0.01% en Tris-HCl pH= 6.8 con 1% de SDS y sometidas a electroforesis. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie durante toda la noche, y desteñidos en

una solución de ácido acético-metanol (5% - 7,5%).

9.3 El Buffer Stock de Electroforesis se prepara de la siguiente manera:

288 g de glicina
60 g de Tris-Base
20 g de SDS

- Se llevan a un volumen de 2 litros -

De este volumen se miden 150 ml y se llevan a 1500 ml con agua destilada, y este volumen final es utilizado para llevar a cabo una corrida de electroforesis.

9.4 Preparación de los geles para Autoradiografías.

Una vez obtenidos los geles fueron tratados de la siguiente manera:

- a) Los geles fueron sumergidos en DMSO durante 30 minutos con agitación.
- b) El procedimiento anterior fue repetido cuatro veces con cambio de DMSO en cada ocasión.
- c) Al término del último cambio, los geles fueron sumergidos en solución de DMSO + PPO al 20% durante 90 minutos con agitación.

- d) Se lavaron con agua corriente y se colocaron sobre papel filtro grueso para desecarlos.
- e) Por último se colocaron en placas de autoradiografía, y se dejaron en frío (-70°C) durante 7 a 14 días.
- f) Después de este tiempo se procedió a su revelado, utilizando soluciones de revelador y fijador de acuerdo a los métodos convencionales de fotografía.

II. EFFECTO DEL MEBENDAZOL SOBRE CELULAS MONONUCLEARES

- Sobre portaobjetos estériles se colocaron macrófagos de la línea celular J 774.1 y se incubaron durante una hora para obtener su adherencia al vidrio, transcurrida la incubación se lavaron los portaobjetos con el fin de eliminar los macrófagos no adheridos, e inmediatamente se adicionaron los reactivos de acuerdo al siguiente esquema:

N° laminilla	Eritrocitos de carnero	Medio D-MEM .10% de SFB	Medio D-MEM con CBZ	Equivalente a:
1	10 μ l	990 μ l	0 μ l	0 μ g CBZ
2	10 μ l	940 μ l	50 μ l	5 μ g CBZ
3	10 μ l	890 μ l	100 μ l	10 μ g CBZ
4	10 μ l	840 μ l	150 μ l	15 μ g CBZ
5	10 μ l	790 μ l	200 μ l	20 μ g CBZ
6	10 μ l	740 μ l	250 μ l	25 μ g CBZ
7	10 μ l	690 μ l	300 μ l	30 μ g CBZ
8	10 μ l	590 μ l	400 μ l	40 μ g CBZ

- Se incubó por dos horas a 37°C, después se procedió a lavar los porta-objetos con solución salina y se fijaron al calor para ser teñidas por medio de la técnica de tinción de Wright. Se dejan secar las laminillas y se observan al microscopio.

TINCION DE WRIGHT.

- a) Las laminillas ya fijadas al calor, se cubren con colorante de Wright por 3 minutos.
- b) Se elimina el colorante y se adiciona solución amortiguadora para Wright durante 6 minutos.
- c) Se lavan con agua corriente, se dejan secar y se observan al microscopio.

III.- EFECTO DEL CBZ SOBRE LA ACTIVIDAD DE COLAGENASA EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS CELULARES.

1.- SOBRENADANTE DE CELULAS MONONUCLEARES ESTIMULADAS CON CBZ.

En condiciones de esterilidad, en una placa con 96 pozos (de las utilizadas para el ensayo de ELISA) se sembraron macrófagos de la línea celular J 774.1 (100 000 células por pozo) y se incubaron en condiciones de 37°C, y atmósfera parcial de 5% de CO₂ y 80% de humedad por 72 horas, se lavaron con medio D-MEM sin suero con el propósito de eliminar macrófagos no adheridos y después se adicionó medio D-MEM con CBZ a diferentes concentraciones que variaron de 0µg como control hasta 40µg, se incubaron en las mismas condiciones y posteriormente, se procedió a recolectar el sobrenadante que fué tratado de la misma forma como se describió en la sección anterior, antes de efectuar la electroforesis.

2.- SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS ESTIMULADOS CON CBZ

En condiciones de esterilidad, en una placa con 96 pozos se sembraron fibroblastos de una línea preestablecida en el laboratorio, (50 000 células por pozo) y se incubaron en condiciones de 37 °C y atmósfera parcial de 5% de CO₂ por 72 hrs., con el fin de llevar al cultivo de fibroblastos a confluencia.

Al término de la incubación se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con medio sin suero, después se adicionó medio D-MEM con CBZ a diferentes concentraciones que van de 0 µg como control hasta 40 µg, se incubó a las mismas condiciones y posteriormente se procedió a recolectar el sobrenadante. El sobrenadante de las muestras fue tratado de la misma forma como se ha descrito en la sección anterior, antes de electroforesis.

3.- COOPERATIVIDAD ENTRE AMBAS ENTIDADES CELULARES.

En condiciones de esterilidad, en una placa con 96 pozos se sembraron fibroblastos de una línea establecida en el laboratorio (50 000 células por pozo), y se incubaron en condiciones de 37 °C y atmósfera parcial de 5 % de CO₂ por 72 hrs.

Por otra parte, en una placa de 96 pozos se sembraron macrófagos de la línea celular J 774.1 (100 000 células por pozo) con CBZ a diferentes concentraciones (de 0 µg a 40 µg) y se incubaron en las mismas condiciones.

Terminado el período de incubación, los fibroblastos sembrados fueron lavados con medio sin suero (varias veces) e inmediatamente se adicionó el sobrenadante contenido en la placa de los macrófagos y CBZ, las muestras fueron incubadas a 37 °C por 72 hrs. Posteriormente se recolectó el sobrenadante y fue tratado como se describió en la sección anterior, antes de efectuar la electroforesis.

IV. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE COLAGENASA

- La actividad de colagenasa fue determinada de acuerdo al método de Johnson-Wint (86). Se adicionaron 20 μ l de colágena radioactiva a pozos de plástico, se dejaron evaporar y se lavaron con agua destilada varias veces con el objeto de eliminar colágena no adherida.
- Los sobrenadantes obtenidos de las muestras de ensayos de cooperatividad entre fibroblastos, macrófagos y CB2 (a diferentes concentraciones) se dializaron y liofilizaron. Posteriormente las muestras se disolvieron en 200 μ l de amortiguador Tris-HCl pH = 7.4 y se dividieron en dos alícuotas de 100 μ l para tratarse de la siguiente manera:

A. Muestras Activadas.

A los 100 μ l de cada muestra se adicionaron 20 μ l de tripsina y se incubaron a 37 °C/10 minutos, después se adicionaron 20 μ l de inhibidor de tripsina de soya y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Se tomaron alícuotas de 100 μ l y se adicionaron 100 μ l de amortiguador Tris-HCl pH = 7.4 para con ello obtener un volumen final de 200 μ l.

B. Muestras No Activadas

A los otros 100 μ l restantes de cada muestra se les adicionaron 100 μ l de amortiguador Tris-HCl pH = 7.4 para obtener un volumen final de 200 μ l.

- Ambas muestras (activadas y no activadas) fueron colocadas en los pozos con colágena radioactiva e incubadas a 37°C/ 24 horas. Se alicuotaron 150 µl de cada muestra en viales y se adicionaron 10 ml de solución de Bray (líquido de centelleo), se mezclaron y se determinó la radiactividad con un contador de centelleo líquido.

- Preparación de Soluciones:

a) Solución Amortiguadora Tris-HCl pH = 7.4

- NaCl 0.2 M
- Tris-HCl 50 mM pH = 7.4
- Ca Cl₂ = 1 mM
- Volumen final 250 ml

b) Solución de Bray

- 60 g de Naftaleno
- 4 g de PPO
- 100 ml de Metanol
- 20 ml de Etilenglicol
- Se lleva a volumen final de 1 000 ml con Dioxano.

V. MEDICION DE LA MIGRACION "ESPONTANEA" DE CELULAS
MONONUCLEARES EN PRESENCIA DE CBZ.

Para llevar a cabo la medición de este parámetro fue necesario hacer modificaciones a la técnica de Clausen (87), que consistieron en:

- Se trabajó con placas bifásicas de agarosa de las cuales una de ellas, la de mayor concentración con 0.5% de agarosa, fue utilizada como soporte de las células para evitar su adherencia al vidrio, y la segunda capa con una concentración de 0.3% de agarosa permitió la movilidad de las células por presentar ésta una menor consistencia.

Solidificadas las placas de agarosa se procedió a hacer en la fase superior pozos de 4 mm de diámetro con un perforador estéril.

En dichos pozos se colocaron 100 000 células en medio D-MEM y con SFB al 10% y las placas fueron incubadas a 37°C con atmósfera parcial de 5% de CO₂, durante 72 hrs.

Transcurrida la incubación se procedió a medir la migración con ayuda de un micrómetro.

-Preparación de las placas de Agarosa.

a) Fase Inferior (Agarosa al 0,5%),

Caja Petri N°	Agarosa	Medio D-MEM 10 % de SFB	Medio D-MEM con CBZ	Equivalente a:
1	0.6 ml	1.4 ml	0 µl	0 µg CBZ
2	0.6 ml	1.3 ml	100 µl	5 µg CBZ
3	0.6 ml	1.2 ml	200 µl	10 µg CBZ
4	0.6 ml	1.1 ml	300 µl	15 µg CBZ
5	0.6 ml	1.0 ml	400 µl	20 µg CBZ
6	0.6 ml	0.9 ml	500 µl	25 µg CBZ
7	0.6 ml	0.8 ml	600 µl	30 µg CBZ
8	0.6 ml	0.6 ml	800 µl	40 µg CBZ

b) Fase Superior (Agarosa al 0,3 %)

Caja Petri N°	Agarosa	Medio D-MEM 10 % de SFB	Medio D-MEM con CBZ	Equivalente a:
1	0.2 ml	1.80 ml	0 µl	0 µg CBZ
2	0.2 ml	1.75 ml	50 µl	5 µg CBZ
3	0.2 ml	1.70 ml	100 µl	10 µg CBZ
4	0.2 ml	1.65 ml	150 µl	15 µg CBZ
5	0.2 ml	1.60 ml	200 µl	20 µg CBZ
6	0.2 ml	1.55 ml	250 µl	25 µg CBZ
7	0.2 ml	1.50 ml	300 µl	30 µg CBZ
8	0.2 ml	1.40 ml	400 µl	40 µg CBZ

Ambas fases presentaron un volumen final de 2 ml. (88).

VI. CUANTIFICACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE LOS MACROFAGOS.

-Sobre portaobjetos estériles, se colocaron macrófagos de la línea celular J 774.1 y se incubaron durante una hora para lograr su adherencia al vidrio, transcurrida la incubación se lavaron los portaobjetos con el fin de eliminar los macrófagos no adheridos, e inmediatamente se adicionaron los reactivos de acuerdo al siguiente esquema:

No. laminilla	Partículas de Látex	Medio D-MEM 10% de SFB	Medio D-MEM con CBZ	Equivalente a:
1	5 $\mu\ell$	990 $\mu\ell$	0 $\mu\ell$	0 μg CBZ
2	5 $\mu\ell$	940 $\mu\ell$	50 $\mu\ell$	5 μg CBZ
3	5 $\mu\ell$	890 $\mu\ell$	100 $\mu\ell$	10 μg CBZ
4	5 $\mu\ell$	840 $\mu\ell$	150 $\mu\ell$	15 μg CBZ
5	5 $\mu\ell$	790 $\mu\ell$	200 $\mu\ell$	20 μg CBZ
6	5 $\mu\ell$	740 $\mu\ell$	250 $\mu\ell$	25 μg CBZ
7	5 $\mu\ell$	690 $\mu\ell$	300 $\mu\ell$	30 μg CBZ
8	5 $\mu\ell$	590 $\mu\ell$	400 $\mu\ell$	40 μg CBZ

Se incubó por dos horas a 37°C, después se procedió a lavar con solución salina y se fijaron al calor para ser teñidas por medio de la tinción de May Grünwald Giemsa, se dejaron secar las laminillas y se observaron al microscopio.

-Tinción de May Grünwald Giemsa.

- a) Las laminillas ya fijadas al calor, se cubren con colorante de May Grünwald por 25 minutos.

- b) Se lava el colorante con agua destilada neutra.
- c) Se cubre la laminilla con colorante de Giemsa más agua destilada neutra por 45 minutos. (Giemsa se diluye 1.10 con agua neutra).
- d) Se lava con agua destilada neutra, se deja secar y se observan al microscopio.

RESULTADOS

Inicialmente y de acuerdo con los objetivos planteados, en el presente trabajo se implementó la metodología para efectuar la cuantificación de la capacidad fagocítica de las células mononucleares utilizando eritrocitos de carnero y diferentes concentraciones de CBZ (0 - 40 μg /ensayo). Durante el desarrollo de los ensayos no fue posible realizar las determinaciones de fagocitosis con eritrocitos de carnero. Sin embargo, se observaron cambios morfológicos en las entidades celulares utilizadas, como fueron un aumento real en el tamaño de las células y la presencia de vacuolas secretoras, sugiriendo estos cambios observados una aparente "activación" celular.

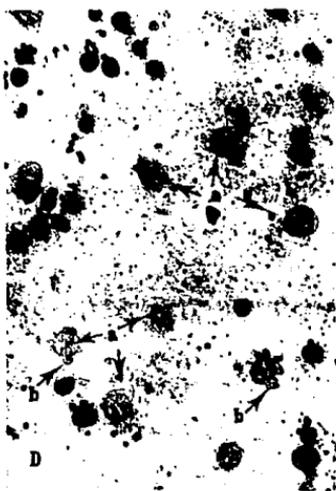
Como se muestra en las siguientes fotografías (Figura 2) a medida que aumenta la concentración de CBZ el estado de "activación" aparente también aumenta; habiéndose encontrado que a la concentración de 20 μg de CBZ la activación celular fue total. Además se observó un efecto tóxico para las células a la concentración de 40 μg de CBZ.

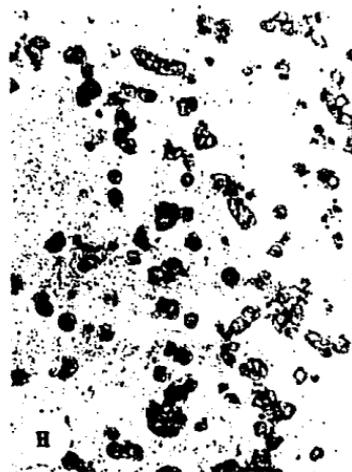
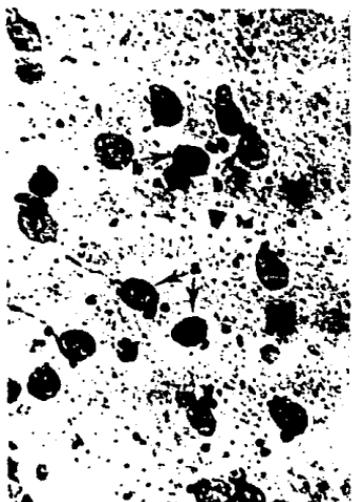
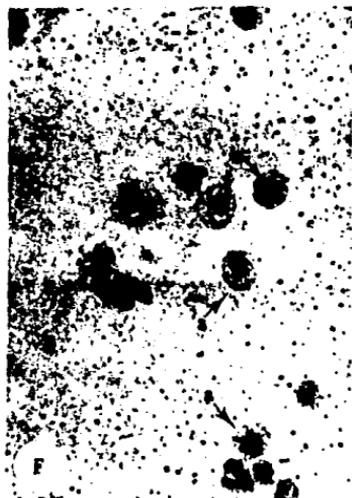
DETERMINACION DE ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS CELULARES.

Debido a la observación de una "activación" aparente de las entidades celulares utilizadas y con el objeto de determinar que sucedería al prolongar el tiempo de incubación se

FIGURA 2. "ACTIVACION" APARENTE DE CELULAS MONO-
NUCLEARES ESTIMULADAS CON CBZ. MICROSCO-
PIA DE LUZ. 40.X. TINCION DE GIEMSA.

A) 0 μ g CBZ, control , B) 5 μ g CBZ ,
C) 10 μ g CBZ , D) 15 μ g CBZ , E) 20 μ g -
CBZ , F) 25 μ g CBZ , G) 30 μ g CBZ ,
H) 40 μ g CBZ. OBSERVACION DE CAMBIOS MOR-
FOLOGICOS : a) AUMENTO EN EL TAMAÑO CELU-
LAR , b) PRESENCIA DE VACUOLAS SECRETORAS,
c) ADHERENCIA DE ERITROCITOS DE CARNERO A
LA SUPERFICIE DE LA MEMBRANA CELULAR.





mantuvieron los cultivos por períodos de 72 a 96 hrs. Se observó que las vacuolas presentes eran exocitadas (Figura 3).

Lo anterior nos hizo suponer que estas células podrían liberar una serie de sustancias con diferentes actividades biológicas, y entre las cuales pudiera estar implicada la producción y/o liberación de actividad colagenolítica. Por lo que se procedió a probar la actividad de colagenasa en los sobrenadantes obtenidos de las diferentes entidades celulares.

1) SOBRENADANTE DE CELULAS MONONUCLEARES ESTIMULADAS CON CBZ.

Una vez incubadas las células mononucleares con CBZ a diferentes concentraciones, se aislaron los sobrenadantes y se trataron como se describe en la sección de Métodos. Posteriormente se incubaron con colágena radiactiva y se tomaron alícuotas apropiadas para llevar a cabo la electroforesis y autorradiografías correspondientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4(A y B)

Figura 4.A En esta autorradiografía se presentan las muestras de colágena radiactiva incubadas con sobrenadantes de CBZ a diferentes concentraciones (carriles 3 a 10) en presencia de EDTA. La acción del EDTA es inhibir a la colagenasa que es una metaloenzima que requiere iones calcio y el EDTA actúa como quelante de este ión. El objetivo de este experimento fue determinar si el CBZ inducía la liberación de actividades proteolíticas no



FIGURA 3. EXOCITOSIS DE VACUOLAS
CELULAS MONONUCLEARES EN ESTADO DE "ACTIVACION"
APARENTE ; INCUBADAS DE 72 A 96 Hrs., A 37°C Y
ATMOSFERA PARCIAL DE 5% DE CO₂ .

asociadas con colagenasa y estimar la degradación de colágena atribuible únicamente a colagenasa. En el carril 1, se muestra un control negativo que consiste en la incubación de colágena con tripsina; en el carril 2, se muestra un control positivo que consiste en colágena incubada con colagenasa sin EDTA.

Los resultados obtenidos al analizar los patrones de los carriles 3 a 10 muestran que no existe degradación de las bandas de colágena atribuible a actividades proteolíticas no asociadas con colagenasa.

Figura 4.B Para comprobar la presencia de actividad colagenolítica de los sobrenadantes, se presentan las muestras de colágena radiactiva incubadas con sobrenadantes de células tratadas con CBZ a diferentes concentraciones (carriles 3 a 10) sin EDTA. En el carril 1, se muestra un control negativo que consiste en colágena incubada con colagenasa bacteriana más EDTA (inhibidor específico de colagenasa); en el segundo carril, se presenta un control positivo que consiste de colágena incubada con colagenasa sin EDTA. Como puede observarse no se apreció degradación de colágena en el carril 1 (control negativo), mientras que en el segundo carril (control positivo) se visualizó una degradación total de colágena. De los carriles 3 a 10, no se determinó degradación de la colágena radiactiva por actividad colagenolítica que pudiese estar presente en los sobrenadantes de las células cultivadas con diferentes concentraciones de CBZ.

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE SOBRENADANTES DE CELULAS
MONONUCLEARES ESTIMULADAS CON CBZ .



FIGURA 4.A CON EDTA.

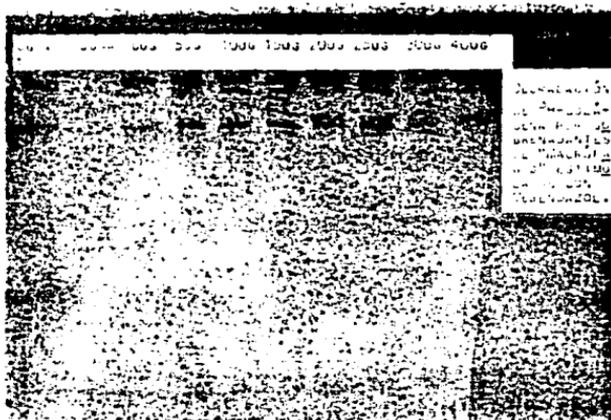


FIGURA 4.B SIN EDTA.

2) SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS ESTIMULADOS CON CBZ

Para la realización de este experimento se obtuvieron los sobrenadantes de los fibroblastos con CBZ a diferentes concentraciones, para llevar a cabo su incubación con el sustrato (colágena radiactiva) y con ello hacer su electroforesis y autoradiografías correspondientes, como se presenta en la figura 5 (A y B).

Figura 5.A En la autoradiografía se presentan las muestras de colágena radiactiva incubadas con sobrenadante de fibroblastos estimulados con CBZ a diferentes concentraciones (carriles 2 a 8) en presencia de EDTA. Como puede observarse en la autoradiografía, la presencia de las bandas de colágena que no sufrieron degradación fue constante a todas las concentraciones de CBZ ensayadas. El carril 1, muestra el sobrenadante de fibroblastos sin CBZ y con adición de EDTA, incubados con colágena radiactiva, (control basal) el cuál no presenta degradación y descarta actividades proteolíticas no asociadas con colágena sa.

Figura 5.B' En esta autoradiografía se muestra un experimento simultáneo de los sobrenadantes de fibroblastos con CBZ a diferentes concentraciones, incubados con colágena radiactiva sin EDTA. En los carriles 1 a 6 no se observó degradación apreciable de colágena. Sin embargo, los carriles 7 y 8 correspondientes a las concentraciones de 30 μ g y 40 μ g de CBZ, sí muestran

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE SOBRENADANTES DE
FIBROBLASTOS ESTIMULADOS CON CBZ .

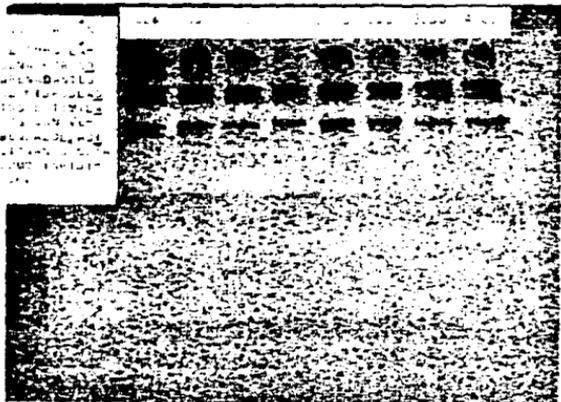


FIGURA 5.A CON EDTA.

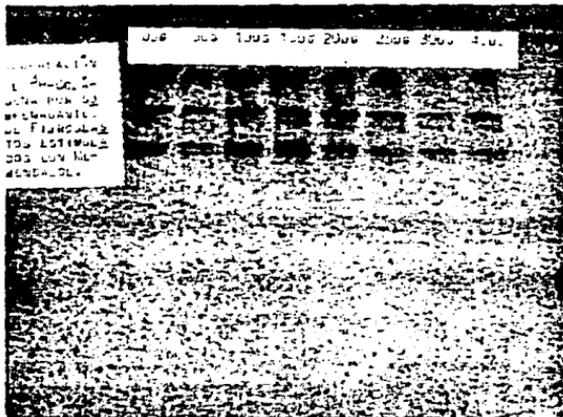


FIGURA 5.B SIN EDTA.

degradación de colágena radiactiva observable por disminución de la intensidad y del grosor de las bandas. Comprobándose con esto que la degradación presente en estos carriles se debió únicamente a colagenasa y no a actividad proteolítica no dependiente de calcio.

3) COOPERATIVIDAD ENTRE AMBAS ENTIDADES CELULARES

Al llevar a cabo la estimulación de células mononucleares con CBZ y no observar producción de actividad colagenolítica, así como realizar un experimento similar pero con fibroblastos y en este caso observar actividad colagenolítica a las concentraciones de 30 μg y 40 μg de CBZ; se planteó llevar a cabo un tercer ensayo en el cual se implicó la cooperatividad de ambas entidades celulares estimuladas con CBZ. Se ha reportado que existen entidades celulares que al recibir un estímulo presentan poca o nula actividad biológica o bien ésta se incrementa. Con este objeto se obtuvieron sobrenadantes de células mononucleares estimuladas con CBZ como se describió en Resultados 1) y se adicionaron a cultivos de fibroblastos en confluencia y se incubaron como se describió en la sección de Métodos. Posteriormente las muestras se trataron para su electroforesis y posterior autoradiografía. Los resultados obtenidos se muestran en las figura 6(A y B).

Figura 6.A En esta autoradiografía se presentan las muestras

de colágena radiactiva incubadas con los sobrenadantes de las entidades celulares utilizadas (fibroblastos y macrófagos) con CBZ a diferentes concentraciones y EDTA como inhibidor, correspondientes a los carriles 3 a 10. El carril 1, muestra un control negativo que contiene colágena con tripsina. El carril 2, es un control positivo que consiste en la incubación de colágena con colagenasa y sin EDTA. De los carriles 3 a 10, no se observó degradación de las bandas de colágena atribuible a actividad proteolítica no asociada con colagenasa.

Figura 6.B En esta autoradiografía al igual que en los experimentos anteriores, se realizó otro simultáneo pero sin adición de EDTA a las muestras de los sobrenadantes de las entidades celulares utilizadas (fibroblastos y macrófagos) con CBZ a diferentes concentraciones e incubadas con colágena radiactiva. El carril 1, corresponde al control positivo que consiste de colágena radiactiva incubada con colagenasa y sin EDTA, en donde se visualiza una degradación total de colágena. Al analizar los resultados obtenidos de los carriles 2 a 9, se observa una disminución gradual en el grosor de las bandas de colágena, - - siendo esta degradación total para los carriles correspondientes a 30 μ g y 40 μ g de CBZ. Esto se comprueba por la presencia de polipéptidos de peso molecular bajo, productos de la degradación de la colágena radiactiva, localizados en la parte inferior de la autoradiografía.

Los resultados obtenidos en estos experimentos demues-

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE LA COOPERATIVIDAD
ENTRE AMBAS ENTIDADES CELULARES ESTIMULADAS CON CBZ.

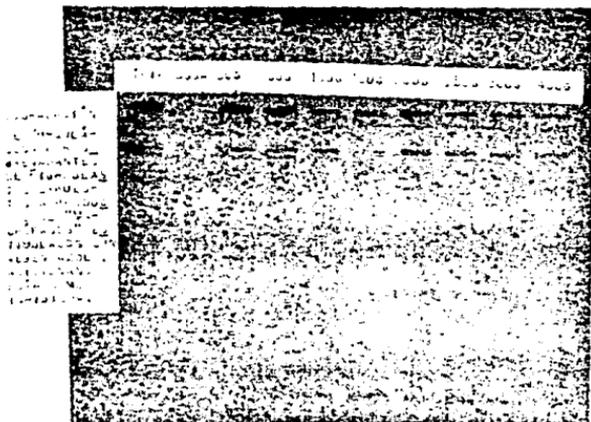


FIGURA 6.A CON EDTA.

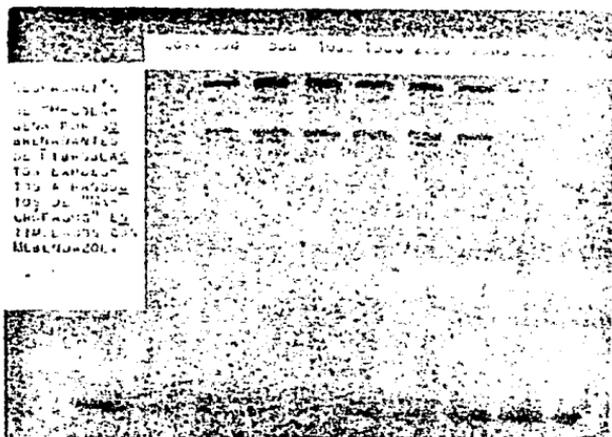


FIGURA 6.B SIN EDTA.

tran que el CBZ induce la liberación de cierto (s) factor (es) que a su vez estimulan la producción y secreción de actividad colagenolítica en cultivos de fibroblastos este estímulo es concentración dependiente y superior a las actividades colagenolíticas determinadas en los cultivos de fibroblastos con CBZ.

CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE COLAGENASA

Para la cuantificación de colagenasa en los experimentos de cooperatividad celular, se tomaron alícuotas apropiadas de los sobrenadantes, se procesaron como se describió en la Sección de Métodos y los resultados obtenidos se presentan en la tabla IV.

Como se observa en los valores promedio de las muestras sin EDTA, a medida que aumenta la concentración de CBZ aumenta también la actividad colagenolítica. La presencia de esta actividad en nuestras muestras se comprobó por medio del experimento hecho simultáneamente con adición de EDTA como inhibidor para descartar la actividad proteolítica de otras enzimas no dependientes de Ca^{++} , observando que la cuantificación promedio se mantuvo constante para las concentraciones de CBZ utilizadas. Los resultados cuantitativos obtenidos en este ensayo, corroboraron lo observado en el experimento realizado

TABLA IV. VALORES PROMEDIO DE LA CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE COLAGENASA.

<u>CONTROLES</u>		<u>\bar{X} (cpm)</u>
Sol. Amortiguadora		318.5
Sol. Amortiguadora + EDTA		249.0
Sol. Amortiguadora + Colagenasa		7777.0
Sol. Amortiguadora + Colagenasa + EDTA		597.0

<u>MUESTRAS</u>	<u>\bar{X} (cpm)</u>	
	<u>SIN EDTA</u>	<u>CON EDTA</u>
<u>(Concentración)</u>		
0 μ g CBZ	1144.0	286.0
5 μ g CBZ	781.0	203.0
10 μ g CBZ	608.0	445.0
15 μ g CBZ	920.0	708.0
20 μ g CBZ	907.0	1000.0
25 μ g CBZ	960.0	774.0
30 μ g CBZ	1442.0	1050.0
40 μ g CBZ	1180.0	760.0

mediante autorradiografías para la determinación de actividad colagenolítica entre la cooperatividad celular de macrófagos y fibroblastos estimulados con CBZ a diferentes concentraciones. No obstante se observa una actividad relativamente baja, esto puede deberse a que en el ensayo cuantitativo, se forman fibras de colágena polimerizada, la cual representa un sustrato más resistente y de menor accesibilidad que la colágena soluble utilizada para el experimento por autorradiografía (89). Demostrando con esto que el CBZ induce la liberación de factor (es) que a su vez estimulan la producción y secreción de actividad colagenolítica en cultivos de fibroblastos, siendo además este estímulo concentración-dependiente.

MEDICION DE LA MIGRACION ESPONTANEA DE CELULAS MONONUCLEARES EN PRESENCIA DE CBZ.

La estimación de la migración espontánea fue realizada en placas de agarosa, en las cuales se visualizó y cuantificó la movilidad de las entidades celulares estimuladas con CBZ a diferentes concentraciones.

En las siguientes fotografías se observa que la movilidad celular disminuye a medida que la concentración de CBZ aumenta (Figura 7). Esto se comprobó mediante la medición del desplazamiento celular, considerado a partir del borde del pozo (origen) hasta la migración determinada al término del perfo

FIGURA 7. MIGRACION ESPONTANEA DE CELULAS MONONUCLEARES EN PRESENCIA DE CBZ. MICROSCOPIA DE LUZ. 6.3.X .

**A) 0 μ g CBZ, Control , B) 5 μ g CBZ , C) 10 μ g CBZ , D) 15 μ g CBZ , E) 20 μ g CBZ , F) 25 μ g CBZ , G) 30 μ g CBZ , H) 40 μ g CBZ.
a) BORDE DEL POZO (ORIGEN) , b) MIGRACION CELULAR RECORRIDA.**

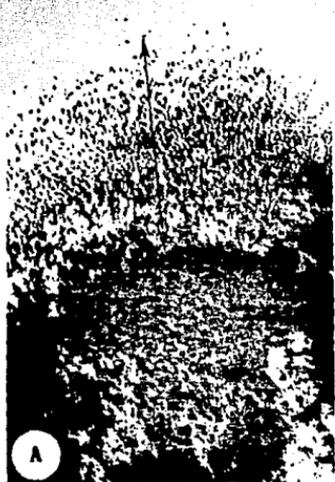




TABLA V. MIGRACION "ESPONTANEA" DE MONOCITOS EN GELES DE AGAROSA

<u>EXP. I</u>		<u>EXP. II</u>	
<u>MEBENDAZOL</u>	<u>(μg)</u>	<u>DESPLAZAMIENTO</u>	<u>(μm)</u>
0	390 \pm 23	0
5	Mg	257 \pm 40	5
10	Mg	232 \pm 23	10
15	Mg	532 \pm 30	15
20	Mg	207 \pm 30	20
25	Mg	207 \pm 10	25
30	Mg	140 \pm 23	30
40	Mg	132 \pm 30	40
			340 \pm 38
			265 \pm 22
			140 \pm 23
			407 \pm 31
			140 \pm 30
			165 \pm 10
			90 \pm 11
			57.5 \pm 10

EXP. III

<u>MEBENDAZOL</u>	<u>(μg)</u>	<u>DESPLAZAMIENTO</u>	<u>(μm)</u>
0	925 \pm 137	
5	504 \pm 125	
10	546 \pm 99	
15	356 \pm 23	
20	175 \pm 52	
25	232 \pm 64	
30	219 \pm 56	
40	150 \pm 50	

Cada resultado representa el promedio de los datos obtenidos en tres experimentos diferentes, cada concentración se ensayó por triplicado.

do de incubación (72 hrs.). Los valores obtenidos se muestran en la tabla V.

Los resultados representan en promedio:

Experimento I 66.15% de Inhibición Máxima

Experimento II 83.08% de Inhibición Máxima

Experimento III 83.78% de Inhibición Máxima

En la figura 7, puede observarse una disminución progresiva de la migración espontánea de las células mononucleares conforme se incrementa la concentración de CBZ en el ensayo.

Esta inhibición alcanza niveles máximos entre 30µg y 40µg de CBZ/ensayo, como puede observarse en la figura 7 (G y H), por otra parte la determinación cuantitativa de la inhibición de esta migración espontánea obtenida de 3 experimentos diferentes muestran que entre las concentraciones de 20µg y 25µg de CBZ la inhibición alcanzó valores de 62.27% y 56.78% respectivamente considerando que a estas concentraciones las células se encuentran funcional y morfológicamente viables.

CUANTIFICACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA.

Con el fin de cuantificar la capacidad fagocítica, se llevó a cabo la ingesta de partículas de látex en macrófagos de la línea celular J 774.1 estimulados con CBZ a diferentes concentraciones. Se observó que a medida que aumentaba la concentra

ción de CBZ se incrementaba la capacidad fagocítica. Sin embargo, se determinó que a la concentración de 20µg de CBZ se alcanza un máximo y que a concentraciones mayores, la capacidad fagocítica disminuye ligeramente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI, así como los Histogramas de Frecuencia obtenidos para las concentraciones de 10, 20 y 30µg de CBZ, así como para los controles correspondientes, ver Figura 8 (A, B, C y D).

El análisis estadístico de la cuantificación de la capacidad fagocítica mostrado en los Histogramas de Frecuencia nos indican lo siguiente : Para el intervalo de frecuencia comprendido entre 0 a 10 se apreció un ligero aumento de la capacidad fagocítica para la concentración de 10 µg de CBZ, manteniéndose bajos para 20 µg, 30 µg de CBZ y el control. Para el intervalo de frecuencia entre 10 a 20, se observó un aumento del número de partículas fagocitadas a medida que aumentaba la concentración de CBZ utilizadas para este ensayo. Sin embargo, para la frecuencia comprendida entre 20 a 30, el número de partículas fagocitadas aumentó conforme aumentaba la concentración de CBZ, observándose un máximo a los 20 µg de CBZ, que disminuyó al incrementar la concentración del mismo.

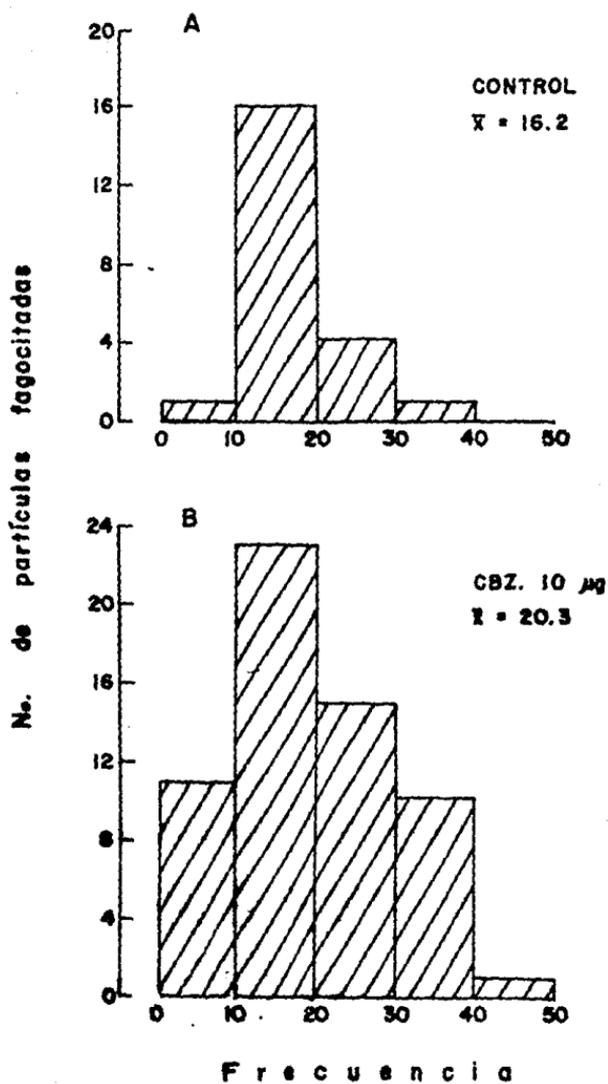
El mismo efecto se observó para el intervalo de frecuencia entre 30 a 40. Comprobándose con esto que la capacidad fagocítica de las entidades celulares utilizadas fue concentración dependiente del estímulo recibido (CBZ).

TABLA VI. CUANTIFICACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA

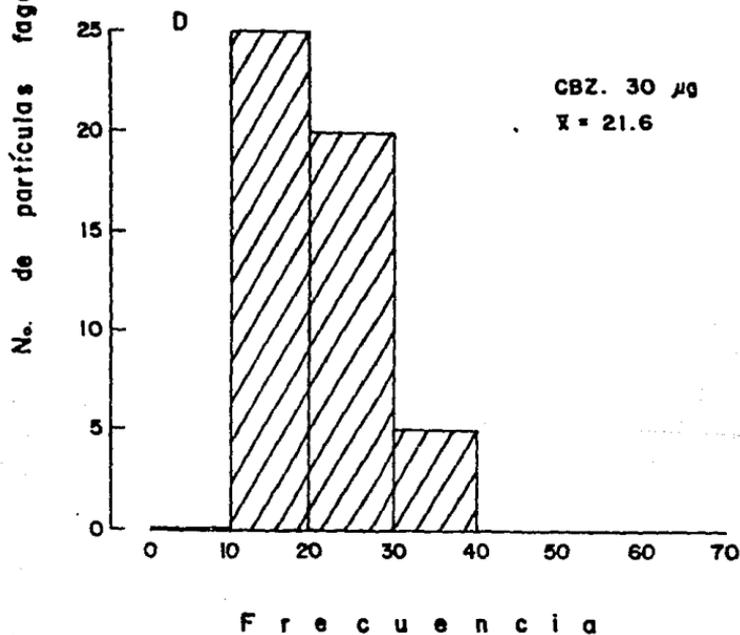
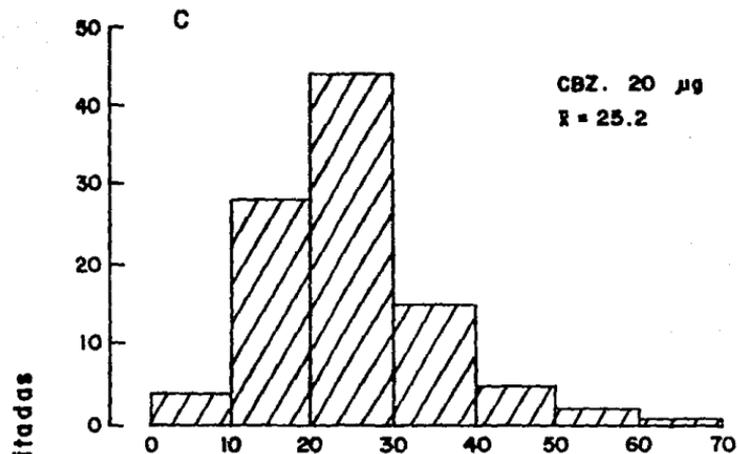
<u>CONCENTRACION DE</u> CBZ	<u>\bar{X} DE PARTICULAS DE</u> LATEX INGERIDAS
0 μg	16.20
10 μg	20.35
15 μg	19.88
20 μg	25.27
25 μg	22.00
30 μg	21.68

Cada resultado representa el promedio de los datos obtenidos en la lectura de 100 células, cada concentración se hizo por duplicado.

FAGOCITOSIS



F A G O C I T O S I S



DISCUSION

Los derivados de imidazol han sido desarrollados recientemente como potentes agentes antiparasitarios, antineoplásicos, antimicóticos, inmunomoduladores, etc y la mayoría de ellos muestran efectos sobre la respuesta inmune en humanos y animales. Sin embargo, se ha reportado que los efectos observados pueden ser completamente opuestos de un derivado a otro. Perteneciendo el mebendazol a esta familia y siendo utilizado como un antihelmíntico de amplio espectro, así como el compartir junto con otros derivados del benzimidazol la habilidad para unirse a tubulina y así inhibir el ensamble de los microtúbulos (Hoebcke et al, 1976; Friedman and Platzer, 1978; Ireland et al, 1979). Se han realizado estudios para evaluar al mebendazol como un fármaco alternativo en el tratamiento de la cirrosis hepática, en un modelo experimental en ratas inducida con tetracloruro de carbono (92). Sabiendo que la colágena requiere de un sistema microtubular para su movimiento transcelular, se postuló que el mebendazol podría interferir con su secreción y posterior depósito en el parénquima hepático. Los resultados obtenidos demuestran una inhibición de la secreción y depósito de fibras de colágena en el hígado, observándose también que su administración crónica produce: aumento en el número de células mononucleares en el hígado y desaparición de los tabiques fibrosos de la cirrosis moderada y mejoría y adelgazamiento de estos tabiques en la cirrosis avanzada (24). Aunado a esto, se

ha observado que la absorción intestinal del mebendazol es variable aunque se ha demostrado que es pobre en humanos y ratas y la cantidad de éste y sus metabolitos excretados por vía urinaria depende de la especie que se trate

Por lo que en base a las características que presenta el CBZ, se ha considerado su uso como una alternativa en el tratamiento de enfermedades que impliquen procesos fibrosantes y entre los cuales se encuentra la cirrosis hepática. Con este objeto se determinó el efecto del CBZ en un modelo experimental de cirrosis en ratas inducida con tetracloruro de carbono, con el propósito de realizar una serie de determinaciones bioquímicas e histológicas que pudiesen dar una posible explicación de la recuperación del daño presente en esta enfermedad, observándose una disminución en el depósito de colágena así como un aumento en la reabsorción de las fibras de colágena presentes en el daño al hígado. Por lo que en el presente trabajo se planteó estudiar la interacción del CBZ con entidades celulares que están implicadas en esta patología entre las cuales se encuentran las células mononucleares, las células endoteliales, células NK, fibroblastos, etc.

Se trabajó con las células mononucleares por ser entidades que se encuentran en gran número en los procesos inflamatorios así como el presentar la capacidad de mostrar un estado de activación, el cual puede ser inducido por la acción de un estímulo y mediante el que se favorece su actividad secretora biológica lo que puede resultar en un aumento en la

producción de colagenasa u otros mediadores (Interleucina-1, Prostaglandina E_2 , etc). Estas moléculas pueden a su vez actuar sobre otros tipos celulares como sería en este caso los fibroblastos (además, que se han reportado acciones a muy diversos niveles como en los condrocitos, células sinoviales, células del sistema nervioso, etc), induciendo respuestas tales como una mayor actividad metabólica, síntesis y liberación de enzimas, proliferación celular y síntesis de otros productos celulares.

Por otra parte el estímulo del fármaco sobre las células mononucleares también podría disminuir la liberación de otros metabolitos como la prostaglandina E_2 , la cual se ha demostrado que posee algunos efectos antagónicos a la actividad de la interleucina-1, de modo que al disminuir la actividad del primer mediador se incrementa la del segundo. También se ha demostrado que los pacientes con cirrosis hepática o con hepatocarcinoma presentan actividades bajas de interleucina-1, debido a un incremento de la prostaglandina E_2 cuando son comparados con los valores de individuos normales (90).

Ninguna de estas dos posibilidades se descarta con los datos presentados, e incluso debido a las actividades de las monocinas sobre otras estirpes celulares el fenómeno puede ser mucho más complejo "in vivo".

Se debe recalcar que a pesar de desconocer el mecanismo íntimo de acción del CBZ sobre los macrófagos, los datos obtenidos demuestran que "in vitro" el equilibrio entre sustan

cias que podrían inducir una mayor liberación de colagenasa por los fibroblastos y aquellas que lo disminuyen es favorable a las primeras por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes parámetros estudiados, éstos nos sugieren lo siguiente :

1. Existe un efecto del mebendazol sobre células mononucleares.
2. Se presenta un aumento de la actividad colagenolítica, mediada por la acción del CBZ en los sobrenadantes de cultivos celulares.
3. El CBZ disminuye el desplazamiento celular a medida que la concentración de éste aumenta.
4. La capacidad fagocítica se incrementa proporcionalmente a la concentración del CBZ.

1. EXISTE UN EFECTO DEL CBZ SOBRE CELULAS MONONUCLEARES.

Se ha sabido desde hace varias décadas que los macrófagos provenientes de animales infectados con ciertos patógenos intracelulares difieren morfológica y metabólicamente de los macrófagos normales. Los macrófagos de dichos animales (llamados macrófagos activados) pueden inhibir la multiplicación de ciertos organismos intracelulares, lo cual no pueden hacer los macrófagos normales. En los últimos años, se han explorado los mecanismos de activación y las múltiples capacidades funcionales de los macrófagos activados.

Los macrófagos pueden activarse mediante la exposición a ciertas linfoquinas secretadas por los linfocitos T sensibilizados. Algunos compuestos como las endotoxinas bacterianas y el factor estimulante de las colonias de los macrófagos actúan directamente, mientras que otros agentes como Corynebacterium parvum activa de manera directa a los macrófagos actuando sobre ellos y en forma indirecta, induciendo a los linfocitos T a que liberen el factor activador de los macrófagos. Algunas de las propiedades de los macrófagos activados difieren de las propiedades de los macrófagos normales como las que se muestran en la Tabla II. Los macrófagos activados son de mayor tamaño y son más adherentes al vidrio, diseminándose más sobre el mismo que los macrófagos normales.

Además, la migración aleatoria está notoriamente aumentada. Los macrófagos activados tienen un metabolismo alterado, así como un mayor número de lisosomas que contienen enzimas hidrolíticas (46).

Por lo que se refiere a el efecto del CBZ sobre células mononucleares, se observaron cambios morfológicos como fue el aumento real en el tamaño celular, así como la presencia de vacuolas. Ambas características pertenecen entre muchas otras a un estado de activación celular que coincide con los estudios realizados por Mackaness (46), quien observó que células mononucleares que recibían estímulos inflamatorios no microbianos, presentaban una serie de actividades que en condiciones normales no desarrollan o bien su capacidad fagocítica

ca se incrementaba. Por lo que al observar esta aparente acti vación de nuestras entidades celulares al recibir el estímulo con CBZ, que entre algunas de sus características presentaban un gran número de vacuolas secretoras (Fig. 3), se decidió estudiar si la exocitosis de las vacuolas presentes liberaban una serie de actividades enzimáticas y si entre ellas pudiera estar implicada la producción de colagenasa, enzima necesaria para la degradación de colágena.

2. SE PRESENTA UN AUMENTO DE LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA , MEDIADA POR LA ACCION DEL CBZ SOBRE CELULAS MONONUCLEARES.

Con la demostración de este estado de activación de las células mononucleares, se procedió a ensayar los sobrenadantes de los cultivos celulares estimulados con mebendazol, observándose que los sobrenadantes de células mononucleares estimulados con CBZ, no presentaron ningún tipo de activación proteolítica nó asociada con colagenasa y esto se puede obse rv ar en las autorradiografías correspondientes para este ensayo mostradas en la Sección de Resultados (Figuras 4A. y 4B).

Sabiendo que entidades celulares que reciben estímulos no bacterianos producen una serie de actividades que se encuentran en función tanto de las células como del estímulo, se trabajó con cultivos de fibroblastos de la línea preestablecida en el laboratorio y se estimularon con CBZ, observándose en este caso degradación de colágena radiactiva a concentraciones de 30 μ g y 40 μ g de CBZ producida por actividad proteo-

lítica asociada a colagenasa, como se demostró también en las autorradiografías correspondientes en la Sección de Resultados (Figuras 5A. y 5B).

Considerando que al trabajar las líneas celulares por separado se demostró actividad colagenolítica en los cultivos de fibroblastos y no en los cultivos de células mononucleares; y existiendo en la literatura reportes, que entidades celulares que reciben un estímulo no producen una actividad biológica y que al estar en contacto con otra entidad celular se presenta entre ellas una cooperatividad para incrementar actividades enzimáticas específicas, se procedió a realizar experimentos de cooperatividad entre nuestras entidades celulares estimuladas con CBZ. Se observó que la producción de actividad colagenolítica que en un principio se demostró en el cultivo de fibroblastos a concentraciones de 30 μg y 40 μg de CBZ, ahora al interactuar con sobrenadantes de células mononucleares activadas con CBZ la degradación de colágena fue detectada a concentraciones menores y total para las concentraciones ensayadas, determinada por la disminución de la intensidad y del grosor de las bandas de colágena radiactiva (Figuras 6A y 6B). Probándose con esto que el CBZ estimuló una mayor producción de actividad colagenolítica en los fibroblastos cuando se incubaron en presencia de sobrenadantes de células mononucleares, demostrando con esto que existe una cooperatividad entre ambas entidades celulares.

3. EL CBZ DISMINUYE EL DESPLAZAMIENTO CELULAR A MEDIDA QUE LA CONCENTRACION DE ESTE AUMENTA.

Estudios realizados con CBZ, demostraron que éste se une a las subunidades de tubulina, impidiendo con ello la polimerización de los microtúbulos (67), y también se sabe que la secreción de la colágena se lleva a cabo a través del complejo de Golgi y depende del funcionamiento adecuado del sistema microtubular constituido por la polimerización de dímeros de tubulina asimétricos (91). Siendo en sistema microtubular el que 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, entre otras funciones se procedió a estudiar el efecto del CBZ sobre la movilidad de cultivos de células mononucleares.

Se midió el desplazamiento de células mononucleares estimuladas con CBZ, observándose una disminución de la movilidad celular a medida que la concentración de CBZ aumentaba, comprobándose con esto que el CBZ inhibe la formación de microtúbulos impidiendo con esto la migración espontánea de las entidades celulares utilizadas, y esto se muestra en las figuras y valores cuantitativos de la Sección de Resultados (Figuras 7 y Tabla V).

4. LA CAPACIDAD FAGOCITICA SE INCREMENTA PROPORCIONALMENTE A LA CONCENTRACION DEL CBZ.

Como se mencionó anteriormente el CBZ estimuló a las

células mononucleares a presentar un estado de activación como fueron cambios morfológicos, presencia de vacuolas y producción de actividad colagenolítica mediada por la cooperatividad de células mononucleares y fibroblastos. Teniendo como antecedentes estas características y perteneciendo entre otras a las que presentan los macrófagos activados y que se muestran en la Sección anterior, se cuantificó su capacidad fagocítica estimulada por CBZ mediante la ingesta de partículas de látex. Se determinó que a medida que aumentaba la concentración del estímulo la capacidad fagocítica también se incrementaba. Observándose una máxima capacidad fagocítica a 20 μ g de CBZ, y comprobándose con esto que el CBZ modifica la capacidad de las células mononucleares y estimula su actividad secretora (Tabla VI y Figura 8).

CONCLUSIONES

El mebendazol es un fármaco utilizado como antihelmíntico de amplio espectro, al que además se le han descrito una gran variedad de funciones celulares, como poseer una elevada actividad antimicrotubular, inducir la secreción de insulina, incrementar la producción de anticuerpos específicos en la respuesta inmune, etc, y ha sido probado como alternativa en el tratamiento de la cirrosis hepática experimental demostrándose un efecto sobre la reversión de la misma, lo cual implica una disminución de la cantidad de colágena neta depositada previamente durante el proceso fibroso de la enfermedad. Con base a lo anterior se hizo necesario el estudiar el efecto de esta sustancia sobre distintos tipos celulares para tratar de encontrar una posible explicación al mecanismo por el cual la colágena disminuye.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el mebendazol actúa sobre las células mononucleares y los fibroblastos de la siguiente manera :

- Induce un estado que morfológicamente es compatible con la "activación" de los macrófagos.
- Induce a que el macrófago produzca un factor que al actuar sobre los fibroblastos, incrementa en estos la liberación de actividad colagenolítica.
- Disminuye la movilidad espontánea de los macrófagos.
- Modifica la capacidad fagocítica de los macrófagos y aparentemente estimula su actividad secretora.

En base a los resultados obtenidos se concluye que el CBZ sí posee una acción sobre los macrófagos, algunas de estas acciones contribuyen a explicar la disminución de la colágena depositada en el modelo de cirrosis hepática experimental que se ha observado en estudios anteriores, no obstante que no se pudo determinar el mecanismo íntimo por medio del cual se induce una mayor actividad colagenolítica.

Los datos nos muestran claramente que a pesar de que el estímulo con CBZ podría propiciar la liberación de otras muchas actividades biológicas algunas de las cuales son antagónicas entre sí, el resultado neto final coincide con una mayor actividad colagenolítica y un ligero incremento en la capacidad fagocítica de los macrófagos, lo cual puede coadyuvar en el mecanismo de disminución de la colágena hepática que se ha descrito. Por otra parte la pérdida de movilidad de las células podría producir una mayor permanencia de éstas dentro del espacio hepático, lo cual podría ser benéfico o contraproducente dada la gran variedad de actividades que son capaces de realizar los macrófagos; pero nuevamente el resultado experimental "in vivo" hace pensar que el equilibrio se desplaza hacia un efecto benéfico. Por lo tanto consideramos que aún cuando se requieren estudios con mayor profundidad para dilucidar el mecanismo de acción del CBZ, éste es un buen candidato para ser considerado como una alternativa en el tratamiento de enfermedades que implique procesos fibrosantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Stanley, R.R.: Patología estructural y funcional. Ed. Interamericana. México, pp. 32-38, 980-996, 1975.
2. Allan, N.R.: Anatomía patológica, su relación con las causas, la patogenia y las manifestaciones clínicas de las enfermedades. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, 1944.
3. Rossie, R.: Classification des Cirrhoses Hépatiques. Ann. Anat. Pathol. 6, 1929.
4. Robbins, S.L.: Hígado y vías biliares en: Patología estructural y funcional. (Stanley, R.R. Ed) Ed. Interamericana. México, pp. 951-1019, 1975.
5. 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. España, 1979.
6. Bouerne, G.P.: Alcoholism, progress in research and treatment. Academic Press. U.S.A. 1973.
7. Lieber, C.S.: Alcohol and liver: 1984 Update. Hepatology. 4, 6: 1243-1260, 1984.
8. Feinman, L., Lieber, C.S.: Liver disease in alcoholism.: The biology of alcoholism. vol. 3 Clinical pathology of Kissin, B. and Begleiter, H. Plenum Press. U.S.A. 1974.
9. Feinman, L. and Lieber, C.S.: (Abstract) Stimulation of hepatic collagen formation by ethanol consumption. J. Clin. Invest. 50: 28a, 1971.

10. Steiner, P.E.: World problem in the cirrhotic diseases of the liver. Their incidence, frequency, types and aetiology. *Trop. Geogr. Med.* 16: 175, 1964.
11. Wilkinson, P., Santamaría, J.N. and Rankin, J.G.: Epidemiology of alcoholic cirrhosis. *Aust. Ann. Med.* 18:222, 1969.
12. Baraona, E. and Lieber, C.S.: Effects of alcohol on hepatic transport of proteins. *Ann. Rev. Med.* 33:281-292,1982.
13. Bertrand, L. and Michel, M.: La nécrose alcoolique du foie. *Rev. Prat.* 18: 2323, 1968.
14. Christoffersen, P. and Juhl, E.: Mallory bodies in liver biopsies with fatty changes but no cirrhosis. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 79: 201, 1971.
15. Christoffersen, P. and Poulsen, H.: Correlation of histologic features in two groups of liver biopsies with and the second without Mallory Bodies. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 79: 27, 1971.
16. Lindenbaum, J. and Lieber, C.S.: Alcohol-induced malabsorption of vitamin B₁₂ in man. *Nature.* 224: 806, 1969.
17. Chaimovitz, C., Szymlan, P., et al.: Mechanism of increased renal tubular sodium reabsorption in cirrhosis. *Amer. J. Med.* 52: 198, 1972.
18. Kissin, B. and Begleiter, H.: The biology of alcoholism. vol. 3. Clinical pathology. Plenum Press. U.S.A. 1974.
19. Blaisdell, F.W. and Cohen, R.: Cirrhosis of the liver, clinical course in 2,377 patients at the San Francisco

- General Hospital. Calif. Med. 94: 356, 1961.
20. Jabbari, M. and Leevy, C.M.: Protein anabolism and fatty liver of the alcoholic. Medicine. 46: 131, 1967.
 21. Mendenhall, C.L.: Anabolic steroid therapy as an adjunct to diet in alcoholic steatosis. Amer. J. Dig. Dis. 13: 783, 1968.
 22. Andersen, S.B., et al.: Effect of prednisone on the survival of patients with cirrhosis of the liver. Lancet. 1: 119, 1969.
 23. Porter, H.P., et al.: Corticosteroid therapy in severe alcoholic hepatitis. A double-blind drug trial. N. Engl. J. Med. 248: 1350, 1971.
 24. Díaz de León, L. y Santamaría, P.: La administración crónica de mebendazole y su aplicación en la cirrosis hepática experimental, en: Avances en el mecanismo de la acción de fármacos (Contreras, M.C., Cortinas de Nava, C. y Barragan, A.L., Eds); Masson Barcelona-México. pp. 27-33, 1984.
 25. Goldberg, B. and Rabinovitch, M.: Connective tissue, en: Histology (Weiss, L. and Greep, R.O., Eds); Mc. Graw-Hill. pp. 145-178, 1977.
 - 26.- Mecham, R.P.: Elastin biosynthesis: A look at the current scene. Conn. Tiss. Res. 8: 155-160, 1981.
 27. Sandberg, L.B., Soskel, M.T. and Leslie, J.G.: Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. N. Engl. J. Med. 304: 556-578, 1981.

28. Vaheri, A. and Alitalo, K.: Pericellular matrix glycoproteins in cell differentiation and in malignant transformation, en: Cellular controls in differentiation (Lloyd, C.W. and Res, D.A., Eds); Academic Press. U.S.A. pp. 11-28, 1981.
29. Woodhead-Galloway, J.: Collagen: The anatomy of a protein (Arnold, E., Ed), 1980.
30. Trelstad, R.L.: La colágena. Mundo Científico.; La Recherche. 1: 284-295, 1981.
31. Eyre, R.D.: Collagen. Molecular diversity in the Body's protein scaffold. vol. 207. Science. 21, 1980.
32. Bello, M.E.: Concentración y biosíntesis de proteínas totales y colagénicas en tejido gingival humano. Actividad colagenolítica en fluido crevicular gingival. Tesis para obtener la Maestría en Odontología. Fac. de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México. 1984.
33. Prockop, J.D., et al.: The biosynthesis of collagen and its disorders. N. Engl. J. Med. 301: 13-23, 77-85, 1979.
34. Prockop, J.D., et al.: Medical progress. Hereditary diseases of collagen. N. Engl. J. Med. 9: 376- 386, 1984.
35. Junqueira, L.C.V. and Montes, G.S.: Review. Biology of collagen-proteoglican interaction. Arch. Histol. Jap.
36. Brown, R.A., Shuttleworth, C.A. and Weiss, J.B.: Three new α chains of collagen from a nonbasement membrane source. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 866-873, 1978.

37. Martín, R.G., Rupert, T., et al.: The genetically distinct collagens. *TIBS*, July: 285-287, 1985.
38. Werb, Z. and Gordon, S.: Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142: 346-359, 1975.
39. Chvapil, M.: Experimental modifications of collagen synthesis and degradation and their therapeutic applications, en : *Collagen in health and disease*. 206-215, 1982.
40. Biswas Chitra. and Dayer, J.M.: Stimulation of collagenase production by collagen in mammalian cell cultures. *Cell*. 18: 1035-1041, 1979.
41. Mosier, D.E.: Separation of macrophages on plastic and glass surfaces. *Methods in Enzymology*. 108: 294-297, 1984.
42. Margni, R.A.: *Inmunología e Inmunquímica*. Ed. Panamericana. Argentina. 1980.
43. Elaine, K.G., Spencer, W.G. and Sheehy, P.A.: Enhanced activity of the macrophage-like cell line J 774.1 . Following exposure to gamma radiation. *J. Leuk. Biol.* 38: 369-381, 1985.
44. Nathan, F.C.: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326, 1987.
45. Bellanti, A.J.: *Immunology*. Ed. W.B. Saunders Company. México. 1971.
46. Hugh, H.F., et al.: *Inmunología básica y clínica*. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 136-141, 1983.

47. Keller, H.V., et al.: Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp. Cell. Res.* 153: 178-185, 1984.
48. Byard, E.H. and Guil, K.: Molecular and cellular aspects of the interaction of benzimidazole carbamate pesticides with microtubules, in : The cytoskeleton a target for toxic agents. Ed. Thomas, W.C., Polly, R., et al. Rochester on environmental toxicity Plenum Press. U.S.A. 1984.
49. Bernard, D.D., et al.: Tratado de Microbiología. Ed. Salvat. España. pp.483-485, 1978.
50. Immunological abnormalities in alcoholic liver disease. *The Lancet*. Sept. 10; 2: 605-606, 1983.
51. Feldman, G., Callard, P., et al.: Immune complex type glomerulonephritis in cirrhosis of the liver. *Am. J. Pathol.* 80: 329-340, 1975.
52. Burns, J., D'Ardenne, A.J., et al.: Immune complex nephritis in alcoholic cirrhosis in detection of Mallory Body antigen in complexes by means of monoclonal antibodies to Mallory Bodies. *J. Clin. Pathol.* 36: 751-755, 1983.
53. Jacques Descotes.: Immunotoxicology of drug and chemicals. Ed. Elsevier Science Publishers B.V. 1986.
54. Lundy, J., et al.: Thiabendazole, a potential adjuvant in cancer therapy. *Surgery*. 80: 636, 1976.
55. Lundy, J. and Lovett, E.S.: Immunomodulation with thiabendazole : A review of immunologic properties and efficacy in combined modality cancer therapy. *Cancer. Treat. Rep.* 62: 1955-1959, 1978.

56. Smith, A.G.: Potentiation of oral anticoagulants by ketoconazole. *Br. Med. J.* 1: 188-191, 1984.
57. Descotes, J. and Evreux, J.C.I.: Immunomodulation agents, in: *Meyler's side-effects of drugs*. (Dukes, M.N.G. Ed). Elsevier Science Publishers. pp.362, 1984.
58. Hodinka, L., Meretey, K. and Bozsoky, S.: Skin manifestations and serum Ig E levels in levamisole treated rheumatoid arthritis patients. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 58; 362-365, 1979.
59. Symoons, J. and Rosenthal, M.: A review. Levamisole in the modulation of the immune response: The current experimental and clinical state. *J. reticuloendothel. Soc.* 21: 175-220, 1977.
60. Adam Arlette.: *Synthetic adjuvants. vol.1, Cpa.3. Sulfur containing compounds.* Interscience Publication. (Wiley, A. Ed.) John Wiley and Sons. pp. 87-107, 1985.
61. Hadden, J.W.? Delmonte, L., et al.: *Comprehensive immunology.* Ed. Plenum Press. U.S.A. pp. 279, 1977.
62. Rabson, A.R.? Anderson, R. and Glover, A.: Defective neutrophil motility and recurrent infection in vitro and in vivo effects of levamisole. *Clin. Exp. Immunol.* 33:142-149, 1978.
63. Groveman, D.S. and Borden, E.C.: *J. Biol. Resp. Modif.* 2: 167, 1983.
64. Keystone, J. and Murdoch, J.K.: Diagnosis and treatment. Drug five years later: Mebendazole. *Ann. Int. Med.* 91:582-586, 1979.

65. Demoen, P., Van Aelst, C., et al.: Janssen Pharm. Clin. Res. Rep. R. 17: 635-636, 1973.
66. Münst, G.J., et al. : Eur. J. Clin. Pharmacol. 17: 375-378, 1980.
67. Van Den Bossche, H., Rochette, F. and Christian, H.A.: Mebendazole and related anthelmintics. Advances in Pharmacology and Chemotherapy. 19: 67-127, 1982.
68. Laclette, J.P., Guerra, G. and Zetina, C.: Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 417-423, 1980.
69. Meliconi, R., Valeria-Stancari, M., et al.: Occurrence and significance of Ig G liver membrane autoantibodies (LMA) in chronic liver diseases of different aetiology. Clin. Exp. Immunol. 51: 565-571, 1983.
70. Toda, G., Ikeda, Y., Hashimoto., et al.: Liver cell. Membrane antibody detected by protein A and isolated rabbit liver plasma membrane in sera of patients with chronic liver diseases. Clin. Exp. Immunol. 54: 661-670, 1983.
71. Charpentier, B., Franco, D., et al.: Deficient natural killer cell activity in alcoholic cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 48: 97-107, 1984.
72. Si, L., et al.: Lymphocytes subjects studies with monoclonal antibodies in liver tissues of patients with alcoholic liver disease. Alcoholism. 7: 431-435, 1983.
73. Wright, R.: Inmunología de la enfermedad del sistema digestivo y del hígado. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 181-183, 1978.

74. Ronald, L., Kaufman, C.J., et al.: Immune complexes in the portal and systemic circulation of patients with alcoholic liver disease. Clin. Immunol. Immunopathol. 22: 44-54, 1982.
75. Bernal, M., Salazar-Mallen, M., et al.: La respuesta inmune celular in vivo en el enfermo alcohólico crónico. Gaceta Médica de México. 114: 125-128, 1978.
76. Morales, B.L.: La administración crónica de mebendazol y sus efectos en diferentes órganos corporales de la rata. Tesis para obtener el título de Biólogo. Fac. de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 1984.
77. Santamaría, P.: Efecto del mebendazol 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.
78. Amery, W.K. and Gough, D.A.: Levamisole and immunotherapy : Some theoretic and practical considerations and their relevance to human disease. Oncology. 38: 168-181, 1981.
79. Simpson, J.W.: Identification of collagenase in cultured blood mononuclear cell. J. Dent. Res. 59: 2-10, 1980.
80. Fujiwara, K., et al.: Presence of collagenase in Kupffer cells and its activity in fibrotic rat liver. Proc. Rev. Gastroenterol. Mex. 40: 286, 1975.
81. Dayer, J.M., Russel, R.G. and Krane, S.M.: Collagenase production by rheumatoid synovial cells : Stimulation by a human lymphocyte factor. Science. 195: 181-183, 1977.

82. Bravo-Cuellar, A., Ramos-DAmia, M. and Gómez, E.H.: Estimulación fagocítica de los macrófagos pulmonares de rata con levamisol. Arch. Invest. Med. 12: 443, 1981.
83. Loose, S.D., Kan, B.P., et al.: Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P₄₅₀ dependent enzymes. J. Clin. Invest. The American Society for Investigation. Inc. 71: 1495- 1499, 1983.
84. Gross, J.: Studies on formation of collagen I. Properties and fractionation of neutral salt extracts of normal guinea pig connective tissue. J. Exp. Med. 107: 247-263, 1958.
85. Lefevere, M.F., Slegers, G.A. and Claeys, A.E.: Evaluation of a rapid, sensitive and specific assay for the determination of collagenolytic activity in biological samples. Clin. Chimica. Acta. 92: 167-175, 1979.
86. Johnson-Wint, B.: A quantitative collagen film collagenase assay for large numbers of samples. Analytical Biochemistry. 104: 175-181, 1980.
87. Ross, E.R.: Mediadores de la inmunidad celular en Inmunología básica y clínica, en : Inmunología Básica y Clínica. (Stites, P.D., Hugh, H.F., et al. Eds). Ed. El Manual Moderno. México. pp. 99-111, 1983.
88. Al-Simidaie, A.M., Jones, D.L. and Young, H.L.: Characterization of the under-agarose method for quantifying migration of highly purified human monocytes. J. Immunol. Meth. 75: 129-140, 1984.

89. Harris, D.E. and Vater, A.C.: Vertebrate collagenases, en: Structural and contractile proteins (Cunningham, W.L. and Frederiksen, W.D., Eds). Methods in Enzymology. 82: 423-452, 1982.
90. Yokota, M., Sakamoto, S., Koga, S. and Ibayashi, H.: Decreased interleukin-1 activity in culture supernatant of lipopolysaccharide stimulated monocytes from patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Clin. Exp. Immunol. 67: 335-342, 1987.
91. Ehrlich, P.H., Ross, R. and Bornstein, P.: Effects of antimicrotubulatory agents on the secretion of collagen. J. Cell. Biol. 62: 390-405, 1974.
92. Rojkind, M. and Díaz de León, L.: Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices a regulatory mechanism. Biochim. Biophys. Acta. 217: 512-522, 1970.