

03062

1
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFECTO DEL MEBENDAZOL SOBRE LA SINTESIS DE
PROTEINAS DE HEPATOCITOS EN CULTIVO
OBTENIDOS DE RATAS NORMALES Y CIRROTICAS.



T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A
FRANCISCO MIGUEL ACOSTA VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

EL DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE TEJIDO CONJUNTIVO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL Dr. LINO DÍAZ DE LEÓN HERNÁNDEZ Y EN COLABORACIÓN CON EL Dr. TOMÁS MENDOZA FIGUEROA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DEL CINVESTAV DEL IPN.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a los miembros del comité tutorial por haber sido mis maestros más cercanos durante toda mi maestría.

**Dr. Lino Díaz de León Hernández
Dr. Tomás Mendoza Figueroa
Dra. Julieta Rubio Lightbourn**

Agradezco a los miembros del jurado por las críticas y correcciones de este trabajo.

**Dr. Guillermo Mendoza Hernández
Dr. Rolando Hernández Muñoz
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dr. J. Javier Espinosa Aguirre**

También agradezco a los doctores Enrique Piña Garza y Adolfo García Sáinz me dieron las facilidades para aprender y desarrollar la técnica de cultivo de hepatocitos.

Quiero agradecer especialmente a los doctores Lino Díaz de León y Tomás Mendoza ya que ellos fueron las dos grandes guías en mi formación.

Agradezco también a todos mis compañeros de laboratorio quienes fueron además de compañeros, mis maestros, guías y amigos, especialmente a Felipe, David, Laura, Irene y a mi maestra Hortensia.

Tus alumnos siempre te recuerdan Hortencia

A Tere del laboratorio del Dr. Mendoza y a Raquel del laboratorio del Dr. E. Piña agradezco sus consejos y ayuda incondicional.

DEDICO ESTA TESIS A MI FAMILIA.

Primeramente a mi querida esposa María del Rosario Salvador Robles por todo el tiempo que le robó este trabajo y que ella soportó, por todos esos fines de semana en el laboratorio pero principalmente por lo mucho que la quiero.

"GRACIAS MARIELA POR TU AMOR Y COMPAÑÍA"

La dedico también a mis padres por esos 29 años de confianza.

***A mi papá Higinio Acosta Ralla
A mi mamá Reina Vázquez Falcón***

A mis hermanos y sus familias por su aprecio y compañía

***Higinio, Laura, Adriana y el otro Higinio
Joel Jaqueline y la eve
Ignacio y carmen
Enedina***

A mis demás familiares, principalmente a Reynaldo, Catalina, Juanita y Araceli.

Finalmente a mis excompañeros amigos y amigas: Armando, Graciela, Gabriel, Barbara, Tonatiuh, Yolanda, Hermila, Vicente Ramos etc.

A mis amigos del jardín botánico: Elvira, Iliana, Miguel, Salvador etc.

Finalmente a los que me faltaron a quienes ofrezco una disculpa por no mencionarlos

ÍNDICE.

I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCIÓN.	1
1) GENERALIDADES DE LA CIRROSIS HEPÁTICA.	1
2) LOS CAMBIOS QUE OCURREN EN EL HÍGADO DURANTE EL DESARROLLO DE LA CIRROSIS HEPÁTICA.	2
A) El hígado normal.	2
B) El hígado cirrótico.	3
a) Aumento en la síntesis de proteínas de la MEC.	4
b) Disminución en la degradación de las proteínas de la MEC.	6
3) RUTAS DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.	8
4) SISTEMAS DE CULTIVO DE HEPATOCITOS.	9
5) INTERACCIÓN HEPATOCITO-MEC.	10
6) INTERACCIÓN CÉLULA-CÉLULA.	10
7) IMPORTANCIA DE LA FORMA CELULAR.	11
8) EL PAPEL DEL CITOESQUELETO EN LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.	12
III. ANTECEDENTES.	14
IV. HIPÓTESIS.	17
V. OBJETIVOS.	17
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.	17
VII. RESULTADOS.	22
VIII. DISCUSIÓN.	46
IX. RESUMEN DE RESULTADOS.	49
X. CONCLUSIÓN.	49
XI. PERSPECTIVAS.	49
XII. BIBLIOGRAFÍA.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ALB	albúmina
CCl ₄	tetracloruro de carbono
DNA	ácido desoxiribonucleico
DMEM	medio mínimo esencial modificado de Dulbecco-Vögt
EHS	tumor Engelbert-Holmes-Swarm
Fig.	figura
GAGs	glucosaminoglucanos
GTP	trifosfato de guanidina
HCl	ácido clorhídrico
hrs.	horas
IgA	inmunoglobulina A
Kcl	cloruro de potasio
kDa	kilodaltones
LDH	deshidrogenasa láctica
Leu	leucina
MBZ	mebendazol
MEC	matriz extracelular
NaCl	cloruro de sodio
NADH	nicotín adenín dinucleótido
Na ₂ HPO ₄	fosfato ácido de sodio
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pro	prolina
TCA	ácido tricloroacético
TIMPs	inhibidores de metaloproteasas tisulares
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TRA	transferrina
SBF	siero bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sodio

I. RESUMEN.

La cirrosis hepática es una fibrosis generalizada con formación de nódulos de regeneración, como resultado de una necrosis celular persistente, seguida del depósito de tejido conjuntivo, principalmente de colágena tipos I y III. En el tratamiento de la cirrosis hepática se han diseñado compuestos que pueden interferir o inhibir selectivamente el metabolismo de estas proteínas.

En nuestro laboratorio se inició el estudio del mebendazol como posible agente antifibrosante ya que tiene la capacidad de unirse a la tubulina inhibiendo la formación de microtúbulos, que son estructuras necesarias para la secreción y depósito de las colágenas.

El tratamiento de la cirrosis hepática experimental, inducida con CCl_4 mostró una disminución en la biosíntesis y contenido de colágenas, así como una mejoría histológica en los hígados de las ratas tratadas con mebendazol. El tratamiento de pacientes con cirrosis hepática reveló: una disminución en la concentración de colágena en el hígado, mejoría histológica y del funcionamiento hepático en general. En cultivos de fibroblastos el tratamiento con mebendazol provocó una acumulación intracelular de colágena, así como una disminución de la proteína en la matriz extracelular.

Los hepatocitos son los encargados de la mayor parte de las funciones que realiza el hígado, secretan una gran cantidad de proteínas y controlan la concentración de glucosa y lípidos en sangre. Con base en lo anterior se planteó como objetivo estudiar el efecto del mebendazol sobre la síntesis de proteínas (albúmina y transferrina) en cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de ratas normales y cirróticas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que los hepatocitos obtenidos de ratas normales sintetizan mayor cantidad de proteínas totales que los hepatocitos obtenidos de ratas cirróticas tanto en la monocapa como en el medio y que el mebendazol no tiene un efecto sobre la morfología de los hepatocitos en cultivo ni sobre la síntesis de proteínas totales, de albúmina y de transferrina a concentraciones en las que sí se ha observado un efecto sobre fibroblastos y macrófagos. Por otro lado la secreción de albúmina y transferrina se incrementa en las células obtenidas a partir de hígados de ratas cirróticas.

II. INTRODUCCIÓN.

1) GENERALIDADES DE LA CIRROSIS HEPÁTICA.

La cirrosis hepática es el principal problema de salud pública en muchos países (Martínez-Hernández, 1985), en los Estados Unidos de Norteamérica y otros países se han llevado a cabo estudios de mortalidad en los que se muestra que la cirrosis hepática es la 5ª causa de muerte en adultos entre 25 y 64 años. La cirrosis asociada con el abuso excesivo de alcohol es la más frecuente, por lo que el problema de alcoholismo crónico guarda una estrecha relación con la frecuencia de este tipo de cirrosis (Páez y Díaz de León, 1985).

De manera general la cirrosis hepática es causada por un daño crónico al hígado que provoca una muerte celular persistente, lo cual genera un proceso cicatricial en el órgano, por lo que se depositan proteínas de la matriz extracelular (MEC) en el tejido hepático.

Si el daño persiste, las proteínas de la MEC llegan a obstruir el paso de la sangre a través del órgano, generando una hipertensión, y la sangre empieza a formar nuevos conductos para mantener su flujo, las vías venosas colaterales se forman principalmente en el plexo esofágico, estas vías se

flujo, las vías venosas colaterales se forman principalmente en el plexo esofágico, estas vías se sobrecargan y forman várices que pueden llegar a romperse y causar la muerte (Páez y Díaz de León, 1985).

El aumento en la presión sinusoidal provoca un incremento en la formación de linfa dentro de la cavidad abdominal donde se pueden acumular varios litros de este líquido (Páez y Díaz de León, 1985).

La cirrosis hepática puede ser clasificada de acuerdo con la apariencia del hígado en macronodular, micronodular y mixta. De manera general en la cirrosis macronodular se pueden observar nódulos de diferente tamaño, pero la mayoría tiene más de 3 mm de diámetro y llegan a medir varios centímetros, mientras que en la cirrosis micronodular, los nódulos son menores de 3 mm de diámetro y son muy uniformes en tamaño. Se dice que hay cirrosis mixta cuando se presentan macronódulos y micronódulos con igual frecuencia (Schiff, 1993).

Otras formas de clasificación de la cirrosis es de acuerdo a sus anomalías a nivel histológico y de acuerdo con el agente etiológico (Tabla 1) (Schiff, 1993; Páez y Díaz de León, 1985).

TABLA 1. Clasificación de la cirrosis hepática.

CRITERIO	TIPO DE CIRROSIS
Morfológico	Macronodular Micronodular Mixta
Histológico	Portal Postnecrótica Posthepatítica Obstrucción biliar Obstrucción del flujo venoso
Etiológico	Alcohólica Asociada con hemocromatosis Cicatrización postnecrótica Biliar Posthepatítica

2) LOS CAMBIOS QUE OCURREN EN EL HÍGADO DURANTE EL DESARROLLO DE LA CIRROSIS HEPÁTICA.

A) El hígado normal.

El hígado es la glándula mayor del cuerpo humano y está formado por 2 lóbulos principales y 2 lóbulos secundarios, está cubierto por una delgada capa de tejido conjuntivo que penetra en la glándula y lo divide en lóbulos y lobulillos, dicha cápsula se denomina cápsula de Glisson (Leeson et al., 1987). Este órgano recibe sangre a través de la vena porta, de la cual, un 75 % es venosa y rica en azúcares y aminoácidos, pero es pobre en oxígeno, el cual llega al órgano en la sangre arterial por la arteria hepática que es un 25 % del total (Wheater et al., 1986).

Las principales funciones del hígado son las siguientes:

a) Regula la concentración de glucosa en sangre, la cual puede ser almacenada en el órgano en forma de glucógeno el cual llega a constituir hasta un 6 % del volumen del órgano, en condiciones de ayuno, cuando las reservas de glucógeno se agotan, el hígado puede formar glucosa a partir de metabolitos no carbohidratos como el lactato, el glicerol y los aminoácidos por medio de la gluconeogénesis (Stryer, 1988).

b) Participa en el metabolismo de los lípidos, secreta la bilis que facilita la absorción y digestión de los lípidos, sintetiza ácidos grasos, los esterifica y los secreta en forma de lipoproteínas de muy baja densidad, que se encargan de transportar el triacilglicerol a otros tejidos, de manera que desempeña una parte integral en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas (Mendoza et al., 1988).

c) Participa en la síntesis de proteínas especializadas tales como fibrinógeno, albúmina y transferrina (Murray et al., 1992).

d) Participa en la desintoxicación y eliminación de materias extrañas como bacterias, fármacos y otras sustancias nocivas (Murray et al., 1992).

e) Funciona como almacén de vitaminas y minerales (Murray et al., 1992).

B) El hígado cirrótico.

El hígado tiene una alta capacidad de regeneración, ya que si se le somete a un daño agudo o se aplica una hepatectomía hasta del 75 % del tejido, éste es capaz de regenerarse completamente y de mantener su arquitectura y las proporciones de los distintos componentes normales del órgano, sin embargo, es susceptible a ser afectado irreparablemente cuando se le somete a un daño crónico. En tal caso, el hígado sufre una acumulación progresiva de componentes de la MEC, a lo que se le conoce como fibrosis hepática (Martínez-Hernández et al., 1991). Cuando la fibrosis está asociada con una desorganización de la arquitectura debido a la formación de nódulos de regeneración con conexiones vasculares alteradas, se le conoce como cirrosis que es generalmente considerado como el punto donde ya no se revierte la enfermedad crónica del hígado (Biagini y Ballardini, 1989).

A nivel experimental se han estudiado una serie de compuestos que son capaces de inducir cirrosis hepática en animales, uno de los más usados es el CCl_4 , cuyo efecto semeja el estado cirrótico de un hígado dañado por etanol en humanos, aunque el desarrollo de la enfermedad es diferente (Bosma et al., 1988). Usando este compuesto, Martínez-Hernández clasificó el desarrollo de la cirrosis hepática en tres estados de acuerdo con la apariencia morfológica del órgano, estos estados son: metamorfosis grasa (de 1 a 5 semanas de tratamiento), fibrosis septal (de 4 a 15 semanas de tratamiento) y cirrosis (de 10 a 30 semanas de tratamiento) (Martínez-Hernández, 1985).

Otra clasificación de la cirrosis fue propuesta por Greenwel, ésta se basa en el desarrollo fisiológico de la enfermedad y consta de 4 etapas, la primera llamada "respuesta muy temprana" en la que hay daño celular y degradación de la MEC, es probable que estos fenómenos provoquen la liberación de las citocinas y los factores de crecimiento que se encuentran en ella induciendo la activación de las células de Kupffer y la migración quimiotáctica de las células inflamatorias. En la segunda etapa, llamada de "respuesta temprana", las células de Kupffer y las células inflamatorias reclutadas producen factores de crecimiento y citocinas en gran proporción y las células estelares se transforman en miofibroblastos probablemente en respuesta a la producción del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), del factor de necrosis tumoral (TNF- α) o del factor derivado de plaquetas (PDGF) a los cuales se les ha atribuido un papel en el proceso de transformación de las células estelares.

En la etapa "de respuesta intermedia" los miofibroblastos se encargan de producir activamente citocinas y factores de crecimiento, además de incrementar el depósito de componentes de la MEC, lo cual, lleva a la formación de una cicatriz en el hígado. En la última etapa "de respuesta tardía" se forman grandes septos fibrosos de proteínas de la MEC, que carecen de células (Greenwel et al., 1994).

En la cirrosis hepática, el depósito excesivo y desorganizado de MEC es directamente responsable del desajuste de la función hepática. Entre los principales componentes de la MEC que se ven afectados se encuentran las colágenas, que en condiciones normales constituyen el 4 % en el hígado humano, y en la cirrosis llegan a constituir hasta un 10 % de la proteína total hepática, mientras que en la rata solo 0.5 % es colágena en condiciones normales y llega a constituir el 2 % del total de proteína en la cirrosis experimental. Los tipos de colágena identificados en el hígado comprenden los tipos I, III, IV, V y VI, de los cuales, los tipos I y III son los más abundantes y en el hígado cirrótico se depositan alrededor de la vena y arteria hepáticas (Martínez-Hernández, 1985).

A pesar de que el incremento en las colágenas se presenta invariablemente en el desarrollo de la cirrosis, no es la única alteración que tiene lugar en el hígado. Se ha observado que hay un aumento en la mayoría de las proteínas de la MEC en el espacio de Disse, que empieza con una acumulación inicial de fibronectina seguida por un depósito de colágenas tipos III y V. Conforme progresa la enfermedad hay un aumento de colágena tipo I que en los estados más tardíos se asocia con un depósito de undulina, elastina, colágena tipo IV, laminina (Burt, 1993) y tenascina (Van-Eyken et al., 1992), las cuales terminan por cerrar los espacios de la membrana basal fenestrada formando un verdadero capilar a lo largo del sinusoides hepático evitando el intercambio de moléculas entre los hepatocitos y la sangre (Martínez-Hernández, 1985).

El depósito excesivo de colágenas puede deberse a un aumento en su síntesis, a una disminución en la degradación de las mismas o a ambos procesos.

a) Aumento en la síntesis de proteínas de la MEC.

En esta parte discutiremos las causas del aumento en la síntesis de proteínas de la MEC, las cuales podemos agrupar en dos categorías.

1. Aumento en el número de células especializadas en la producción de proteínas de la MEC.
2. Aumento en la producción de proteínas de la MEC por célula.

Para abordar el primer punto es necesario primero hablar de los tipos celulares que se encuentran en el hígado y cual es la contribución de cada uno de ellos en la síntesis de la MEC, mientras que en el segundo punto se discutirá como se regula la síntesis de proteínas en las principales células productoras de colágena y el papel de los tipos celulares que participan de manera indirecta en el depósito de MEC.

En el tejido hepático normal se encuentran varios tipos celulares, los cuales pueden ser clasificados como parenquimatosos, sinusoidales y una fracción menor de otros tipos celulares (Phillips et al., 1987). Las células parenquimatosas o hepatocitos que constituyen del 60 a 65 % del total de células del hígado y ocupan cerca del 80 % del volumen del órgano son los encargados de la funcionalidad hepática (Phillips et al., 1987).

Las células sinusoidales son clasificadas en cuatro tipos: células endoteliales, células de Kupffer, células estelares y células Pit.

La principal función de las células endoteliales es la de filtrar los fluidos que se intercambian entre el lumen sinusoidal y el espacio de Disse (Wisse et al., 1989). Las células de Kupffer son macrófagos residentes en el hígado y su función principal es la de proteger al órgano y mantenerlo libre de células viejas, de desechos celulares, parásitos, bacterias y productos de degradación de la fibrina (Wisse et al., 1989). Las células estelares tienen como funciones principales el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A, su capacidad biosintética incluye a las colágenas I, III, IV, laminina y fibronectina (Weiner et al., 1990). Las células Pit tienen la capacidad de eliminar células tumorales y posiblemente células infectadas con virus (Wisse et al., 1989).

Entre los otros tipos de células que se encuentran en el hígado tenemos a los fibroblastos, células de la sangre, células endoteliales de los vasos sanguíneos y células nerviosas. Es importante mencionar

que estos tipos celulares se encuentran en pequeñas proporciones (excepto las células de la sangre) y que no son específicas del tejido hepático; sin embargo, en condiciones de fibrosis se ha reportado que los fibroblastos pueden aumentar y llegar a constituir una población importante en el desarrollo de enfermedad (Tuchweber et al., 1996).

El conocer cual es el origen celular de las proteínas de matriz extracelular en el hígado ha sido un punto de gran discusión, ya que todas las células residentes en el hígado han mostrado la capacidad para producir uno o más componentes de la MEC *in vitro* o *in vivo*. Entre las pruebas que han sido más utilizadas tenemos las inmunohistoquímicas, las pruebas de marcaje isotópico *in vivo* o *in vitro*, los estudios metabólicos en cultivos de células residentes en el hígado, los estudios de hibridación *in situ*, etc.(Tabla 2).

TABLA 2. Actividades biosintéticas de las células del hígado (Biagini y Ballardini, 1991).

Células	hepatocitos		células de los ductos biliares		células estelares		miofibroblastos		células endoteliales		células de Kupffer	
	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V
Colágenas												
tipo I	+	+			+	+	+		+	+		
tipo III	+	+	-	-	+	+	+		+	+		
tipo IV	+	+		+	+	+	+		+	+		
tipo V	+				-		+		+			
tipo VI					-							
Fibronectina	+	+			+	+				+		+
Laminina	+			+	+	+	+		+	+		+
Proteoglicanos	+				+		+					+
Elastina									+			

C= *In vitro*; V=*In vivo*

Dado que los hepatocitos son las células que se encuentran en mayor proporción en el hígado, muchos estudios se han abocado a detectar cuales son las proteínas de la MEC que secreta el hepatocito y si la síntesis de proteínas de éste se ve afectada en la cirrosis hepática.

A principios de la década de los 80's se asumía que en el hígado como en la mayoría de los tejidos, la colágena era sintetizada por fibroblastos exclusivamente o posiblemente por otro tipo de células mesenquimatosas, tales como las células estelares, en las que estudios morfológicos habían mostrado que contenían intracelularmente componentes de la MEC. Sin embargo, en 1980 se demostró que clones de células parenquimatosas en cultivo eran capaces de producir colágenas de los tipos I, III, IV y V que semejaban a las colágenas que anteriormente habían sido aisladas de hígado humano (Hata et al., 1980), lo cual sugería que los hepatocitos podrían ser importantes productores de colágenas en el hígado normal o en el estado fibrótico. Posteriormente Diegelman et al. publicaron un artículo en el que utilizó técnicas inmunohistoquímicas para probar que los hepatocitos en cultivo primario producían colágenas de los tipos I, III y IV y la enzima prolil hidroxilasa (1983). En años posteriores, se publicaron una serie de artículos que demuestran que los hepatocitos son capaces de sintetizar colágenas. Entre

los estudios inmunohistoquímicos destacan los trabajos de Martínez-Hernández (1985), Malizia et al. (1987) y Tsutsumi et al. (1988). En el trabajo de Martínez-Hernández, se observó colágena tipo I y fibronectina en el retículo endoplasmático rugoso en los hepatocitos de rata en muestras de tejido, mientras que Malizia et al. mostraron que en biopsias de hígado humano los hepatocitos reaccionan intracelularmente con anticuerpos dirigidos contra colágena tipo I y Tsutsumi et al demostró que hepatocitos en cultivo obtenidos de hígado de rata, reaccionan intracelularmente con anticuerpos dirigidos contra prolil hidroxilasa y colágenas de los tipos I, III y IV, siendo más evidente la tinción con el anticuerpo dirigido contra colágena tipo I. Entre los estudios bioquímicos destacan los de Hata et al. (1985), los de Chojkier (1986), Chojkier y Brenner (1988) y los de Cerbón et al. (1989). En cultivos de hepatocitos de rata de 8 días con estudios de marcaje radiactivo (H^3 -Pro) y con la técnica de cromatografía de columna se determinó que la proporción de colágenas sintetizadas de los tipos I, III, IV y V es de 67:7:17:9, respectivamente (Hata et al., 1985). En los estudios de Chojkier y Cerbón se concluye que los hepatocitos contribuyen al depósito de colágenas en el hígado normal hasta con un 80 % de la producción y que en un hígado cirrótico aumentan su producción pero contribuyen únicamente en un 50 %.

En estudios de hibridación *in situ* se ha observado que solo las células sinusoidales son positivas a la presencia de las cadenas de procolágena $\alpha 1(I)$ (Pietrangelo et al, 1994), $\alpha 1(III)$ y $\alpha 1(IV)$ (Nakatsukasa et al, 1990). Por otra parte, en otros estudios se ha observado que los hepatocitos presentan mensajeros para las cadenas $\alpha 2(I)$ (Saber et al., 1983), $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(III)$ (Geerts et al., 1993) y $\alpha 1(IV)$ (Maher y McGuire, 1990), que no son atribuibles a las células que pudieran estar como contaminantes. Sin embargo, en la mayoría de los estudios la presencia de mensajeros para los distintos tipos de colágena es muy débil comparada con la señal obtenida en las células estelares y no se ha observado un incremento en la presencia de genes para colágena en hepatocitos obtenidos a partir de ratas cirróticas tratadas con CCl_4 (Milani et al., 1989) o a las que se les indujo cirrosis por ligación de los ductos biliares (Maher y McGuire, 1990).

A pesar de la gran controversia que ha habido en torno a si los hepatocitos sintetizan colágena y cuales son los tipos de colágenas que éstos producen, es bien sabido que los principales productores de proteínas de la MEC son las células mesenquimatosas, entre las cuales están las células estelares, los miofibroblastos y los fibroblastos. Se ha sugerido que las células estelares, en el caso de la cirrosis hepática, proliferan ampliamente y se transforman en células tipo miofibroblasto, las cuales secretan mayor cantidad de proteínas de la MEC (Mak y Lieber, 1988). Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que las células estelares que mantienen su fenotipo también contribuyen al depósito excesivo de proteínas de la MEC en el modelo de cirrosis inducida por CCl_4 (Weiner et al, 1992). Por otro lado, los fibroblastos intersticiales que se encuentran en las proximidades de las paredes de las venas centrales, la cápsula de Glisson y los tractos portales también proliferan en zonas donde se depositan proteínas de la MEC en condiciones de cirrosis inducida por la ligación de los ductos biliares (Tuchweber et al, 1996) y por CCl_4 (Nakatsukasa et al, 1990)

b) Disminución en la degradación de las proteínas de la MEC.

El aumento de la síntesis de proteínas no es suficiente para explicar el desarrollo de la enfermedad, ya que la matriz extracelular no es una estructura estática, sino que existe un constante recambio de sus componentes.

Para que se desarrolle la enfermedad, debe de existir un desequilibrio entre síntesis y degradación de proteínas de la MEC de manera que una disminución en la degradación de proteínas de la MEC es suficiente para explicar el aumento en colágena extracelular.

Existen dos formas de degradación de las proteínas de la MEC. Una de ellas se lleva a cabo intracelularmente y participan en ella los lisosomas, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Se ha observado que más del 15 % de las moléculas de colágena recién sintetizadas pueden ser degradadas intracelularmente por lo que la interrupción de esta vía podría incrementar la producción neta de colágena en un 15 % (Chojkier y Brenner, 1988). De esta manera, no se puede descartar la disminución de degradación intracelular de las proteínas de la MEC como la causa principal de la cirrosis hepática. La otra forma de degradación de proteínas de la MEC es extracelular y en ella las principales enzimas que participan pueden ser clasificadas en tres grupos: a) colagenasas intersticiales, las cuales degradan colágenas de los tipos I y III; b) colagenasas tipo IV, las cuales degradan colágena desnaturalizada y colágenas de membrana basal ; y c) estromelisin, las cuales tienen una especificidad más amplia por el substrato (Burt, 1993).

TABLA 3. Enzimas capaces de degradar la MEC, producidas por los distintos tipos celulares residentes del hígado y sus inhibidores (Greenwel et al., 1994).

CELULAS	ENZIMAS	INHIBIDORES DE ENZIMAS
<i>Células estelares</i>	Colagenasa tipo I Colagenasa tipo IV (72 kDa) Colagenasa tipo IV (95 kDa) Estromelisin	TIMP-1 α 2-macroglobulina
<i>Células de Kupffer</i>	Colagenasa tipo I Colagenasa tipo IV (95 kDa)	
<i>Hepatocitos</i>	Estromelisin Colagenasa tipo I?	

En un hígado normal la colágena tipo I tiene una vida media de 30 días y la colágena tipo III de 15 días, en caso de cirrosis experimental inducida por CCl₄, la vida media de ambas colágenas decrece al 50 % pero solo se recambian las fibrillas pequeñas más externas que han sido depositadas recientemente, mientras que las moléculas de colágena depositadas en el centro de una fibra no se degradan debido a la presencia de una gran cantidad de enlaces covalentes intra e intercadena como resultado de la acción de la lisil oxidasa (Greenwel et al., 1994).

Estas colagenasas conforman la familia de las metaloproteinasas de matriz y tienen las siguientes características: 1) degradan al menos un componente de la MEC, 2) contienen iones de

zinc y son inhibidas por agentes quelantes, 3) son secretadas en forma latente y requieren de activación para su actividad proteolítica, 4) son reguladas por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPS) y por α -2 macroglobulina, 5) contienen distintos dominios que son conservados entre varios miembros de la familia (Matrisian, 1990).

En el hígado se ha observado que tanto los hepatocitos como las células de Ito y las células de Kupffer son capaces de sintetizar algún tipo de colagenasa, además de sus inhibidores (Tabla 3).

3) RUTAS DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

Hasta hace poco tiempo se pensó que la secreción de todas las proteínas se llevaba a cabo por la misma ruta, tanto aquellas proteínas que se depositan en el medio extracelular así como las que son integrales de membrana, sin embargo, ahora se sabe que existen diferencias en pasos individuales en la ruta de secreción de proteínas de un tipo celular a otro y aún dentro de la misma célula puede haber distintas rutas de secreción. Se ha clasificado a las células secretoras dentro de dos clases que son las llamadas células secretoras constitutivas y las células de secreción regulada.

Las células de secreción constitutiva son probablemente las más comunes e incluyen a los hepatocitos, fibroblastos, células musculares entre otras y se caracterizan por liberar sus proteínas recién sintetizadas al espacio extracelular en un tiempo relativamente corto y no se almacenan intracelularmente; además los productos se secretan en ausencia de un estímulo particular.

A diferencia de las anteriores, las células de secreción regulada almacenan sus proteínas en vesículas secretoras durante días y se liberan de acuerdo con los niveles de mensajeros citoplasmáticos, ello sucede generalmente cuando aumentan los niveles de calcio intracelular. Una de las características morfológicas de estas vesículas secretoras es que el material dentro de la vesícula madura se condensa, para dar lugar a un núcleo denso y opaco a los electrones.

Si bien se ha clasificado a las células dentro de estos dos tipos, es necesario mencionar que ambos tipos de secreción pueden coexistir dentro de la misma célula y se ha planteado un modelo en el que se menciona que en la ruta de secreción regulada, las vesículas llevan información blanco (targeting information) mientras que las vesículas de secreción constitutiva se liberan por medio de un flujo de volumen pasivo que no requiere de un estímulo externo. Esto llevó a la especulación acerca de la posible coexistencia de secreción polarizada y no polarizada dentro de una misma célula. De hecho, esta última hipótesis ha sido apoyada por varios estudios en células polarizadas tales como los hepatocitos, en donde se ha observado que existe una gran variedad de rutas de transporte de vesículas, mientras que en otras células tales como los fibroblastos no existe evidencia de secreción polarizada (Kelly, 1985).

Los hepatocitos presentan al menos 3 tipos de superficies: 1) las apicales que se encuentran en contacto con el espacio de Disse, 2) las basolaterales que se encuentran en contacto con hepatocitos vecinos y 3) las superficies basales que se encuentran en contacto con los conductillos biliares, de manera que se encuentran en contacto con la sangre, y con la bilis, por ello presentan una gran variedad de rutas de transporte de vesículas (Fig. 1).

Las proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso y se dirigen hacia el aparato de Golgi (1); de este organelo, las proteínas de secreción y de membrana se secretan

directamente a la membrana sinusoidal (2), mientras que otras como la galactosiltransferasa se envían a los lisosomas (3). También, hay proteínas que se excretan a los canalículos biliares a partir de los lisosomas (4). Otras moléculas tales como la transferrina y la vasopresina son endocitadas (por endocitosis mediada por receptor) en la membrana sinusoidal y después de cumplir su función se envían nuevamente al exterior sobre la misma superficie (5). Otra ruta de transporte es la transcitosis en la que moléculas del sinusoide hepático, tales como receptores unidos a ligando (ejem. IgA) se transportan al canalículo biliar (6) o alternativamente hacia los lisosomas (7) (Nathanson y Boyer, 1994)

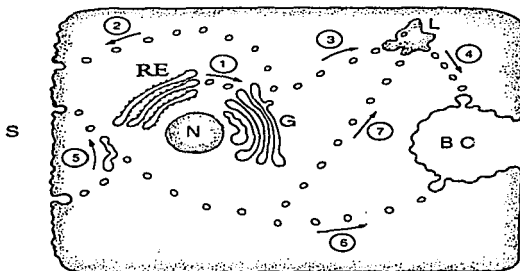


Fig. 1. Rutas de transporte de vesículas en los hepatocitos. RE significa retículo endoplásmico; G, aparato de Golgi; S, membrana sinusoidal; L, lisosomas; N, núcleo; BC, canalículo biliar (Nathanson y Boyer, 1994).

4) SISTEMAS DE CULTIVO DE HEPATOCITOS.

Uno de los sucesos más importantes en el desarrollo de la técnica de cultivo de hepatocitos fue sin duda el establecimiento de la técnica de aislamiento de hepatocitos intactos a partir de hígado de rata, la cual fue publicada por Berry y Friend en 1969, posteriormente Bissell publicó un artículo en el que reporta la técnica de cultivo de hepatocitos en monocapa no proliferante (Bissell et al., 1973). Las principales ventajas de esta técnica es el que se pueden realizar estudios de eventos metabólicos en poblaciones definidas de células que se pueden mantener en condiciones controladas durante largos períodos. Inicialmente los hepatocitos se sembraban sobre el plástico de la caja de cultivo (Bissell et al., 1973), sin embargo, dado que los hepatocitos *in vivo* se encuentran en contacto con una serie de moléculas de la MEC se decidió estudiar el efecto de estas moléculas sobre la capacidad funcional de los hepatocitos en cultivo y se observó que éstas son importantes al mantener sus características diferenciadas. Por otro lado, dado que los hepatocitos se encuentran en contacto con otras células se ha estudiado la

importancia de la interacción célula-célula sobre la capacidad funcional de los hepatocitos en cultivo y se ha llegado a la conclusión de que este tipo de interacción es importante para mantener a los hepatocitos diferenciados *in vitro*. Otro factor que ha mostrado ser importante en el mantenimiento de la funcionalidad de los hepatocitos en cultivo, es la forma de las células. Aunque estos factores están íntimamente relacionados se tratarán a continuación de manera separada.

5) INTERACCIÓN HEPATOCITO-MEC.

La interacción célula-MEC es de vital importancia para que los hepatocitos mantengan su capacidad funcional. Se ha propuesto que la MEC tiene un efecto directo en la regulación génica del hepatocito, ya que existe una estrecha relación entre el núcleo de la célula y los componentes de la MEC vía receptores transmembranales tales como las integrinas. Los cultivos primarios de hepatocitos han sido utilizados para estudiar el efecto de la MEC sobre la diferenciación de las células, por lo que se han ensayado una serie de sustratos para incrementar la capacidad funcional de los hepatocitos en cultivo. Entre los sustratos que se utilizan se encuentran en primer lugar los componentes de la MEC. Otros sustratos que se han utilizado son el matrigel, la biomatriz extraída del tumor Engelbreth-Holm-Swarm de ratón (EHS) y la biomatriz extraída directamente del hígado de la rata (Ponce y Rojkind, 1995). Cada uno de estos sustratos ayuda a mantener diferenciados a los hepatocitos en mayor o menor grado, lo cual resalta la importancia de los receptores de membrana en la transmisión de señales del medio extracelular al núcleo de la célula.

Originalmente los hepatocitos eran sembrados directamente sobre el plástico de la caja de cultivo (Bissel et al., 1973), sin embargo, estos cultivos duraban poco tiempo y los hepatocitos eran reemplazados por células mesenquimatosas (Bissel et al., 1973; Tanaka et al., 1978) por lo que posteriormente se empezaron a utilizar sustratos de proteínas obtenidas de la MEC para mantener la capacidad funcional de los hepatocitos. Entre las proteínas de la MEC que más se han empleado como sustrato son la colágena tipo 1 seca o en forma de gel hidratado obtenida de fuentes comerciales o a partir de tendón de cola de rata. Estos sustratos hasta el momento son los más ampliamente utilizados, dado que son relativamente baratos y a que mejoran por mucho la morfología, adhesión y capacidad funcional de los hepatocitos en cultivo. Las células se extienden sobre estos sustratos, restablecen una polaridad, adquieren forma poligonal por lo que semejan a las células del hígado *in situ* (Strom y Michalopoulos, 1982) aunque usualmente declinan en la transcripción de la mayoría de los mRNAs específicos de hígado pero no de los comunes a todas las células, además de que presentan un aumento en la síntesis de proteínas del citoesqueleto (Ben-ze'ev et al, 1988). Por ello, se ha estudiado el efecto de sustratos enriquecidos con proteínas y GAGs de la MEC sobre la capacidad funcional de los hepatocitos en cultivo.

6) INTERACCIÓN CÉLULA-CÉLULA.

Además del contacto que se establece entre el hepatocito y la MEC *in vivo*, el hepatocito mantiene un estrecho contacto con los hepatocitos vecinos y con otros tipos de células tales como

las células estelares, por lo que también se ha aprovechado el sistema de cultivo celular para realizar estudios y conocer el efecto de las interacciones célula-célula sobre el mantenimiento de las características diferenciadas de los hepatocitos.

Los resultados han mostrado que esta interacción es muy importante ya que se ha observado que cultivos de hepatocitos sembrados sobre colágena de cola de rata a bajas densidades proliferan en presencia de factores de crecimiento (Takehara et al., 1992) y elevan su producción de proteínas de citoesqueleto, al mismo tiempo, que disminuyen la producción de proteínas específicas de hepatocitos diferenciados. Sin embargo, cuando se cultivan a altas densidades donde la interacción célula-célula es muy estrecha, mantienen su producción de albúmina (Ben-Ze'ev et al., 1988; Takehara et al., 1992).

Por otro lado se sabe que la mayoría de las células epiteliales necesitan de la interacción con componentes mesenquimatosos para crecer y diferenciarse, incluso se ha sugerido que el contacto de estas células con las venas centrales en el hígado dispara la expresión de enzimas tales como la glutamino sintetasa y la ornitino aminotransferasa, resultando en una expresión heterogénea de estas enzimas dentro del órgano. Dada la importancia de estas interacciones, se ha estudiado el efecto del contacto de los fibroblastos y las células estelares con los hepatocitos y se ha observado que estas células emiten proyecciones que establecen contacto con los hepatocitos en regiones cercanas a centriolos y ricas en microtúbulos (Rojkind et al., 1995), además, se ha observado que los cocultivos expresan ZO-1 que es una proteína asociada con uniones estrechas, la cual no se detecta en cultivos de hepatocitos solos (Loreal et al., 1993).

Estos sistemas de cocultivo han mostrado que retienen funciones diferenciadas por largos periodos (Rojkind et al., 1995) y en el sistema de cocultivo de hepatocitos sobre una capa alimentadora de fibroblastos de la línea 3T3, éstos han mostrado que mantienen la expresión de funciones diferenciadas al menos durante 30 días (Kuri-Harcuch y Mendoza-Figueroa., 1989). Aunque los resultados descritos sugieren que existe un efecto del contacto célula-célula sobre el mantenimiento de las características diferenciadas, no conocemos hasta que grado, ya que los productos de secreción de las células también pueden tener un efecto sobre la diferenciación de los hepatocitos.

7) IMPORTANCIA DE LA FORMA CELULAR

La morfología de la célula refleja la organización de la estructura del citoesqueleto la cual es determinada parcialmente por los contactos con el medio externo. Como ya se mencionó, los hepatocitos establecen contacto tanto con la MEC como con las células vecinas, por lo que ambos tipos de contacto intervienen en la determinación de la forma celular. De igual manera la densidad a la que se siembra a los hepatocitos influye sobre su forma. Cuando los hepatocitos se siembran sobre un gel de biomatriz del tumor EHS, aunque éstos se adhieren en menor proporción comparados a los que son sembrados sobre colágena seca o en gel, mantienen sus características diferenciadas por más tiempo y esto se debe a que el gel contiene otros componentes de la MEC tales como la laminina, pero además las células se extienden menos y su forma es más esférica (Ben-Ze'ev et al., 1988).

En otro estudio en el que a los cultivos de hepatocitos sembrados sobre colágena seca se les agregaron los componentes de biomatriz de EHS en forma diluida, no se alteró la forma de la

célula pero si se indujo la expresión de albúmina por lo que se infiere que el efecto del gel EHS sobre los hepatocitos en cultivo es principalmente debido a sus componentes y no es efecto de la forma (Caron, 1990). Sin embargo, en otro sistema en el que se cultivó a los hepatocitos sobre un gel de colágena y posteriormente se le colocó encima otro gel de colágena, éstos no se aplanan tanto y reordenan su citoesqueleto semejando a la situación *in vivo* por lo menos durante 7 semanas, además de que secretan albúmina y transferrina (Ezzell et al., 1993).

8) EL PAPEL DEL CITOESQUELETO EN LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.

El citoesqueleto es una compleja red de filamentos proteicos situados en el citoplasma de la célula y actúa como una estructura de soporte que interviene en el movimiento y organización interna. Entre sus principales componentes, se encuentran los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios, además de muchas proteínas accesorias que unen a los filamentos entre sí y con otros componentes celulares tales como la membrana plasmática (Alberts et al., 1994).

Los microtúbulos son organelos proteicos presentes en casi todas las células eucariontes, se componen de subunidades ensambladas en estructuras tubulares con un diámetro promedio exterior de 24 nm y un largo indefinido. Estas estructuras son capaces de cambiar de longitud rápidamente ensamblando o desensamblando sus unidades proteicas denominadas tubulinas, son sensibles al frío, a altas presiones hidrostáticas y a algunos agentes químicos específicos tales como colchicina, vinblastina y mebendazol. Los microtúbulos pueden construir junto con otras proteínas, complejos de ensamble como el uso mitótico, centriolos, cilios, flagelos, axonemas, neurotúbulos e intervienen determinando la forma celular, movilidad de la célula, en el transporte intracelular, en el mantenimiento de las propiedades de superficie y en la arquitectura citoplásmica (Dustin, 1978).

Como se mencionó, los microtúbulos están formados por tubulina, esta es una proteína dimérica, soluble en agua y está formada por la α -tubulina y la β -tubulina, cada una con un peso molecular de 50 kDa (Dustin, 1978).

El papel de los microtúbulos en el transporte de vesículas como es el caso de la endocitosis y de la exocitosis fue sugerida por Lacy et al. (1968), quienes propusieron que éstos juegan un papel en la actividad secretoria de las células B de los islotes de Langerhans de páncreas, ya que el tratamiento de estas células con agentes que alteran a los microtúbulos, inhiben la liberación de insulina. Posteriormente una serie de estudios demostraron que la integridad de los microtúbulos es necesaria para las actividades relacionadas con el movimiento de las vesículas (Bomsel et al., 1990).

En varios tipos de fibroblastos se ha observado que los fármacos que alteran la integridad de microtúbulos, tales como la colchicina, la vinblastina y el mebendazol inhiben la incorporación de 14 C-Pro a las colágenas. Un efecto similar se observó en tendón de embriones y hueso craneal de pollo, donde la síntesis y secreción de procolágenas son inhibidas por colchicina. En las células de estos tejidos se encontró que estos fármacos provocan una alteración en el aparato de Golgi a concentraciones tan bajas como 10^{-6} M (Dustin, 1978).

La inhibición de la acumulación de colágena por la colchicina, se ha observado también en la cirrosis hepática experimental inducida en ratas con tetracloruro de carbono.

En las células del hígado la colchicina inhibe la secreción de proteínas de plasma tales como albúmina, protrombina, fibrinógeno y los factores de coagulación de la sangre V y VII, además de las lipoproteínas de muy baja densidad, las cuales quedan retenidas dentro de las células en las vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi (Reedman et al., 1975) (Dustin, 1978). También se encontró que en células de hígado de ratón, la colchicina y la vinblastina inhiben la secreción de proteínas sintetizadas recientemente, lo cual hizo sugerir que los microtúbulos son necesarios para el transporte y excreción de vesículas, mientras que otros estudios mostraron que la lumicolchicina carecía de efecto sobre la secreción de estas células y que la colchicina actuaba solo a dosis elevadas (0.5 mg/100g de peso del cuerpo), lo cual hizo dudar sobre el efecto específico de la colchicina sobre los microtúbulos, (Dustin, 1978). Sin embargo, existe evidencia morfológica de que micelas de lipoproteínas que son segregadas del aparato de Golgi en vesículas, se encuentran estrechamente unidas a los microtúbulos. Además, el tratamiento de las células con colchicina o vinblastina resulta en un incremento de las micelas de lipoproteínas en el aparato de Golgi (Gravela et al., 1977).

Otros estudios han mostrado que la colchicina es capaz de disminuir la secreción de colágenas en fragmentos de hígado aislados de ratas a las cuales se les indujo previamente cirrosis con tetracloruro de carbono, a diferencia de la colágena y la albúmina, la síntesis de transferrina no fue modificada por el tratamiento. Además de interferir sobre la secreción de colágenas, la colchicina es capaz de estimular la producción de colagenasas *in vitro* (Rojkind y Kershenobich, 1975).

Otros fármacos con capacidad de inhibir la polimerización de microtúbulos son el nocodazol y el parbendazol, los cuales inhibieron la secreción de proteínas totales y de albúmina, así como de triacilglicerol a una concentración de 10 μ M en hepatocitos de rata recién aislados, a diferencia del mebendazol el cual no tuvo efecto sobre la secreción de proteínas a esa concentración (Birkett et al., 1981).

A pesar de las evidencias mencionadas acerca del papel de los microtúbulos en la secreción de proteínas, existen otros estudios que sugieren que la secreción de proteínas es independiente del citoesqueleto (Virtanen, 1986), (Steward y Kenny, 1984). Inclusive otros estudios muestran que el mebendazol no solo no inhibe la secreción de proteínas, sino que en los islotes de páncreas es capaz de aumentar la liberación de insulina (Zawalich et al., 1986).

Esta serie de evidencias de que el citoesqueleto interviene en la secreción de proteínas y en el movimiento de organelos dentro de la célula, es apoyado por el descubrimiento de una serie de moléculas a las que se les ha dado el nombre de proteínas motor de microtúbulos ya que se ha sugerido que éstas pueden ser capaces de movilizar estructuras subcelulares tales como mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico y vesículas tanto secretoras como endocíticas a lo largo de los microtúbulos.

A estas moléculas se les ha clasificado dentro de 3 tipos: a) las que mueven a los organelos hacia el extremo positivo de los microtúbulos (movimiento anterógrado) b) las que son capaces de mover estructuras hacia el extremo negativo (movimiento retrógrado) y c) las que provocan que los microtúbulos se separen. Del primer tipo tenemos a la cinesina y a una serie de moléculas que presentan homología estructural con ésta, mientras que del segundo tipo se conoce solamente a la dineína y del tercer tipo se conoce a la dinamina.

La cinesina fue descubierta y purificada en 1985 (Vale et al., 1985a, d) a partir del axoplasma de calamar y se observó que tenía la propiedad de mover esferas de plástico sobre los microtúbulos (Vale et al., 1985 a, d).

La cinesina es una proteína de 2 cadenas pesadas de alrededor de 124 kDa y 2 cadenas ligeras de aproximadamente 64 kDa.

Hasta hace poco tiempo se consideró a la cinesina como una proteína única y ampliamente distribuida, sin embargo, en los últimos años se han descubierto una serie de moléculas que muestran cierta homología con la cadena pesada de la cinesina y se les ha llegado a colocar dentro de una familia donde todos los miembros tienen una región similar con un promedio de homología al dominio "motor" de la cinesina de alrededor del 40 %.

Los miembros de la familia de la cadena pesada de la cinesina se muestran en la Tabla 4. De todos estos miembros solo la cinesina y la Eg5 han sido encontradas en vertebrados, mientras que solo en KAR3 y ncd se ha mostrado evidencia directa de su unión a microtúbulos.

La dineína es un polipéptido de alrededor de 150 kDa y es otra proteína generadora de fuerza que también ha mostrado la capacidad de mover sustancias inertes.

Se ha detectado dineína inmunoreactiva asociada a organelos con membrana, además es una proteína "motor" que probablemente interviene en la mitosis, ya que se ha demostrado su presencia cerca del cinetocoro de cromosomas mitóticos mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Del tercer tipo de proteínas "motor" de microtúbulos la proteína más conocida es la dinamina que es una proteína de alrededor de 100 kDa que tiene la habilidad de provocar que los microtúbulos que se encuentran agrupados se separen unos de otros en presencia de GTP ya que posee actividad de GTPasa, por lo que se le ha colocado dentro de una familia nueva con capacidad de unión a GTP.

Aunque la función de esta proteína no se conoce del todo, se sugiere que participa en el transporte de estructuras con membrana particularmente en neuronas, ya que es abundante en tejido neuronal (Bloom, 1992).

III. ANTECEDENTES.

Las patologías fibrosantes se caracterizan por un depósito excesivo de colágenas, lo que conduce a una alteración de la arquitectura del tejido. En la cirrosis hepática existe una desorganización del parénquima hepático por interconexión de fibras cicatriciales, formación de nódulos de regeneración y pérdida de la relación en la vascularización normal.

Se han diseñado y estudiado fármacos que pueden interferir o inhibir selectivamente el metabolismo de las colágenas, respecto a su síntesis, secreción, maduración y degradación. Entre los fármacos utilizados se encuentran análogos de prolina, colchicina, vinblastina etc.

Una de las estrategias más interesantes para el tratamiento de la cirrosis hepática es la utilización de fármacos con propiedades antimicrotubulares ya que esta enfermedad es causada por el depósito excesivo de colágenas, que se debe en parte a la secreción aumentada de estas proteínas, las cuales requieren de un aparato microtubular intacto para su secreción .

Uno de los primeros fármacos con propiedades antimicrotubulares que se han experimentado en el tratamiento de la cirrosis hepática fue la colchicina, la cual demostró su

TABLA 4. Propiedades de la cadena pesada de la cinesina y las proteínas relacionadas con esta proteína.

PROTEÍNA	ESPECIES	UNIÓN A MICROTÚBULOS INVITRO	PROBABLE FUNCIÓN
CADENA PESADA DE LA CINESINA	<i>Drosophyla melanogaster</i> (mosca)	si	transporte de organelos
	<i>Loligopealeii</i> (calamar)	si	transporte de organelos
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (erizo de mar)	si	transporte de organelos
UNC-104	<i>D. melanogaster</i>	no determinado	transporte de vesículas sinápticas
ncd(cand)	<i>D. melanogaster</i>	si	disyunción en células germinales femeninas meióticas; mitosis
nod	<i>D. melanogaster</i>	no determinado	como ncd pero solo para no intercambiar cromosomas
KAR3	<i>Saccharomices cerevisiae</i> (levadura)	si (<i>in vivo</i>)	fusión nuclear después de la cariogamia; mitosis
bimC	<i>Aspergillus nidulans</i> (hongo)	no determinado	formación del huso mitótico y su separación hacia los polos
cut7	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (hongo que se reproduce por fisión binaria)	no determinado	formación del huso mitótico y su separación hacia los polos
Eg5	<i>Xenopus laevis</i> (sapo)	no determinado	desconocida; potencialmente migración pronuclear o mitosis

eficacia para mejorar el funcionamiento hepático y disminuir las posibilidades de muerte de pacientes tratados con este fármaco. Sin embargo, la colchicina presenta una serie de efectos colaterales que incluyen: náusea, diarrea, dolor abdominal e inclusive alopecia, agranulocitosis, anemia aplásica, miopatía, azoospermia entre otros (Kershenobich, 1988).

En este contexto se inició en nuestro laboratorio el estudio del mebendazol (MBZ) como posible agente antifibrosante, dado que tiene la capacidad de unirse a tubulina inhibiendo la formación de microtúbulos, se ha reportado inclusive que se une a estas estructuras con mayor afinidad que la colchicina (Laclette, 1980).

El MBZ es un fármaco que ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos intestinales. Este fármaco no presenta efectos sobre el sistema nervioso central, ni efectos analgésicos, hipnóticos o anticonvulsivos (Van den Bossche et al., 1982) y se elimina rápidamente por vía fecal y urinaria (Keystone, 1979).

La administración crónica del compuesto a ratas normales no reveló cambios en la biosíntesis y en contenido de colágenas en distintos órganos (Morales y Díaz de León, 1984) mientras que el tratamiento de la cirrosis hepática experimental en ratas inducida con CCl_4 , mostró una disminución en la biosíntesis y contenido de colágenas, así como una mejoría histológica en hígado de ratas tratadas con MBZ. Además, la administración simultánea del compuesto y el agresor retardó el desarrollo de la cirrosis (Páez y Díaz de León, 1985).

El tratamiento de pacientes con cirrosis hepática reveló una disminución en la concentración de colágena, mejoría histológica y del funcionamiento hepático en general (Ocampo y Díaz de León, 1984).

El estudio del mecanismo de acción del fármaco se realizó sobre cultivos de fibroblastos y macrófagos. Se observó una acumulación intracelular de colágena tipo I y una disminución de ésta en la matriz extracelular de fibroblastos sometidos a diferentes concentraciones del compuesto (Soto et al., 1996). Los cultivos de fibroblastos incubados con medios condicionados de macrófagos expuestos a diferentes concentraciones de mebendazol mostraron un incremento de la actividad colagenolítica (Rosas y Díaz de León, 1988).

Los hepatocitos son los encargados de la funcionalidad hepática, sintetizan una gran cantidad de proteínas de suero tales como albúmina y transferrina. constituyen el 90 % de la masa hepática aunque solo representan el 60 % del total de células hepáticas, son las únicas células de origen endodérmico que se encuentran en contacto con colágena tipo I. Se ha observado que los hepatocitos sintetizan distintos tipos de colágenas y se ha propuesto que contribuyen de manera significativa en la síntesis de colágenas tanto en condiciones normales como en condiciones de cirrosis (Chojkier y Brenner, 1988).

Dado que los hepatocitos contribuyen con la mayor proporción de biomasa en el hígado y a que son los encargados de la funcionalidad hepática, sintetizan y secretan una gran cantidad de proteínas tanto de matriz extracelular como de suero y a que el mebendazol a mostrado ser eficaz al evitar la secreción de colágenas en cultivos de fibroblastos, se hizo necesario conocer el efecto de este fármaco sobre la síntesis de proteínas en cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de ratas normales y cirróticas.

IV. HIPÓTESIS.

Dado que los pacientes mejoran al ser tratados con MBZ y a que los hepatocitos son los encargados de la funcionalidad hepática, entonces el MBZ ejerce su efecto inhibiendo la secreción de colágenas y activando colagenasas en fibroblastos pero sin afectar a los hepatocitos en su viabilidad y síntesis de proteínas tanto en los obtenidos de ratas normales como los de cirróticas.

V. OBJETIVOS.

El objetivo principal del presente trabajo fue determinar el efecto del mebendazol sobre la síntesis de proteínas (albúmina y transferrina) de hepatocitos obtenidos de ratas normales y cirróticas.

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

a) Realizar un estudio comparativo de la síntesis de proteínas (albúmina y transferrina) en cultivos primarios de hepatocitos derivados de hígados de ratas normales y cirróticas.

b) Determinar el efecto de diferentes concentraciones de mebendazol (10-100 µg/ml) sobre la síntesis de proteínas (albúmina y transferrina) de cultivos de hepatocitos obtenidos de hígados de ratas normales y cirróticas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y del mejor grado disponible, siendo en su mayoría de grado analítico. Los reactivos de uso frecuente tales como sales fueron de la marca Merck, mientras que los ácidos y reactivos líquidos en general fueron de la marca Baker. El mebendazol (metil N-5 (6) benzoil 1-2 benzimidazolil-carbamato) fue donado por los laboratorios Janssen Pharmaceutic de México; el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) fue preparado a partir de aminoácidos de la marca Sigma, la mezcla de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B) se obtuvo de la misma marca, la Leu ³H y la Pro ¹⁴C fueron obtenidas de Amersham, mientras que todos los reactivos de electroforesis se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories.

Inducción de la cirrosis hepática.

La inducción de cirrosis hepática se llevó a cabo en ratas de la cepa Wistar de 6 semanas de edad como se describió anteriormente (Rojkind y Díaz de León, 1970), para ello se inyectó a

las ratas por vía intraperitoneal 0.2 ml de una solución de CCl_4 en aceite de olivo en una dilución de 1-7, 3 veces por semana hasta lograr 10 inyecciones.

Para los cultivos de ratas normales se utilizó la misma cepa de ratas de 9 semanas de edad. Inicialmente se trabajó en colaboración con el grupo del Dr. Tomás Mendoza en el Laboratorio de Toxicología Hepática del Departamento de Farmacología del CINVESTAV del IPN, quienes tienen estandarizado un sistema de cultivo de hepatocitos (método 1) que consiste a grandes rasgos en lo siguiente: los hepatocitos se siembran sobre el plástico de cajas de cultivo de la marca Falcon a una densidad de 50000 cel/cm² en presencia de medios DMEM condicionados por fibroblastos de la línea 3T3 y con 7 % de suero de ternera.

Para definir las condiciones de marcaje se probaron diferentes concentraciones de suero en medios normales y condicionados por células 3T3 y se midió la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH) acumulada durante 24 hrs. en cultivos de 24 y 48 hrs. (Tabla 5). Los resultados mostraron que el medio condicionado mantiene en mejores condiciones a los hepatocitos, además de que morfológicamente se observaron en buen estado aún a la menor concentración de suero, por lo que se decidió trabajar con medios condicionados con 1% de suero.

Con este sistema de cultivo se midió la incorporación de Leu^3H a diferentes tiempos de cultivo, para lo cual 24 hrs. antes de recoger las muestras, se alimentó con medio que contenía 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de Leu^3H . A estas muestras, de monocapa y de medio, se les determinó incorporación de marca radiactiva por precipitación con TCA y se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 %, los cuales fueron tratados para autorradiografía. Además, se probaron diferentes concentraciones de MBZ en cultivos de hepatocitos de 24 hrs. de sembrados, de cuyas muestras se aplicaron las técnicas anteriormente mencionadas, además de la prueba de liberación de LDH.

Dado que los medios condicionados contienen factores que no conocemos, decidimos estandarizar un sistema de cultivo de hepatocitos en el que pudieramos controlar los componentes del medio y evitar la desventaja de utilizar suero en el medio (lo cual no es posible si se utilizan medios condicionados por fibroblastos). Para este fin se evaluaron una serie de técnicas de aislamiento de hepatocitos hasta lograr una técnica propia. Posteriormente se procedió a estandarizar la técnica de cultivo de estas células, para ello, se ensayaron una serie de substratos, presencia o ausencia de suero bovino fetal (SBF) en el medio y diferentes densidades de siembra de hepatocitos y se midió adhesión celular y duración en cultivo (Acosta y Díaz de León, 1994)

Cultivos celulares.

En este punto se describe la técnica final de cultivo que se utilizó para el desarrollo de este trabajo.

Se establecieron cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de hígados de ratas normales y cirróticas.

Para el aislamiento de los hepatocitos se utilizó el método de Berry y Friend (1969) modificado por Seglen (1972) que consiste en lo siguiente: se perfundió el hígado de la rata *in situ* con una solución salina (que contenía glucosa 5.5 mM, NaCl 137 mM, KCl 50 mM, Na_2HPO_4 0.4 mM Tris-HCl 25 mM pH 7.4 y rojo de fenol al 0.01 %.) a una velocidad de 10 ml/min. durante 10 minutos, mientras se retiró el hígado de la rata. Posteriormente, se hicieron

recircular a través del órgano una solución de colagenasa (1 mg/ml) disuelta en solución salina a una velocidad de 10 ml/min durante 15 minutos. A continuación se disgregó el hígado en solución salina, se filtró y se dejaron sedimentar los hepatocitos durante 5 minutos, después de ello se retiró la solución salina y se agregó medio de cultivo en el que se resuspendieron las células para posteriormente medir la viabilidad con azul tripán.

Para el cultivo de hepatocitos se utilizaron muestras con una viabilidad mayor del 80 %. Los hepatocitos fueron sembrados en medio de cultivo (DMEM) sobre cajas de cultivo de 60 x 15 mm de la marca LUX cubiertas 10 µg de colágena tipo I por cm² a una densidad de 50 000 células por cm² y en presencia de 10 % de SBF de la marca HYCLONE, se les permitió adherir durante 2 hrs, después de lo cual se les hizo un cambio de medio para retirar las células que no se adhirieron. Posteriormente se realizaron cambios de medio cada 24 hrs, hasta el inicio del tratamiento.

Experimentos preliminares.

Para determinar la concentración adecuada de isótopo se desarrolló una curva de incorporación a diferentes concentraciones de los aminoácidos radiactivos en las proteínas de los hepatocitos, para lo cual se usaron cultivos de hepatocitos de 24 hrs, se incubaron durante 24 hrs. con los isótopos y se determinó incorporación de marca radiactiva por precipitación con TCA; para ³H-Leu se utilizaron las concentraciones de 1, 3, 5 y 10 µCi/ml de medio, mientras que para ¹⁴C-Pro se utilizaron las concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5 y 1 µCi/ml de medio. La incorporación de la marca aumentó de manera lineal conforme se incrementó su concentración (resultados no mostrados), por lo que se decidió utilizar 10 µCi de ³H-Leu y 1 µCi de ¹⁴C-Pro en los experimentos posteriores.

Incorporación de aminoácidos radiactivos en proteínas a diferentes tiempos de cultivo.

Inicialmente se midió la incorporación de ³H-Leu y de ¹⁴C-Pro a diferentes tiempos de incubación, para lo cual, después de sembrar los hepatocitos, se les permitió la adhesión al sustrato durante 2 horas en presencia de SBF; posteriormente se retiró el medio con SBF y se alimentó con medio sin SBF, media hora después se incubó con 10 µCi de ³H-Leu/ml de medio, y se fueron colectando muestras a 6, 12, 18, 24 y 48 hrs. Se observó que la incorporación aumentó de manera lineal hasta las 48 hrs (resultados no mostrados), de manera que se decidió utilizar un tiempo de marcaje de 24 hrs.

Para evaluar el efecto del suero sobre la integridad celular, se alimentaron los cultivos de 24 hrs. de sembrado con diferentes concentraciones de SBF en el medio. Después de 24 hrs. se recogieron muestras de capa y medio y se midió la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH) como prueba de integridad celular, y se observó que los cultivos en ausencia de SBF liberaron menor cantidad de LDH que en presencia de suero (Fig. 9), por lo que se decidió utilizar el medio sin suero para llevar a cabo los experimentos de incorporación de marca radiactiva.

Síntesis de proteínas a diferentes tiempos de cultivo y a diferentes concentraciones de MBZ.

Para hacer un estudio comparativo de la síntesis de proteínas se realizaron experimentos de marcaje con Leu ^3H 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de medio y pro ^{14}C 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de medio a diferentes tiempos de cultivo (24, 48, 72 y 96 hrs.); para lo cual 24 hrs. antes de recoger las muestras tanto de capa como de medio, los cultivos se lavaron con medio sin suero. Después de ello, se agregó nuevamente medio sin suero en el que permanecieron durante 30 minutos, y posteriormente se agregó el aminoácido radiactivo en medio sin SBF. Para conocer el efecto del mebendazol sobre la síntesis de proteínas se utilizaron cultivos de 24 hrs; éstos se lavaron y se incubaron en ausencia de SBF 30 minutos antes de tratarlos con diferentes concentraciones de MBZ (0, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de medio) y Leu ^3H o Pro ^{14}C a las concentraciones ya mencionadas.

Pruebas de integridad celular.

Las pruebas de integridad celular se llevaron a cabo midiendo exclusión de azul tripán y liberación de LDH.

La prueba de exclusión de azul tripán se aplicó para determinar la viabilidad inicial de los hepatocitos recién aislados en los que se mezcló la suspensión de hepatocitos con un volumen igual de solución de azul tripán al 0.04 %. A continuación se contaron las células teñidas y las que no incorporaron el colorante. También se utilizó para determinar la viabilidad de cultivos ya establecidos, para ello se retiró el medio de cultivo y se agregó el colorante a una concentración del 0.04 % y se contaron las células teñidas y las que no incorporaron el colorante y a partir de estos datos se determinó el porcentaje de viabilidad.

Para determinar la integridad de la membrana de las células se cuantificó la LDH tanto en capa como en medio con la técnica de Mitchell et al. (1980) que consistió en lo siguiente: primero se preparó la solución amortiguadora de fosfatos (Na_2PO_4 1 M pH 7.4), en la que se prepararon las soluciones de NADH .003 M y la de piruvato de sodio 0.011 M; además, se preparó una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %. Las muestras a determinar (de capa y de medio) fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 3 min, de éstas se tomaron alícuotas de 33.3 μl y se colocaron en tubos de ensayo en baño de María (37 °C), se les agregó 833.3 μl de solución amortiguadora de fosfatos y 67 μl de la solución de NADH 0.003 M, posteriormente a cada tubo se le agregó 67 μl de la solución de piruvato de sodio .011 M, y se incubó durante 5 minutos a 37 °C. La incubación se terminó por adición de 100 μl de SDS al 10 % y se determinó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro DU^R-65 de la marca BECKMAN siendo el blanco de reactivo agua destilada. Para comparar las lecturas se midió la absorbancia de un tubo al que se le agregó agua en lugar de la muestra (Tc) y otro tubo al que se le agregó SDS al 10 % antes de agregar el piruvato de sodio (To). Para determinar las unidades de LDH en las muestras se les aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{U \text{ de LDH}}{\text{ml de medio}} = \frac{(T_c - T_m)(1.1)(10000)(1.16)}{5}$$

En la que Tm es la absorbancia de cada muestra.

Cuantificación del DNA.

La cuantificación de DNA se llevó a cabo utilizando el método de Labarca y Paigen (1979). El procedimiento es el siguiente: se colocaron 2800 μ l de amortiguador de fosfatos (Na_3PO_4 0.05 M, NaCl 2.0 M a pH 7.4) y se agregaron 200 μ l de muestra hasta lograr un volumen de 3 ml y el reactivo de Hoechst 33258 se utilizó a una concentración de $1\mu\text{g/ml}$. Se preparó el blanco de reactivo y contra éste se leyó en un fluorómetro Perkin-Elmer a 360 nm de excitación y a 460 nm de emisión.

Para cuantificar las muestras problema se preparó una curva patrón en la que se utilizaron diferentes concentraciones de DNA de timo de ternera (0.1, 0.3, 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$)

Determinación de número de células en los cultivos.

Para determinar el número de células en los cultivos ya establecidos, las cajas se lavaron con verseno y se les agregó 500 μ l de una solución de tripsina en verseno al 0.25 % y se resuspendieron en ésta, finalmente se les agregó 500 μ l de medio con 10 % de suero y se contaron en un hemocitómetro.

Cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976) que consiste en lo siguiente: se elaboró una curva patrón en la que se colocaron diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina desde 0 a 10 μg de albúmina por tubo y se agregó 1 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, 2 μ l de cada una de las diferentes muestras de la capa del cultivo se colocaron en tubos de ensaye y se les agregó el reactivo de Bradford y se leyó en un espectrofotómetro DU^R-65 de la marca BECKMAN a una λ de 595 nm. El reactivo de Bradford se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 100 mg de Azul Brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95 % y se les agregaron 100 ml de una solución de ácido fosfórico al 85 %; finalmente se aforó a 1 litro.

Incorporación de marca radiactiva.

Para la incorporación de marca radiactiva se utilizó el método de Peterkofsky y Diegelmann (1971) para ello primero se colocaron muestras de 100 μ l en viales, posteriormente se les agregaron 25 μ l de albúmina sérica bovina al 4 %, 80 μ l de tris 0.05 M con CaCl_2 5mM a pH 7.4 y 115 μ l de agua, se agitaron y se les agregaron 80 μ l de una solución de ácido tricloroacético al 50 % y ácido tánico al 0.75 %, se agitaron nuevamente y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio previamente embebidos en solución de TCA al 8 % que contenía Leu 1 mg/ml. Las proteínas retenidas en el filtro se lavaron con TCA al 8 %; los filtros se colocaron en viales y se dejaron secar para posteriormente agregar 2.5 ml de líquido de Bray y finalmente se les determinó la radiactividad incorporada en un contador de centelleo modelo LS 1801 de la marca BECKMAN.

Autorradiografías.

Las autorradiografías se realizaron a partir de geles de poliacrilamida, los cuales se prepararon al 6 % o al 7.5 % en una cámara Mini-PROTEAN II de la marca BIORAD y fueron

teñidos con Azul de Coomasie. Posteriormente se prepararon para autorradiografía, tratándolos con amplificador de la marca AMERSHAM durante media hora y se les secó en papel celofán dulce. Los geles se colocaron frente a películas Hyperfilm-MP de la marca AMERSHAM durante 15 o 30 días y a -70°C , para marcaje con Pro^{14}C o Leu^3H , respectivamente.

Inmunotransferencias.

Para las inmunotransferencias las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % en la cámara Mini-PROTEAN-II de la marca BIORAD. Posteriormente, los geles fueron transferidos a papel de nitrocelulosa, para ello el papel se colocó frente al gel en una cámara de transferencia de la marca BIORAD en presencia de amortiguador de transferencia y se le aplicó corriente eléctrica a una intensidad de 200 mA durante 140 minutos.

Al papel de nitrocelulosa se le trató de la siguiente manera: se le cubrió con una solución de leche al 3 % en PBS y se dejó incubando a 4°C durante 15 hrs.. Terminado el tiempo se lavó con PBS 3 veces, cada una de 10 minutos, después se agregó el anticuerpo primario a una dilución de 1:400 para albúmina o 1:100 para transferrina en una solución de leche al 1 % en PBS y se incubó 90 minutos a temperatura ambiente con agitación continua, posteriormente se lavó 1 vez con una solución de PBS-Tween 20 al 0.3 % y 3 veces con PBS, cada lavado fue de 10 minutos y en agitación continua. Luego se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo acoplado a biotina) a una dilución 1:1000 en una solución de leche al 1 % en PBS y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente, a continuación se lavó el papel de manera similar a después de agregar el primer anticuerpo. Posteriormente se agregó avidina-peroxidasa a una dilución 1-1000 en una solución de leche al 1 % en PBS y se incubó durante 40 minutos, después de ello se lavó de la manera anteriormente mencionada y se detectaron las bandas inmunoreactivas con una solución de 3,3 diaminobenzidina al 0.05 % y H_2O_2 al 0.02 %.

Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como promedios de triplicados y su desviación estándar, excepto en las inmunotransferencias. Se aplicó la prueba de significancia de t de Students para evaluar las diferencias entre grupos, aceptando $p < 0.05$ como el nivel de significancia.

VII. RESULTADOS

Nosotros utilizamos 2 sistemas de cultivo de hepatocitos para evaluar el comportamiento de éstos y el efecto del mebendazol sobre la síntesis de proteínas. Presentamos primero los resultados obtenidos en uno de los sistemas de cultivo (el sistema que ya había sido estandarizado).

Resultados obtenidos con el método 1

Para establecer las condiciones de marcaje se realizó un experimento en el que se comparó el medio normal con el medio condicionado, además de probar el efecto de diferentes concentraciones de suero en el medio y se observó tanto a nivel morfológico (no mostrado) como al medir la integridad celular (Tabla 5), que en el medio condicionado fue menor la liberación de

LDH que en el medio normal. Además, se observó que los cultivos se mantuvieron en buenas condiciones con la mínima concentración de suero en el medio (1 %), por ello se decidió utilizar medio condicionado para alimentar los cultivos y 1 % de suero para agregar el aminoácido radiactivo.

TABLA 5. Actividad de la LDH en medios obtenidos de cultivos de hepatocitos sembrados en medios normal y condicionado en presencia de diferentes concentraciones de suero.

MEDIO (DMEM)	2-24 HORAS UNIDADES/ml DE MEDIO	24-48 HORAS UNIDADES/ml DE MEDIO
NORMAL 0 % DE SUERO	125±40	161±42
NORMAL 1 % DE SUERO	265±52	170±18
NORMAL 3 % DE SUERO	297±86	138±27
NORMAL 7 % DE SUERO	300±18	136±22
CONDICIONADO 1 % DE SUERO	268±90	97±49
CONDICIONADO 2 % DE SUERO	330±54	74±10
CONDICIONADO 3 % DE SUERO	325±47	51±9
CONDICIONADO 7 % DE SUERO	271±39	55±7

Para determinar el efecto del MBZ sobre la integridad de los cultivos se midió la liberación de la LDH en el medio de los cultivos y se observó que a las 48 hrs. la actividad de la enzima fue menor que a las 24 hrs. A las 24 hrs, se observó que el MBZ no tenía efecto a ninguna de las concentraciones ensayadas, sin embargo, en las concentraciones más altas se observó una ligera tendencia a disminuir la actividad de la enzima en el medio, mientras que a las 48 hrs. se observó una clara disminución en la actividad de la LDH en el medio conforme se aumentó la concentración del MBZ (Fig. 2).

Para evaluar el comportamiento del cultivo en cuanto a síntesis y secreción de proteínas, se decidió incubar a los hepatocitos de diferentes tiempos de cultivo con aminoácidos radiactivos ($^3\text{H-Leu}$) y se observó que los hepatocitos aumentan su actividad metabólica en cuanto a síntesis y secreción de proteínas conforme aumenta el tiempo de cultivo, siendo mayor la incorporación del aminoácido en la monocapa que en el medio en todos los tiempos evaluados. Todos los tiempos fueron estadísticamente diferentes con respecto al primer día, tanto en la monocapa como en el medio ($p < 0.05$), en la monocapa se observó un incremento más pronunciado en las primeras 48 hrs. En el medio el incremento en la incorporación fue constante (Fig. 3A). En las autorradiografías de las muestras mencionadas (Fig. 3B) se observó un patrón electroforético que no se modificó a lo largo del tiempo en las muestras de la monocapa, mientras que en las de el medio se observó un incremento en la tinción de las bandas. De particular interés son las bandas que se observan entre los 65 y 80 kDa ya que éstas son las que corresponden al peso molecular de la albúmina y de la transferrina. Ambas bandas aumentaron de intensidad conforme incrementó el tiempo de cultivo.

Para evaluar el efecto del MBZ se decidió utilizar cultivos de 24 hrs. e incubar en presencia del fármaco durante 24 hrs. más, ya que a las 48 hrs de cultivo se observó la menor liberación de la LDH.

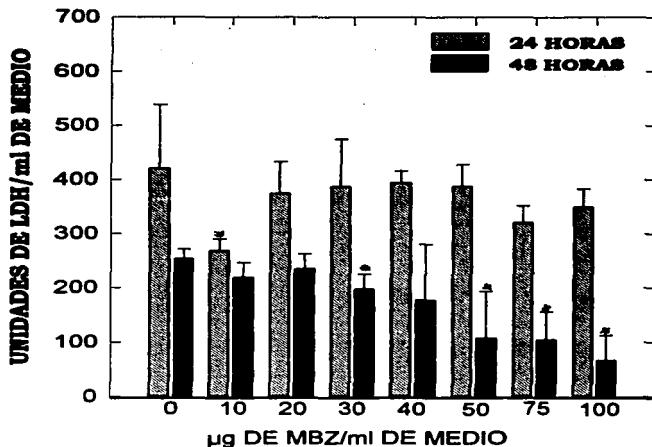


Fig. 2. Efecto del MBZ sobre la liberación de la LDH al medio en cultivos de hepatocitos mantenidos en las condiciones mencionadas para el método I (los hepatocitos fueron sembrados sobre el plástico de la caja de cultivo y alimentados con medios condicionados por células 3T3). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$)

El efecto del MBZ se presenta en la Figura 4, donde se puede observar que el compuesto carece de efecto en todas las concentraciones ensayadas y que la incorporación en capa en este tiempo es alrededor del doble de lo observado en el medio, lo cual concuerda con los experimentos anteriores. El patrón electroforético de las muestras mencionadas (Fig. 5) no mostró diferencias claras o alguna tendencia en la monocapa (A) o en el medio (B).

Validación del sistema de cultivo implementado.

Dado que los resultados obtenidos con el método 1 tienen el inconveniente de que se realizaron en presencia de suero al 1 % (que contiene albúmina y transferrina), además de que los medios con los que se alimentaron los cultivos contenían los productos de secreción de los fibroblastos, nosotros decidimos estandarizar un sistema de cultivo que no presentara estos inconvenientes y fuera más adecuado para alcanzar nuestros objetivos propuestos.

Los cultivos de hepatocitos obtenidos con el método implementado fueron analizados evaluando su morfología, integridad celular, número celular y cantidad de DNA a diferentes tiempos de cultivo. Los resultados se presentan en la Figura 6, en la que se puede ver que los cultivos mantienen una viabilidad mayor al 95 % en todos los tiempos evaluados, la liberación de la LDH al medio fue menor al 20 % con respecto a la cantidad de la enzima en la monocapa, lo

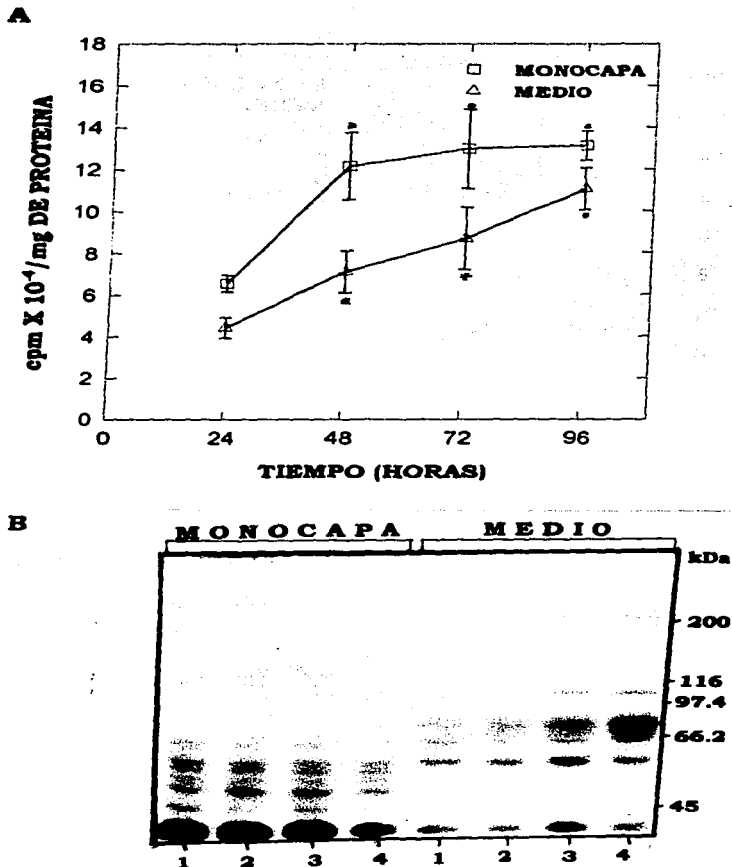


Fig. 3. Incorporación de ^3H -Leu en proteínas de cultivos de hepatocitos mantenidos en las condiciones del método 1 durante diferentes tiempos. Los cultivos se incubaron con el aminoácido radiactivo 24 hrs. antes de obtener las muestras. A) Incorporación de ^3H -Leu en proteínas precipitables con TCA. B) Fluorografías de las muestras ya mencionadas; 1) 24 hrs.; 2) 48 hrs.; 3) 72 hrs.; 4) 96 hrs. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$)

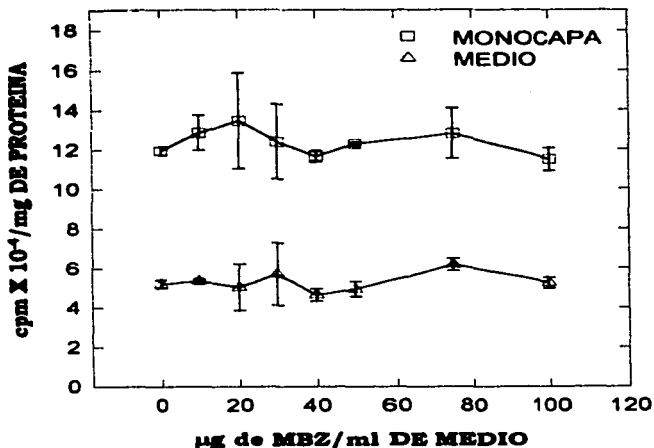


Fig. 4. Efecto del MBZ sobre la incorporación de ^3H -Leu en proteínas precipitables con TCA de hepatocitos obtenidos de rata normal y cultivados en presencia de diferentes concentraciones de MBZ ($\mu\text{g/ml}$) en las condiciones mencionadas para el método 1.

cual indica que se mantuvieron en buen estado, sin embargo, a las 48 hrs. la cantidad de la LDH fue menor comparada con los otros tiempos. El número celular se mantuvo casi constante al menos durante 48 hrs. y de manera similar la concentración de DNA también se mantuvo hasta las 72 hrs.

La morfología de los cultivos de hepatocitos normales se puede observar en la Figura 7 y la de los hepatocitos obtenidos de hígado cirrótico en la Figura 8. En estos cultivos los hepatocitos presentan la típica morfología poligonal, forman una monocapa continua y se encuentran bien extendidos cubriendo el total de la caja de cultivo con escasas zonas que carecen de células.

Los hepatocitos derivados a partir de ratas cirróticas presentan una mayor cantidad de gránulos dentro del citoplasma que los hepatocitos obtenidos a partir de ratas normales; además, se observa mayor cantidad de espacios intercelulares, los cuales son también de mayor tamaño en los cultivos obtenidos a partir de ratas cirróticas.

Síntesis de proteínas a diferentes tiempos de cultivo.

Para conocer la capacidad biosintética de los cultivos de hepatocitos, se llevaron a cabo experimentos de marcaje con isótopos radiactivos (^3H -Leu y ^{14}C -Pro), de los cuales se dieron pulsos de 24 hrs. en cultivos de diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la figura 10 en

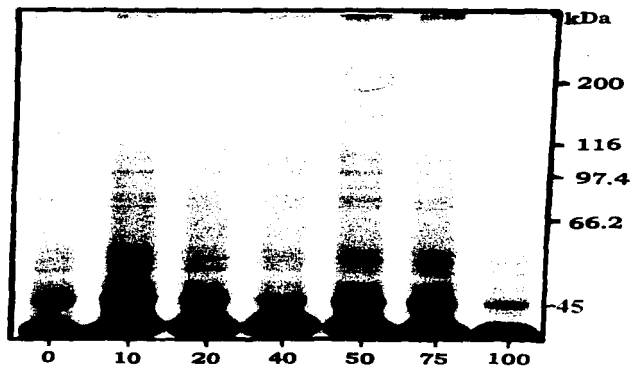
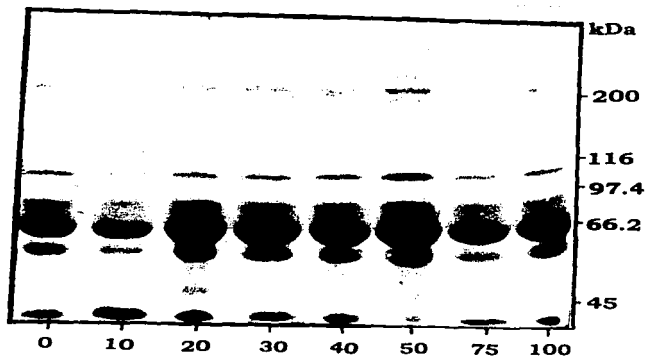
A**B**

Fig. 5 Autorradiografías de las muestras de monocapa (A) y medio (B) obtenidas de cultivos de hepatocitos de rata normal y mantenidos en presencia de diferentes concentraciones de MBZ ($\mu\text{g/ml}$) en las condiciones mencionadas para el método 1.

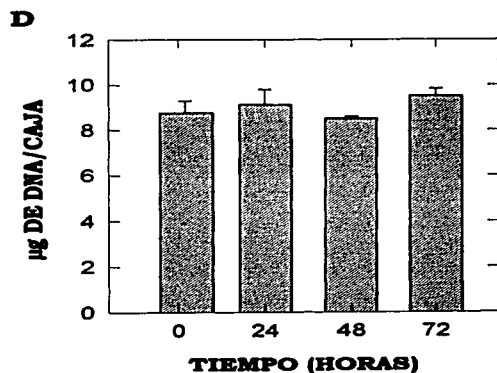
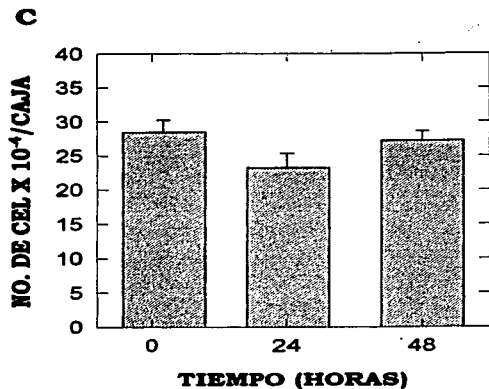
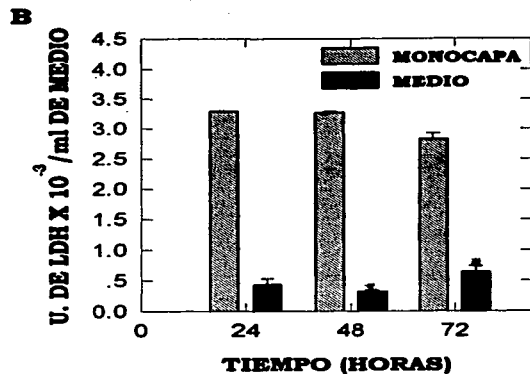
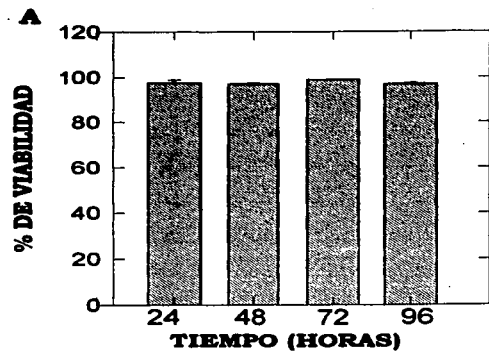


Fig. 6. Parámetros de integridad celular a diferentes tiempos de cultivo. A) Porcentaje de viabilidad calculada por medio de la técnica de exclusión de azul tripán; B) unidades de la LDH calculadas tanto en la monocapa como en el medio de cultivo; C) número de células por caja de cultivo; D) cantidad de DNA por caja de cultivo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$)

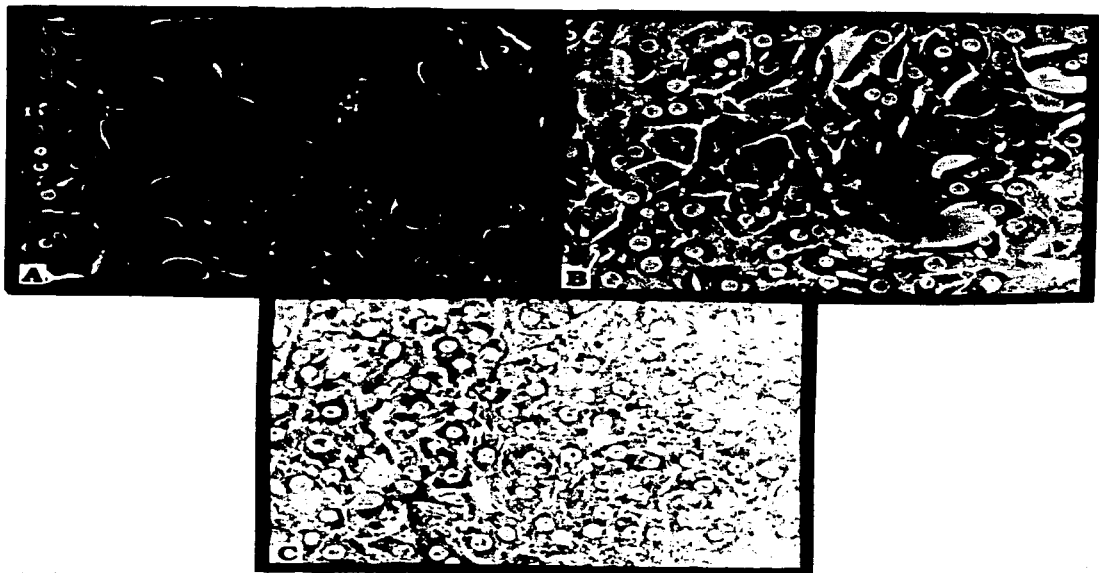


Fig. 7. Micrografías de hepatocitos obtenidos a partir de ratas normales, cultivados con la técnica implementada y mantenidos durante diferentes tiempos. Los hepatocitos fueron fotografiados con una cámara Vivitar modelo M-1 y se muestran amplificados 685 veces. A) 48 hrs.; B) 72 hrs.; C) 96 hrs.

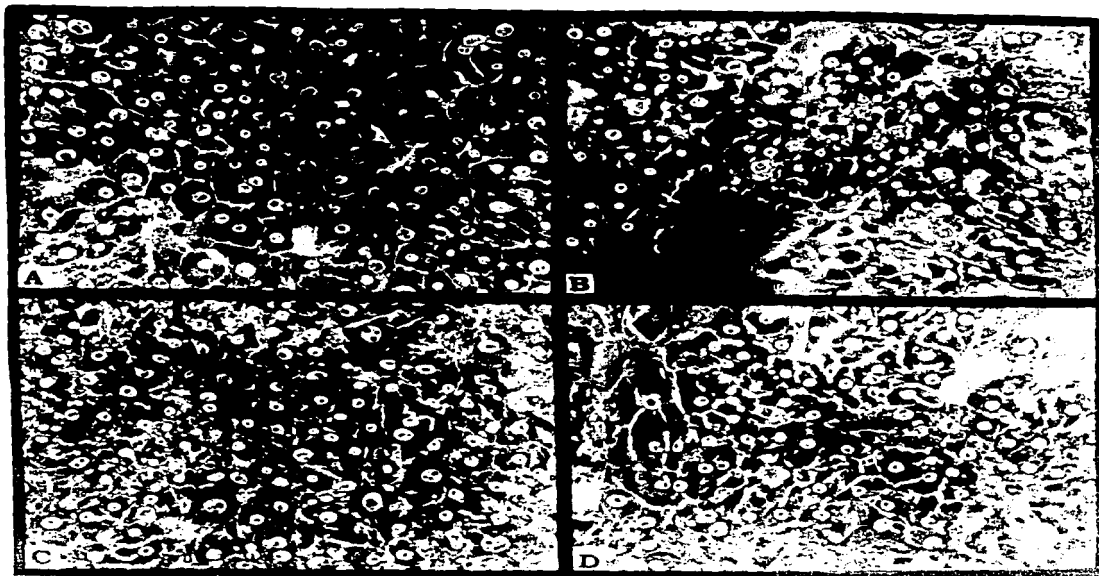


Fig. 8. Micrografías de hepatocitos obtenidos a partir de ratas cirróticas cultivados con la técnica implementada y mantenidos durante diferentes tiempos. Los hepatocitos fueron fotografiados con una cámara Vivitar modelo M-1 y se muestran ampliificados 549 veces A) 24 hrs.; B) 48 hrs.; C) 72 hrs.; D) 96 hrs.

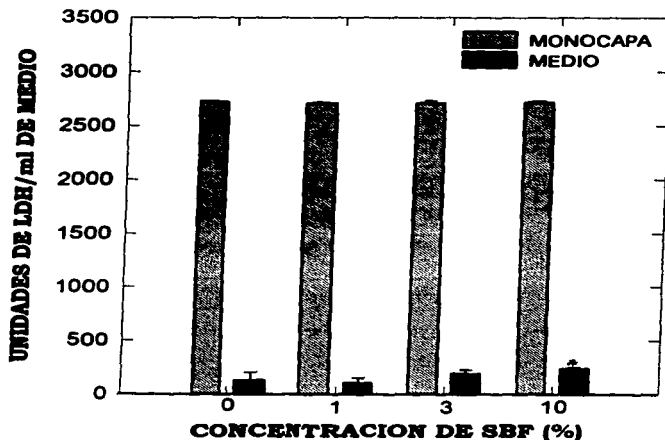


Fig. 9. Liberación de la LDH en cultivos de hepatocitos de 48 hrs a los que se les cultivó en presencia de diferentes concentraciones de SBF, en las condiciones del método implementado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$)

las que podemos ver que la incorporación de $^3\text{H-Leu}$ (Fig. 10A) en la monocapa aumenta conforme se incrementa el tiempo de cultivo, siendo la mayor incorporación a las 72 hrs. en hepatocitos normales, la cual representa un 169 % con respecto al control, mientras que a las 96 hrs., disminuye ligeramente. En los hepatocitos obtenidos de ratas cirróticas, la incorporación de aminoácidos aumenta en la monocapa con el tiempo de cultivo, siendo el mayor a las 96 hrs., lo cual corresponde a un 104 %. Es necesario mencionar que cada uno de los tiempos fue estadísticamente diferente con respecto a los valores obtenidos a las 24 hrs. tanto en hepatocitos obtenidos de ratas normales como de ratas cirróticas. La incorporación del aminoácido en el medio no se modificó de manera significativa con el tiempo de cultivo.

En las muestras obtenidas tanto de monocapa como de medio, la incorporación fue mayor en cultivos de rata normal, siendo más pronunciada la diferencia en la monocapa a las 72 hrs. de cultivo, donde la incorporación del aminoácido de las muestras obtenidas de ratas cirróticas representan un 63.5 % de las obtenidas de rata normal.

Para evaluar la posible síntesis de proteínas colagénicas se utilizó $^{14}\text{C-Pro}$ ya que las colágenas tienen un alto contenido de este aminoácido. Los resultados se presentan en la Figura 10B, en la que se observa que los cultivos cirróticos incorporaron $^{14}\text{C-Pro}$ en mayor proporción que los normales, excepto en la monocapa a los tiempos de 72 hrs. donde la incorporación fue

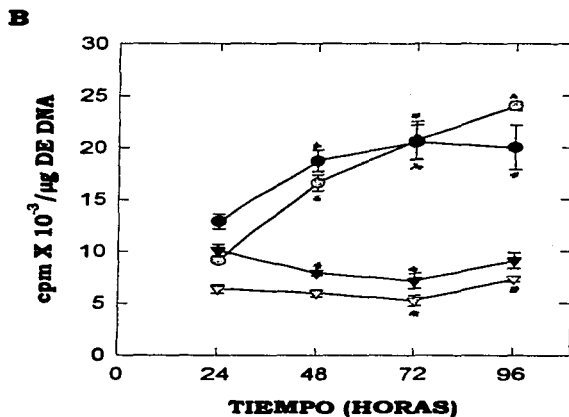
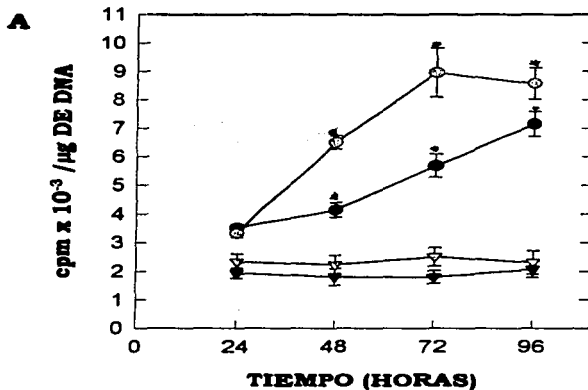


Fig. 10. Incorporación de $^3\text{H}\text{-Leu}$ (A) y $^{14}\text{C}\text{-Pro}$ (B) en proteínas precipitables con TCA de hepatocitos cultivados durante diferentes tiempos e incubados con el aminoácido radiactivo 24 hrs. antes de la obtención de las muestras. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$). ○ Monocapa y ▽ medio de cultivos de hepatocitos obtenidos a partir de ratas normales; ● monocapa y ▼ medio de cultivos de hepatocitos obtenidos a partir de ratas cirróticas.

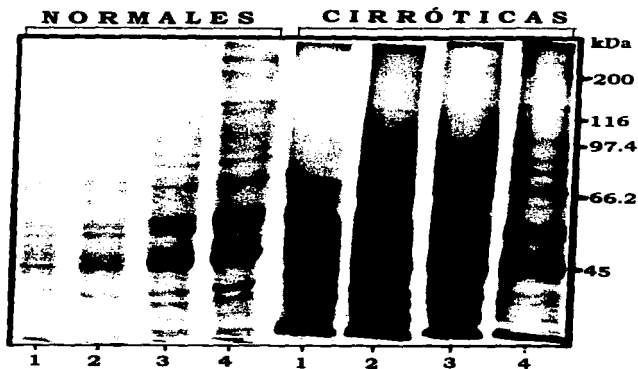
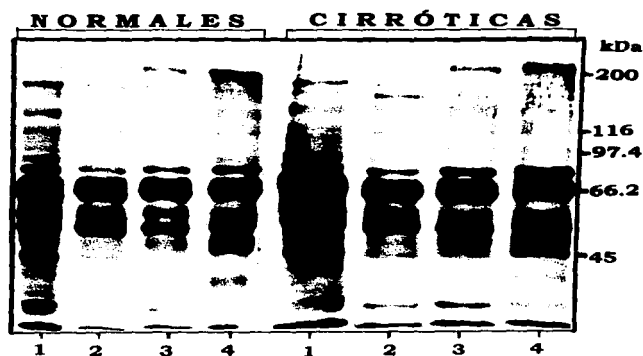
A**B**

Fig. 11. Autorradiografías de electroforesis cuyos gels fueron cargados con muestras obtenidas a partir de cultivos de hepatocitos de diferentes tiempos. Estos fueron incubados con ^{14}C -Pro, 24 horas antes de la obtención de las muestras de monocapa (A) y medio de cultivo (B). Carriles 1) 24 hrs.; 2) 48 hrs.; 3) 72 hrs.; 4) 96 hrs.

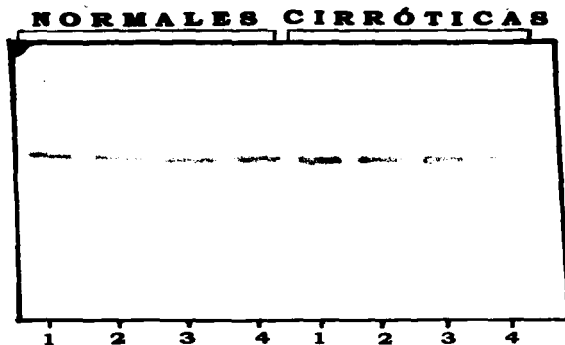
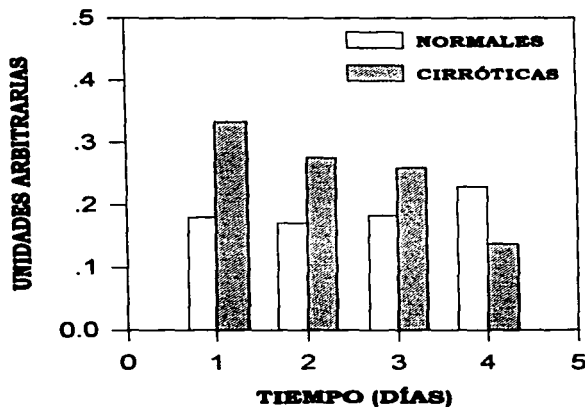
A**B**

Fig. 12. Inmunotransferencia de muestras de medio de cultivos de hepatocitos obtenidos de ratas normales y cirróticas a las que se les reveló con un anticuerpo antialbúmina (A) y la densitometría de la banda más intensa (B). Las muestras fueron obtenidas de cultivos de diferentes tiempos. 1) 24 hrs.; 2) 48 hrs.; 3) 72 hrs.; 4) 96 hrs.

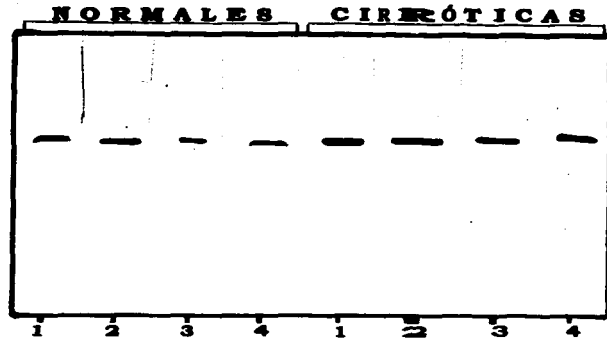
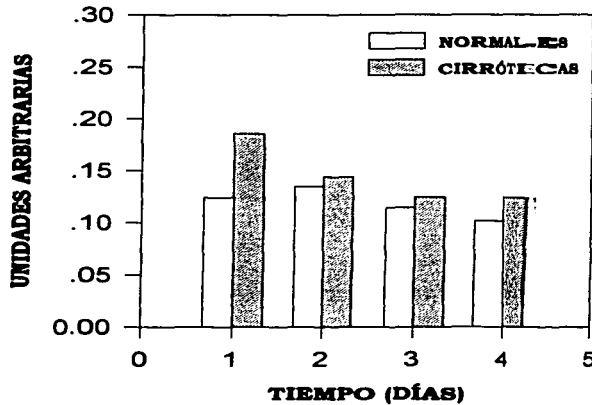
A**B**

Fig. 13. Inmunotransferencia de muestras de medio de cultivos de hepatocitos obtenidos de ratas normales y cirróticas a los que se les reveló con un anticuerpo anti-transferrina (A) y la densitometría de la banda más intensa (B). Las muestras fueron obtenidas de cultivos de diferentes tiempos. 1) 24 hrs.; 2) 48 hrs.; 3) 72 hrs. y 4) 96 hrs.

semejante y a las 96 hrs. en la que los cultivos obtenidos a partir de ratas cirróticas tuvieron una menor incorporación.

En el medio obtenido de ratas normales la incorporación disminuyó un 17 % hasta las 72 hrs., mientras que a las 96 hrs. la incorporación aumentó ligeramente (15 %) con respecto al primer día. En la electroforesis del medio obtenido de ratas cirróticas la incorporación disminuyó a las 48 y 72 hrs., alcanzando un 29 %, y finalmente se recuperó a las 96 hrs., donde alcanzó valores un 10 % mayores a los obtenidos en las primeras 24 hrs. El patrón electroforético correspondiente a las muestras mencionadas se presenta en la Figura 11, en la que se puede observar que en la monocapa (A) se mantuvo el mismo patrón a los distintos tiempos de cultivo, y que tampoco cambiaron al comparar entre hepatocitos obtenidos de ratas normales y cirróticas. En el medio en la región entre 170 y 190 kDa se pueden observar dos bandas que disminuyen conforme aumenta el tiempo de cultivo, mientras que en la región de más de 200 kDa se observa una banda que se incrementa conforme avanza el tiempo de cultivo. De particular interés para nuestro estudio, son las bandas que se encuentran en la zona entre 60 y 80 kDa, ya que el peso molecular de la albúmina es de 68 kDa mientras que el de la transferrina es de 80 kDa, en esta zona se observan 2 bandas muy intensas que posiblemente corresponden a las proteínas antes mencionadas.

Para conocer específicamente la secreción de albúmina y de transferrina se realizaron inmunitransferencias, las cuales fueron reveladas con anticuerpos antialbúmina (Fig. 12) y antitransferrina (Fig. 13).

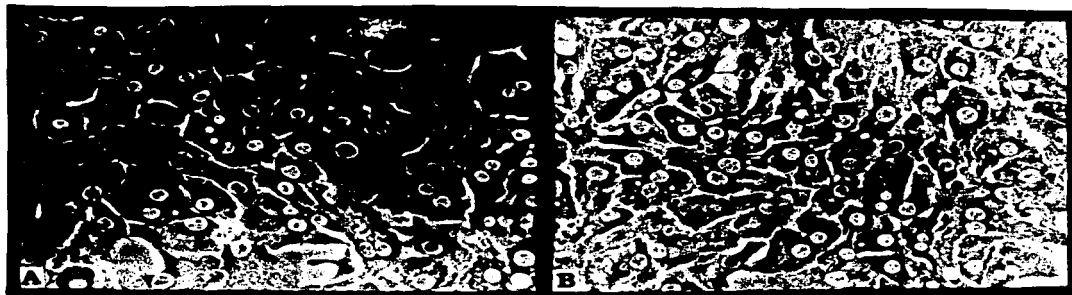


Fig. 14. Micrografías de hepatocitos obtenidos a partir de ratas normales amplificadas 685 veces. A) Cultivos de 48 horas; B) cultivos de 48 hrs. tratados con 100 µg de MBZ en las 24 hrs. previas.

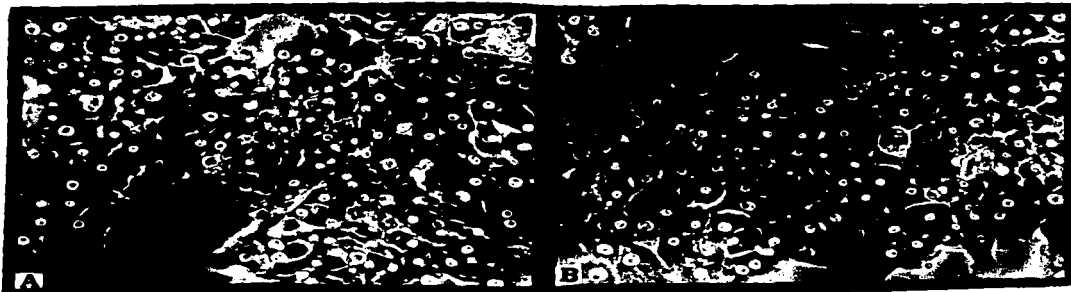


Fig. 15. Micrografías de hepatocitos obtenidos a partir de ratas cirróticas amplificados 549 veces. A) cultivos de 48 hrs.; B) cultivos de 48 hrs. tratados con 100 μ g de MBZ en las 24 hrs. previas.

Las inmunotransferencias antialbúmina y su respectivo análisis densitométrico (Fig 12) revelaron que los hepatocitos obtenidos de ratas cirróticas secretan una mayor proporción de albúmina inicialmente, sin embargo, conforme avanza el tiempo de cultivo disminuyen paulatinamente la secreción de la proteína a niveles menores que los hepatocitos normales, alcanzando un decremento del 59 %. A diferencia de los hepatocitos cirróticos, los hepatocitos normales, mantuvieron de manera constante su secreción de albúmina hasta las 72 hrs. Posteriormente se observa un incremento del 28 %.

La secreción de transferrina (Fig. 13) también fue mayor en los cultivos derivados de ratas cirróticas con respecto a las normales, aunque en las primeras 48 hrs. disminuyó un 22 % alcanzando valores semejantes y posteriormente la secreción disminuye ligeramente. En las muestras obtenidas de cultivos derivados de ratas normales, se observó una mayor secreción a las 48 hrs de cultivo y disminuyó ligeramente a las 96 hrs.

Efecto del mebendazol.

Antes de realizar los experimentos de incorporación de marca radiactiva, se incubó a los hepatocitos de 24 hrs. en presencia de diferentes concentraciones de MBZ y no se observó efecto del fármaco sobre la morfología de los cultivos de hepatocitos obtenidos de ratas normales (Fig. 14) o de cirróticas (Fig. 15).

Para conocer el efecto del MBZ sobre la síntesis de proteínas de los hepatocitos, se llevaron a cabo experimentos de incorporación de aminoácidos radiactivos en proteínas totales, electroforesis y las autorradiografías de los geles.

La incorporación de aminoácidos radiactivos se presenta en la Figura 16, en la que se puede observar que la incorporación de ^3H -Leu en hepatocitos normales no se afectó por el MBZ ni en la monocapa ni en el medio, siendo la concentración de $50 \mu\text{g/ml}$ la única concentración del fármaco que alcanzó una diferencia significativa, sin embargo, en la monocapa, en esta concentración, la incorporación también se incrementó con respecto a los demás valores de la monocapa.

Para conocer si podía determinarse una diferencia en cuanto a síntesis de proteínas en la cirrosis hepática, se hizo el mismo experimento con hepatocitos obtenidos de ratas cirróticas y se observó una disminución en la incorporación de ^3H -Leu del 35 % con respecto a los normales tanto en la monocapa como en el medio. Por otro lado la incorporación de marca no se modificó por el efecto del mebendazol ni en la monocapa ni en el medio.

Para conocer el efecto del MBZ sobre la síntesis de proteínas que se incrementan en la cirrosis hepática, tales como las colágenas, se utilizó ^{14}C -Pro para ver si la incorporación selectiva se modifica en caso de cirrosis hepática, y se observó que en ambos cultivos existe un comportamiento similar con una tendencia a disminuir la incorporación en proteínas de la monocapa conforme aumenta la concentración del fármaco, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Por otro lado, los hepatocitos obtenidos de ratas cirróticas mostraron un incremento del 7 % en la incorporación de ^{14}C -Pro en la monocapa mientras que en el medio se observó un aumento del 15 %, lo cual sugiere que existe una mayor producción de colágenas en los hepatocitos obtenidos de ratas cirróticas. Para detectar las posibles bandas de colágenas, se hicieron autorradiografías de estas muestras y se observó que no existen diferencias claras entre las diferentes concentraciones de MBZ en las bandas, ya sea en cultivos normales (Fig. 17) o cirróticos (Fig. 18), tanto en la monocapa (A) como en el medio (B). Sin embargo, al comparar las bandas en las autorradiografías de medios de cultivos de hepatocitos obtenidos a partir de ratas normales y cirróticas, no se observaron diferencias claras entre ambas muestras. Para determinar el efecto del mebendazol sobre la secreción de las proteínas albúmina y transferrina, se hicieron inmunotransferencias de las muestras ya mencionadas y se revelaron con anticuerpos antialbúmina (Figs. 19 y 20) y antitransferrina (Figs. 21 y 22) de muestras obtenidas a partir de ratas normales (Figs. 19 y 21) y cirróticas (Figs. 20 y 22).

En la figura 19 podemos ver el efecto de diferentes concentraciones de MBZ sobre la secreción de albúmina en hepatocitos normales. En la inmunotransferencia (A) se observa que no existen diferencias a las distintas concentraciones de MBZ ensayadas, esta observación se confirmó al realizar un análisis densitométrico (B). Se obtuvieron resultados similares en los hepatocitos obtenidos a partir de ratas cirróticas (Fig. 20).

En la Figura 21 se observa el efecto del MBZ sobre la secreción de transferrina en hepatocitos obtenidos a partir de ratas normales y en la Figura 22 en hepatocitos obtenidos a partir de ratas cirróticas, en ambas figuras se observa que el MBZ no tuvo ningún efecto sobre la secreción de transferrina.

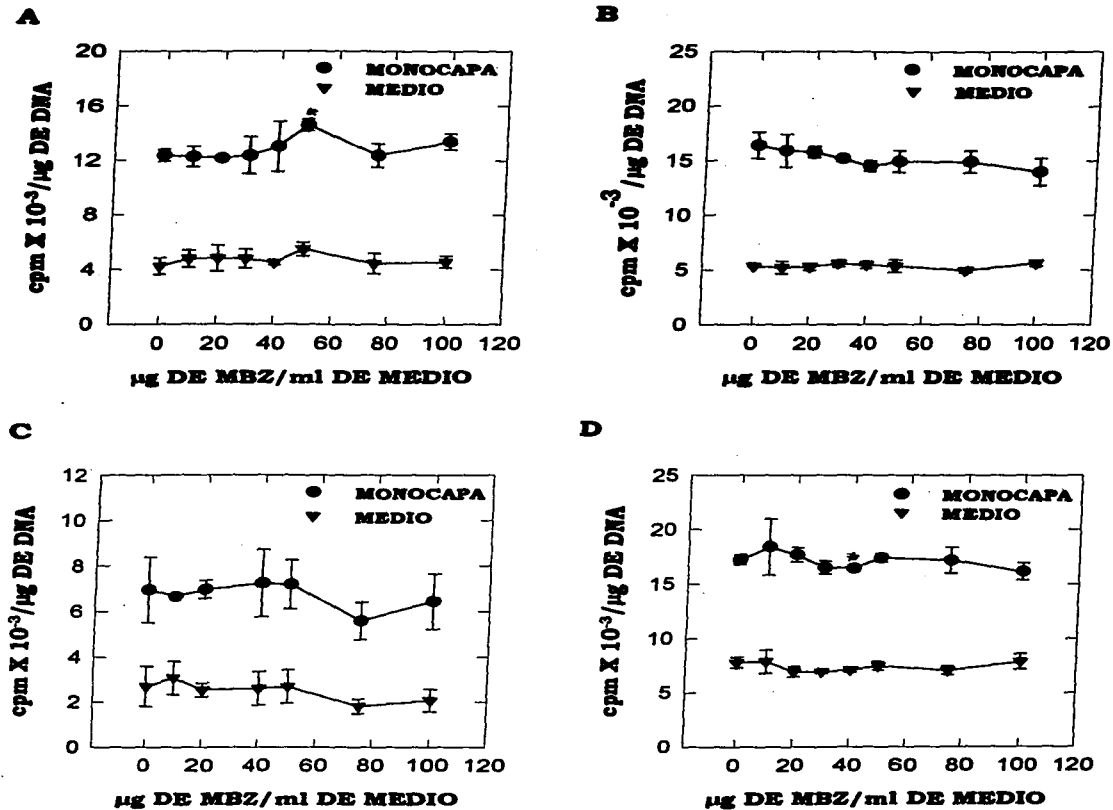


Fig. 16. Incorporación de $^3\text{H-Leu}$ (A y C) y $^{14}\text{C-Pro}$ (B y D) en proteínas precipitables con TCA obtenidas de cultivos de hepatocitos de ratas normales (A y B) o cirróticas (C y D). Los cultivos fueron incubados con el aminoácido radiactivo 24 hrs. antes de obtener las muestras. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$)

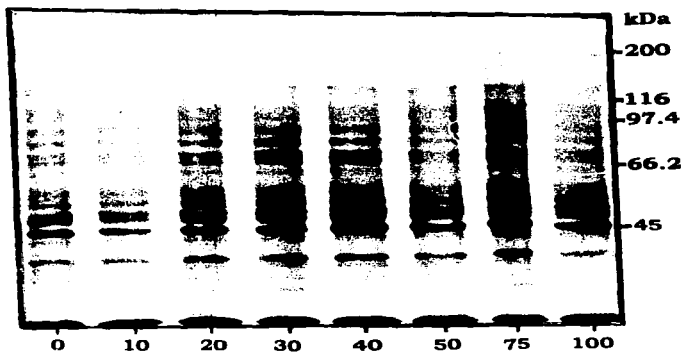
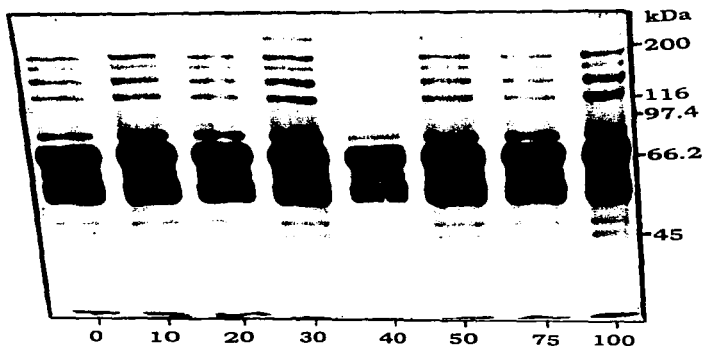
A**B**

Fig. 17. Autorradiografías de electroforesis cuyos geles fueron cargados con muestras obtenidas a partir de cultivos de hepatocitos de ratas normales, los cuales fueron incubados con diferentes concentraciones de MBZ y ^{14}C -Pro, 24 hrs. antes de la obtención de las muestras. A) Monocapa; B) medio de cultivo.

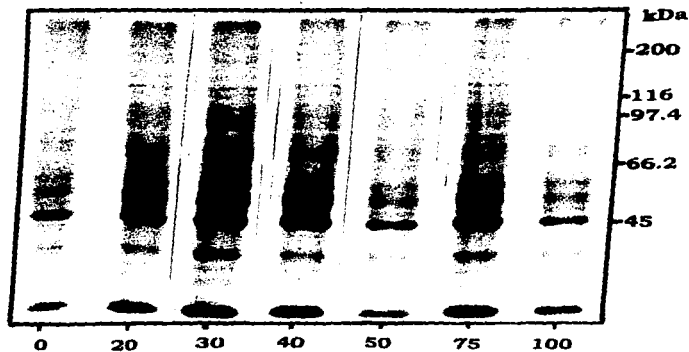
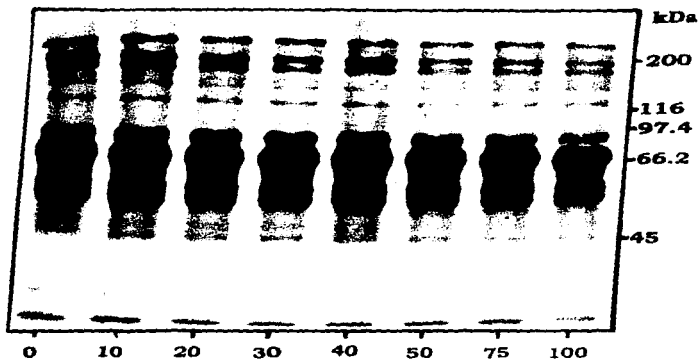
A**B**

Fig. 18. Autorradiografías de electroforesis cuyos geles fueron cargados con muestras obtenidas a partir de cultivos de hepatocitos de ratas cirróticas, los cuales fueron incubados con diferentes concentraciones de MBZ y ^{14}C -Pro, 24 hrs. antes de la obtención de las muestras. A) Monocapa; B) medio de cultivo.

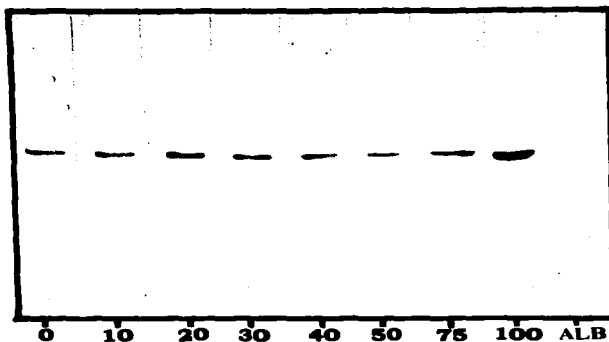
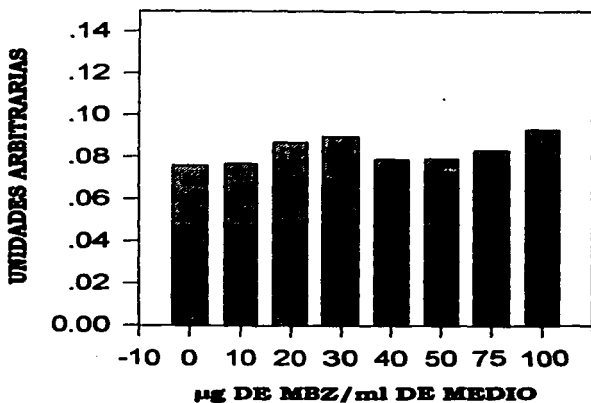
A**B**

Fig. 19. Inmunotransferencia (A) de muestras de medio de cultivos de hepatocitos obtenidos de ratas normales y tratados con diferentes concentraciones de MBZ. La inmunotransferencia fue revelada con un anticuerpo antialbúmina y a la banda de mayor intensidad se realizó análisis densitométrico (B).

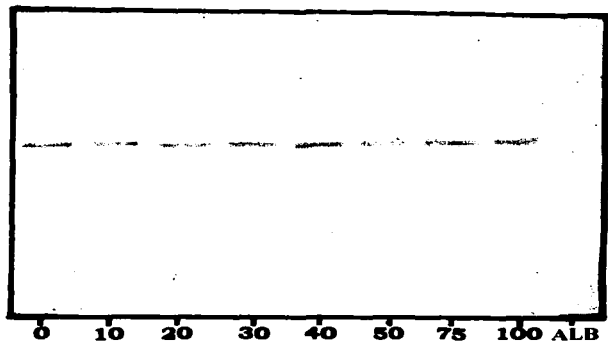
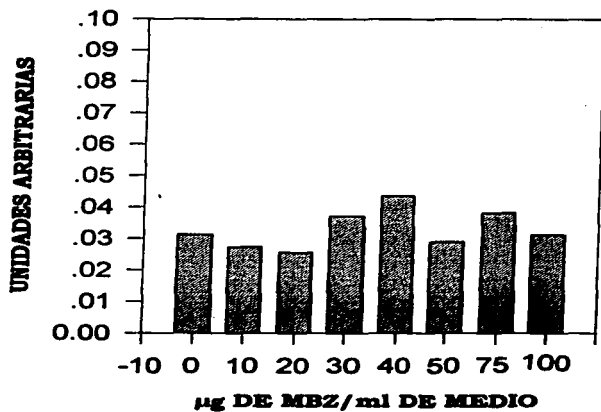
A**B**

Fig. 20. Inmunotransferencia (A) de muestras de medio de cultivos de hepatocitos obtenidos de rata cirrótica y tratados con diferentes concentraciones de MBZ. La inmunotransferencia fue revelada con un anticuerpo antialbumina y a la banda de mayor intensidad se le realizó análisis densitométrico (B).

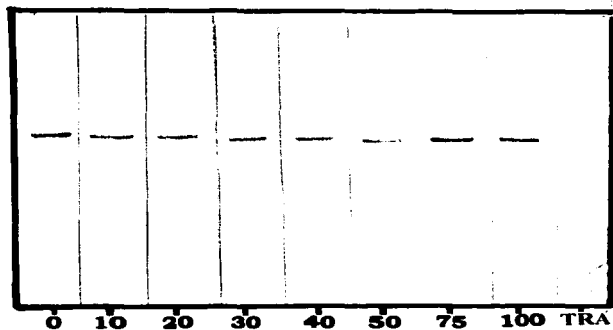
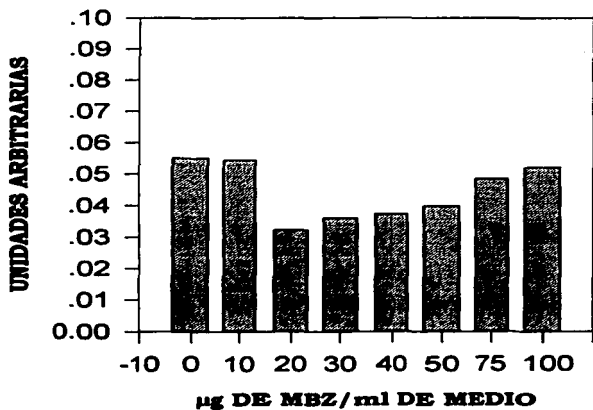
A**B**

Fig. 21. Inmunotransferencia (A) de muestras de medio de cultivos de hepatocitos obtenidos de ratas normales y tratados con diferentes concentraciones de MBZ. La inmunotransferencia fue revelada con un anticuerpo antitransferrina y a la banda de mayor intensidad se le realizó análisis densitométrico (B).

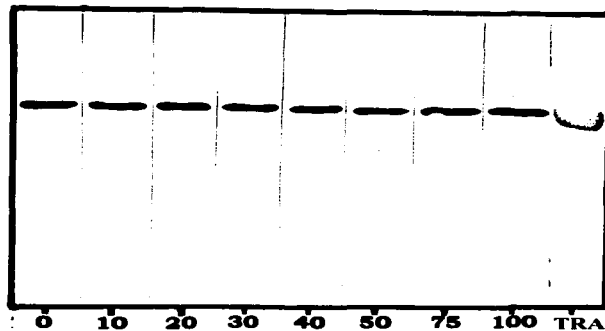
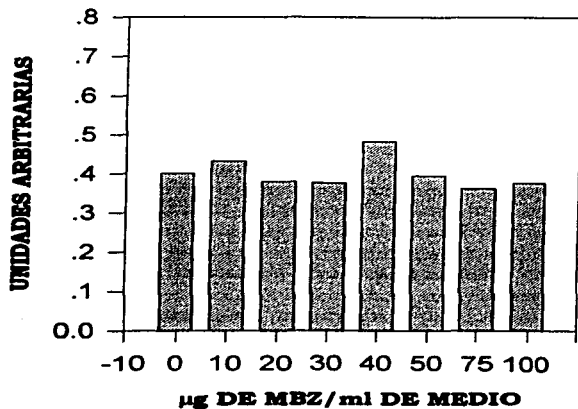
A**B**

Fig. 22. Inmunotransferencia (A) de muestras de medio de cultivos de hepatocitos obtenidos de ratas cirróticas y tratados con diferentes concentraciones de MBZ. La inmunotransferencia fue revelada con un anticuerpo antitransferrina, y a la banda de mayor intensidad se le realizó análisis densitométrico (B).

VIII. DISCUSIÓN.

Los hepatocitos dentro del hígado mantienen un estrecho contacto tanto con componentes de la MEC como con otras células, ya sean hepatocitos u otros tipos celulares residentes en el órgano. Se ha propuesto que estos contactos influyen sobre los hepatocitos modulando su expresión de proteínas (Kuo, 1991).

El hepatocito es una célula de tipo epitelial que se encuentra en contacto con la colágena I (Martínez, 1985) y varios estudios han mostrado que se requiere de esta proteína como sustrato para mantener a los hepatocitos en cultivo en buen estado, al menos durante tiempos cortos mejorando por mucho la adhesión comparado con el plástico de la caja de cultivo (Acosta y Díaz de León, 1994; Strom y Michalopoulos, 1982). Varios estudios han mostrado que otras moléculas son importantes para mantener a los hepatocitos en cultivo en buen estado incluso durante meses. Entre los sustratos más comunes se encuentran el matrigel (obtenido a partir del tumor engelbret-Holm-Swarm), las biomatrices obtenidas a partir de hígados o de páncreas (Ponce et al., 1981) y los cocultivos, donde se siembra a los hepatocitos sobre una monocapa de células de tipo mesenquimatoso principalmente (Loreal et al., 1993; Rojkind et al., 1995).

En los cultivos sobre matrigel se facilitan los contactos con la MEC, sin embargo, se dificultan los contactos célula-célula, ya que se obtiene una adhesión pobre comparada con un sustrato de colágena. En el sistema de cocultivo se facilitan las interacciones célula-célula además de las interacciones célula-MEC (Loreal et al., 1993 y Rojkind et al., 1995), sin embargo, se presenta el inconveniente de que las condiciones de cultivo son poco controladas, ya que en la caja de cultivo se establece una serie de interacciones tanto físicas como biológicas que no conocemos aún, además de que al ser utilizados para conocer el efecto de fármacos u otras moléculas, el sistema debe responder como un todo.

Un sistema de cultivo alternativo fue el utilizar las células alimentadoras previamente tratadas con mitomicina C (Kuri-Harcuch y Mendoza-Figueroa, 1989) o los medios condicionados obtenidos de células mesenquimatosas para alimentar a los hepatocitos sembrados sobre el plástico de la caja de cultivo (Mendoza-Figueroa et al., 1988).

En este trabajo presentamos una serie de resultados en los que se utilizó medio condicionado por células 3T3 para alimentar a los hepatocitos y observamos que en este sistema de cultivo se incrementa la síntesis y secreción de proteínas conforme avanza el tiempo de cultivo. El patrón electroforético nos muestra que la mayoría de las bandas se incrementan, entre ellas las más prominentes son la detectadas entre 60 y 80 kDa que posiblemente corresponden a albúmina y transferrina. Este incremento en síntesis y secreción de proteínas puede deberse al efecto de proteínas de la MEC solubles en el medio o a factores de crecimiento secretados por las células 3T3, ya que algunos de ellos promueven la síntesis y secreción de proteínas (Andus, 1991), esta razón fue la que nos indujo a estandarizar un sistema de cultivo que no presentara este inconveniente.

El sistema de cultivo de hepatocitos sobre colágena seca fue desarrollado por Tanaka (1978) y a partir de este trabajo la colágena, es el sustrato más utilizado ya que presenta una serie de ventajas sobre los demás sustratos, éstas incluyen que es relativamente económico y mantiene a los hepatocitos en buen estado al menos durante una semana.

Antes de evaluar el efecto del MBZ sobre la síntesis de proteínas en los hepatocitos, nosotros demostramos que implementamos un sistema de cultivo que mantiene las características diferenciadas al menos durante 96 hrs. ya que los diferentes parámetros de

integridad celular se mantienen, además de que las proteínas específicas de hígado, tales como albúmina y transferrina se siguen sintetizando y secretando.

Varios estudios sugieren que se requiere de la integridad de los microtúbulos para el transporte y secreción de proteínas (Redman et al., 1981; Mizuno y Singer, 1994), mientras que otros sugieren que el transporte y secreción de proteínas es independiente de microtúbulos (Virtanen, 1986). Por último otros estudios sugieren que la secreción de proteínas es afectada selectivamente dependiendo del tipo de proteína (Eilers et al., 1989).

Estudios previos llevados a cabo en hepatocitos recién aislados obtenidos de ratas normales y que fueron tratados con 10 μ m de MBZ, mostraron que a diferencia de otros fármacos con propiedades antimicrotubulares, el MBZ no tuvo efecto sobre la secreción de proteínas (Birket et al., 1981). Nosotros en nuestro sistema de cultivo probamos el efecto del MBZ sobre los hepatocitos en un intervalo de concentraciones más amplio y observamos que éste no afecta la secreción de proteínas totales. Estudios previos del efecto del MBZ sobre la biosíntesis y secreción de proteínas en cultivos de fibroblastos derivados de piel humana demostró que este fármaco afecta tanto la viabilidad como la proliferación, síntesis y secreción de proteínas totales, así como de colágenas (Soto et al., 1996). Por otro lado estudios realizados en isletas de páncreas sobre el efecto del MBZ sobre la secreción de insulina mostró que el fármaco incrementa la liberación de insulina (Zawalich et al., 1986). De esta manera los distintos tipos celulares responden de manera diferente al efecto del MBZ. Es necesario mencionar que si bien la ruta básica de secreción es similar en muchos tipos de células, existen pasos individuales a lo largo de la ruta que muestran variabilidad entre distintos tipos de células (Kelly, 1985 y Rojkind, 1985).

Se ha sugerido que dentro del mismo tipo de célula y particularmente en células polarizadas, coexiste la secreción de proteínas que son independientes de microtúbulos y las que necesitan de un aparato microtubular para su secreción (Kelly, 1985).

Estudios realizados en fragmentos de tejido aislado obtenidos de hígados de rata a las que se les trató con colchicina no mostraron cambios en la secreción de transferrina, lo cual sugiere que esta proteína es independiente del aparato microtubular para su secreción, a diferencia la secreción de albúmina disminuyó en las muestras obtenidas de ratas a las que se les trató con colchicina (Kershenovich y Rojkind, 1973) y también se observó una disminución en la secreción de albúmina en fragmentos de tejido aislado a los que se les trató con colchicina *in vitro* (Redman et al., 1981).

En nuestro estudio no observamos cambios en la secreción de albúmina y transferrina al tratar a los hepatocitos con diferentes concentraciones de MBZ, las cuales sobrepasan el triple de las concentraciones en las que sí se observó efecto sobre fibroblastos de piel humana (Soto et al., 1996).

En un estudio anterior en el que se probaron diferentes fármacos con propiedades antimicrotubulares en hepatocitos recién aislados se mostró que éstos disminuyeron la secreción de proteínas totales, albúmina y triacilglicerol, sin embargo, el MBZ careció de efecto sobre la secreción de estas moléculas (Birket et al., 1980).

Estos resultados sugieren que el hepatocito es una célula que presenta resistencia al efecto del MBZ, ya sea por que en estas células el MBZ no se una a microtúbulos con la suficiente afinidad o que la secreción de proteínas en hepatocitos sea independiente del los microtúbulos. De hecho, los resultados sugieren que la primera opción es la correcta ya que los estudios mencionados previamente muestran que otros fármacos que se unen a los microtúbulos disminuyen la secreción de proteínas y a que se sabe que el MBZ presenta mayor o menor afinidad por los microtúbulos dependiendo del tipo celular (Friedman y Platzer, 1980).

La cirrosis hepática es una enfermedad que se caracteriza por una disminución de la funcionalidad hepática que incluye la disminución de la síntesis de proteínas tales como la albúmina y la transferrina, así como un incremento en la concentración de proteínas colagénicas dentro del órgano.

Un estudio anterior mostró que la síntesis de transferrina permanece constante en fragmentos de tejido aislados obtenidos de hígados de ratas ya sea normales o cirróticas, por ello, se clasificó a esta proteína como una molécula que se secreta de manera constitutiva que no se afecta con la enfermedad, sin embargo, aunque los valores obtenidos no fueron significativamente diferentes, estos resultaron mayores en las muestras obtenidas de hígado cirrótico, a diferencia, los valores obtenidos para albúmina, fueron mayores y estadísticamente significativos en muestras obtenidas de hígado cirrótico (Rojkind y Kershenovich, 1975).

En nuestro estudio observamos que en muestras obtenidas de hígado cirrótico se observa un incremento en la secreción tanto de albúmina como de transferrina, siendo más pronunciada la diferencia en la secreción de albúmina, tal como se observó en el estudio previamente mencionado. Además, es conveniente mencionar que en fragmentos de tejido aislado de hígado de rata cirrótica es mucho menor la cantidad de hepatocitos que los que se encuentran en los fragmentos de tejido aislados de una rata normal, ya que en los primeros existe mayor cantidad de proteínas de la MEC, células estelares, miofibroblastos, etc por lo que la síntesis de proteínas por hepatocito debe estar incrementada en las muestras obtenidas de hígado cirrótico.

La aparente discrepancia que existe al observar bajos niveles de albúmina en suero y la elevada secreción de albúmina que se observa en los hepatocitos obtenidos de hígados de rata cirrótica puede explicarse, por que la población de hepatocitos se disminuya substancialmente con el desarrollo de la enfermedad y a que la albúmina sintetizada no llegue a la sangre con la misma eficacia debido a que los sinusoides hepáticos se transforman en verdaderos capilares y evitan el intercambio de moléculas entre el parénquima hepático y la sangre.

El MBZ es un fármaco que ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de las enfermedades parasitarias, además se ha utilizado de manera experimental en el tratamiento de la cirrosis hepática en la que se han realizado estudios tanto *in vivo* como *in vitro*.

En sistemas de cultivo, el MBZ provocó que fibroblastos de piel humana alimentados con medios condicionados por células de Kupffer, secretaran una mayor actividad colagenolítica (Rosas y Díaz de León, 1988).

Por otro lado el MBZ causa una acumulación intracelular de colágenas, así como una disminución de la proteína extracelular (Soto et al , 1996). Nuestros resultados muestran que el fármaco no causa alteraciones en la secreción de proteínas totales ni de las proteínas marcadoras de la diferenciación hepática, además carece de efecto sobre la viabilidad, morfología e integridad de los hepatocitos a concentraciones 3 veces mayores de las que si causan efecto sobre fibroblastos y macrófagos. Por lo anterior nuestros resultados refuerzan el planteamiento de que el MBZ puede ser utilizado en el tratamiento de la cirrosis hepática, esperando que los fibroblastos, los miofibroblastos y las células estelares respondan de manera similar a los fibroblastos de piel humana al ser tratados con MBZ, mientras que los hepatocitos no se afecten en su metabolismo y estado diferenciado.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS.

1.- Los hepatocitos en el sistema de cultivo implementado mantienen sus parámetros de integridad al menos durante 96 hrs.

2.- Los hepatocitos cultivados por cualquiera de los métodos muestran el mismo comportamiento biosintético en cuanto a la incorporación de marca radiactiva en la monocapa.

3.- Los hepatocitos cultivados con el método 1 secretan mayor proporción de proteínas conforme pasa el tiempo de cultivo, a diferencia de los hepatocitos cultivados con el método implementado, los cuales mantienen constante su secreción a lo largo del tiempo.

4.- El MBZ no mostró ningún efecto sobre la morfología y viabilidad de los hepatocitos

5.- El MBZ no tuvo efecto sobre la síntesis y secreción de proteínas totales, ni sobre la secreción de albúmina y de transferrina.

6.- Los cultivos derivados de ratas cirróticas mostraron un incremento en la secreción de albúmina y transferrina comparados con los obtenidos a partir de ratas normales.

X. CONCLUSIÓN.

El MBZ no afectó la viabilidad de los hepatocitos ni la secreción de proteínas en los cultivos obtenidos a partir de ratas normales o cirróticas por lo que la hipótesis se cumplió.

XI. PERSPECTIVAS.

Las perspectivas que se derivan de este trabajo se pueden clasificar dentro de 3 grandes grupos:

1.- Las que se derivan del establecimiento de cultivos primarios de hepatocitos.

A) Efecto de fármacos sobre el metabolismo de los hepatocitos.

B) Efecto de diferentes sustratos sobre el metabolismo de los hepatocitos.

C) Estudio del metabolismo de células obtenidas a partir de hígados con diversas patologías.

2.- Las que se derivan del estudio del efecto del MBZ como inhibidor de la polimerización de microtúbulos.

A) Estudios para determinar si el MBZ desestabiliza citoesqueleto o si los hepatocitos son resistentes a su efecto.

B) Estudios para determinar qué componentes del citoesqueleto de los hepatocitos son importantes para la secreción de proteínas.

3.- Las que se derivan del estudio del efecto del MBZ como fármaco en el tratamiento de la cirrosis hepática.

A) Estudios del efecto del MBZ sobre la síntesis de proteínas (colágenas y colagenasas) en los distintos tipos celulares del hígado (hepatocitos, células estelares y miofibroblastos).

B) Estudios del efecto del MBZ sobre la secreción de factores de crecimiento y colagenasas en las diferentes células residentes del hígado.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta, F., Díaz de León, L., Estudio comparativo de diferentes técnicas de aislamiento y cultivo de hepatocitos y su optimización. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM. 1994
- Alberts, B, Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., Watson, J., (1994) The cytoskeleton en: *Molecular Biology of the Cell*. 3th ed. Garland Publishing Inc, New York and London 787-862 pp.
- Albert, L., Spring-Mills, E. The liver and gallbladder en: *Histology*. 4th ed. Mcgraw-Hill USA 701-746 p.p.
- Andus, T., Bauer, J., Gerok, W. :Effects of cytokines on the liver. *Hepatology*. 1991;13 (2):363-375
- Ben-Zeév, A., Robinson G., Buchner, N., Farmer, S. :Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:2161-2165
- Berry, M., Friend, D. :High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells *J. Cell Biol*.1969;43:506-520
- Biagini, G., Ballardini, G. :Liver fibrosis and extracellular matrix. *J. Hepatol*.1989;8:115-124
- Birket, Ch., Coulson, Ch., Pogson, Ch., Gull, K. :Inhibition of secretion of proteins and triacylglycerol from isolated rat hepatocytes mediated by benzimidazole carbamate antimicrotubule agents. *Biochem. Pharmacol*. 1981;30(12):1629-1633.
- Bissell, D., Hammaker, L. Meyer, U. :Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies. *J. Cell. Biol*. 1973;59:722-734
- Bissell, D., Hammaker, L. Schmid, R. :Liver sinusoidal cells. Identification of a subpopulation for erythrocyte catabolism. *J. Cell Biol*.1972;54:107
- Bloom, S. :Motor proteins for cytoplasmic microtubules. *Curr. Opin. Cell. Biol*.1992;4:66-73
- Bomseil, M, Parton, M., Kuznetson, S., Schroer T. Gruenberg, J. :Microtubules and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCKcells. *Cell*. 1990;62:719-731
- Bosma, A., Brouwer, A., Seifert, W., Knook, L. :Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis. *J. Pathol*. 1988;156:15-21.
- Bradford M. :A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72:248-254.
- Burt, A. :C.L. Oakley lecture(1993): cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis.*J. Pathol*. 1993;170:105-114
- Caron, J. :Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. *Mol Cell Biol*. 1990;10:1239-1243
- Cerbón-Ambriz, J., Cerbón-Solórzano, J., Rojkind, M. :Regulation of collagen production in freshly isolated cell populations from normal and cirrhotic rat liver: effect of lactate. *Hepatology*. 1989;13(3):551-556.

- Conn, H., Atterbury, E., (1993) Cirrhosis en: Diseases of the liver. Editores. Schiff, L., Schiff, E., J.B.Lippincott Company:875-886.
- Chojkier, M. :Hepatocyte collagen production in vivo in normal rats. J. Clin. Invest. 1986;78:333-339.
- Chojkier, M., Brenner, D. :Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. Hepatology 1988;8 (1):176-182.
- Chojkier, M., Brenner, D., Leffert, H. :Vasopresin inhibits Type-I collagen and albumin gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 1989;264(16):9583-9591.
- Diegelman, R., Guzelian, P., Gay, R., Gay, S. :Collagen formation by the hepatocyte in primary monolayer culture and in vivo. Science. 1983 ;219:1343-1345
- Dustin, P. (1978) Microtubules, Springer-Verlag Berlin Heilderbeg, Alemania 452 p.p.
- Ezzell, R., Toner, M., Hendricks, K., Dunn, J., Tompkins, R., Yarmush, M. :Effect of collagen gel configuration on the cytoskeleton in cultured rat hepatocytes. Exp Cell Res. 1993;208:442-452
- Friedman, P., Pitzer, E. :Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin. Biochim Biophys Acta. 1980;630:271-278
- Friedman, S.L. :The cellular basis of hepatic fibrosis. The New England J. Med 1993;328(25):1828-1835
- Geerts, A., Greenwel, P., Cunningham, M., Bleser, P., Rogiers, V., Wisse, E., Rojkind, M. :Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells by northern hybridization analysis. J. Hepatol. 1993;19:148-158
- Geerts, A., Vrijssen, R., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, P., Wisse, E. :In vitro differentiation of fat storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. J. Hepatol. 1989;9:59-68
- Glawmann, H., Peters, T., Redman, C., (1983) Plasma protein secretion by the liver; Academic Press, New York. 500 p.p.
- Gravela, E., Poli, G., Albano, E., Dianzani, M. :Studies on fatty liver with isolated hepatocytes. I.The action of colchicine, phalloidin, citochalasin B, and cicloheximide on protein and triglyceride synthesis and secretion. Exp and Mol. Phatol. 1977;27:339-352.
- Greenwel, P., Geerts, A., Ogata, I., Solis, J., Rojkind, M., (1994) Liver fibrosis en:The liver biology and pathobiology. Editores Arias, I., Boyer, J., Fausto, N., Jakoby, W., Schachter, D., Shafritz, D., De. Raven Press, New York:1367-1379.
- Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y., Tsukada, Y. :Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. Biochemistry. 1980;19(1):169-176
- Hata, R., Ninomiya, Y., Sano, J., Konomi, H., Hori, H., Sunada, H., Tanaka, S., Kaburki, K., Nagai, Y., Tsukada, Y. :Activation of collagen synthesis in primary culture of rat liver parenchymal cells (hepatocytes). J. Cell. Physiol.1985;122:333-342.
- Kelly, R. :Pathways of protein secretion in eukaryotes. Science. 1985;230:25-32
- Keystone, J., Murdoch, J. :Diagnosis and treatment. Drug five years later:mebendazole. Ann. Int. Med., 1979;91:582-586.

- Kershenovich, D., Rojkind, M. :Effect of the administration of L-azetidine-2-carboxylic acid on albumin and transferrin biosynthesis by liver slices of rats treated with carbon tetrachloride. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973;319:216-222
- Kershenovich, D. :Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N. Engl. Med.* 1988;316(26):1709-1713.
- Kuri-Harcuch, W., Mendoza-Figueroa, T. :Cultivation of adult rat hepatocytes on 3T3 cells: expression of various liver differentiated functions. *Differentiation.* 1989;41:148-157
- Labarca, C., Paigen K. :A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 1980 102:344-352.
- Laclette, J., Guerra, G., Zetina, C. :Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980;92:417-423
- Lacy, P., Howell, D., Young, M., Fink, J. :New hypothesis of insulin secretion. *Nature* 1968; 219:1177-1179
- Loréal, O., Levavasseur, F., Fromaget, C., Gros, D., Guillouzo, A., Clement, B. :Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix in vitro. *Am J Pathol.* 1993;143:538-543
- Maher, J., McGuire, R. : Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest.* 1990;86:1641-1648.
- Mak, K., Lieber, C. :Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: a morphometric study. *Hepatology* 1988;8:1027-1033.
- Malizia, G., Giannuoli, G., Caltagirone, M., Pisa, R., Pagliaro, L. : Procollagen type I production by hepatocytes: a marker of progressive liver disease. *The Lancet* 1987; 8567(2):1055-1057.
- Martínez-Hernández, A. :The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. *Lab. Invest.* 1985;53(2):166-185.
- Martínez-Hernández, A., Martínez, F., Amento, P. :The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin and fibronectin. *Lab. Invest.* 1991;64(2):157-166.
- Matrisian, L. :Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Faseb J.* 1990;6(4):121-125
- Mendoza-Figueroa, T., Arguello, C., Kuri-Harcuch, H. :Culture of proliferating and differentiating fat-storing cells in 3T3-conditioned medium. *Biol. Cel.* 1988;64:29-38
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Hahn, E., Stein, H. :In situ hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in non parenchymal liver cells. *Hepatology.* 1989;10:84-92.
- Mitchell, D., Santone, K., Acosta, D. :Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage. *J. Tiss. Cult. Meth.* 1980;6 (3 y 4):113-116
- Mizuno, M., Singer, S. :A possible role for stable microtubules in intracellular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell. Sci.* 1994;107:1321-1331.

- Morales, B., y Díaz de León :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, UNAM. 1984
- Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V., (1992) Digestion/absorption en el tracto gastrointestinal en: Bioquímica de Harper; Manual Moderno. México D.F. 621-635 p.p.
- Nathanson, M., Boyer, J., (1994) ;Vesicular trafficking in the hepatocyte en: The liver biology and pathobiology. Editores Arias, I., Boyer, J., Fausto, N., Jakoby, W., Schachter, M., Shafritz, M., Raven Press New York. 655-664 p.p.
- Nakatsukasa, H., Nagy, P., Evarts, R., Hsia, Ch., Marsden, E., Thorgeirsson, S. :Cellular distribution of transforming growth factor- β 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J.Clin. Invest.* 1990;85:1833-1843.
- Ocampo, J., Díaz de León, L., Efecto del carbamato de benzimidazole sobre el metabolismo de colágena en la cirrosis hepática. Tesis de Especialidad en Medicina Interna, Hospital 20 de noviembre, Fac. de Medicina, UNAM. 1984.
- Paez, A., Díaz de León, L., Mebendazol y cirrosis hepática experimental. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, ENEP Zaragoza UNAM. 1986.
- Peterkofsky, B. Diegelman R. :Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* 1971;10:988-994
- Phillips, S., Poucell, J., Patterson, J., Valencia, P., (1987) The liver : An atlas and text of ultrastructural pathology. Raven Press, New York
- Pietrangelo, A., Gualdi, R., Casalgrandi, G., Geerts, A., Blesser, P., Montosi, G., Ventura, E. :Enhanced hepatic collagen type I mRNA expression into fat-storing cells in a rodent model of hemochromatosis. *Hepatology.* 1994;19(3):714-721.
- Ponce, M., Rojkind, M., :Rat hepatocytes attach to laminin present in liver biomatrix proteins by an Mg^{++} -dependent mechanism. *Hepatology.* 1995;22:620-628
- Redman, C., Banderjee, D., Howell, K., Palade, G. :Colchicine inhibition of plasma protein release from rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 1975;66:42-59
- Redman, C., Banerjee, D. Yu. S. :The effect of colchicine on the synthesis and secretion of rat serum albumin. *Methods in Cell Biology* 1981;23:231-244
- Rojkind, M., Díaz de León L. :Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices a regulatory mechanism. *Biochim. Biophys Acta,* 1970;217:512-522.
- Rojkind, M., Kershenobich, D. :Effect of colchicine on collagen albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochim. Biophys Acta,* 1975;378:415-423
- Rojkind, M., Novikoff, P., Greenwel, P., Rubin, J., Rojas-Valencia, L., Campos de Carvalho, A., Stockert, R., Spray, D., Hertzberg, E., Wolkoff, A., :Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol.* 1995;146:1508-1520.
- Rosas, L., y Díaz de León L. :Efecto de carbamato de benzimidazol (CBZ) sobre la liberación de colagenasa y cooperatividad inmunológica de células mononucleares y fibroblastos. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. ENEP. Zaragoza, UNAM. 1988.
- Saber, M., Zern, M., Shafritz, D. :Use of in situ hybridization to identify collagen and albumin mRNAs in isolated mouse hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983;80:4017-4020.

- Santamaría, P., y Díaz de León, L. :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.
- Seglen, P. :Preparation of rat liver cells:Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp. Cell. Res.* 1973;82:391-398.
- Soto, H., Massó, F., Cano, S., Díaz de León, L. :Effects of mebendazole on protein biosynthesis and secretion in human-derived fibroblast cultures. *Biochem Farmacol.* 1996;52:289-299.
- Steward, J. Kenny, A. :Proteins of the kidney microvillar membrane. Effects of monensin, vinblastine, swainsonine and glycosamine on the processing and assembly of endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV in pig kidney slice. *Biochem. J.* 1984;224:559-568.
- Strom, S., Michalopoulos, G. :Collagen as a substrate for cell growth and differentiation. *Methods in Enzymology.* 1982;82:544-555
- Stryer, L., (1988) *Biochemistry*; Freeman and Company. New York 636-638 p.p.
- Takehara, T., Matsumoto, K., Nakamura, T. :Cell density-dependent regulation of albumin synthesis and DNA synthesis in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor. *J. Biochem* 1992;112:330-334
- Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y., Ichihara, A. :Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. *J. Biochem.* 1978;84(4): 937-946
- Tsumumi, M., Takada, A., Takase, S., Ooshima :Connective tissue components in cultured parenchymal and nonparenchymal cells of rat liver. *Lab. Invest.* 1988;58(1):88-92
- Tuchweber, B., Desmouliere, A., Luce, M., Piallat, B., Rubbia, L., Gabbiani, G. :Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab. Invest.* 1996;74(1):265-278.
- Vale, R., Reese, T. Sheetz, M. :Identification of a novel force-generating protein kinesin involved in microtubule-based motility. *Cell.* 1985;42(1):265-278.
- Van Den Bossche, H., Rochete, F., Christian, H. :Mebendazole and related anthelmintics. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy.* 1982;19:67-127
- Van-Eyken, P., Geerts, A., De-Bleser, P., Lazaou, J. M., Vrijzen, R., Sciot, R., Wisse, E., Desmet, V. J. :Localization and cellular source of the extracellular matrix protein tenascin in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 1992;15:909-916
- Virtanen, I. :Microtubule disruption does not prevent intracellular transport and secretory processes of cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell. Biol.* 1986;42:281-287
- Weiner, F., Shah, A., Biempica, L., Zern, M., Czaja, M. :The effects of fibrosis on Ito cell gene expression. *Matrix.* 1992;11:36-43.
- Wheater, P., Burkitt, H., Daniels, V., (1986) *Functional Histology*; Churchill Livingstone. Londres, 250 p.p.
- Wisse, Geerts, A., Bouwens, L., Vanderkerken, K., Van Goethem, F. :An attempt to review the IVth international Kupffer cell symposium. *Cell of Hepatic Sinusoid Anno.* 1989
- Zawalich, W., Diaz, V., Cote, S. :Influence of mebendazole on insulin secretion from isolated rat islets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986;237(3):826-829.