



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Fisiología Celular

**ESTUDIO DEL EFECTO *IN VITRO* DEL HEPATOPROTECTOR
IFC-305 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. RAUL MANCILLA JIMÉNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX, Marzo, 2020



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.

ÍNDICE

	Página
Apéndice	4
Marco teórico	7
Origen de los macrófagos en el sistema inmune	8
Macrófagos (Generalidades, definición, función)	8
Diferenciación de monocitos a macrófagos tisulares	8
Macrófagos en el sistema inmune y sus funciones fisiológicas	10
1. Fagocitosis y desarrollo	11
2. Inflamación y citocinas	12
3. Tipos de activación M1 y M2 (plasticidad/fenotipos)	13
4. Vías de señalización en el macrófago activado	15
Activación Clásica	15
Activación Alternativa	18
5. Las células de Kupffer, los macrófagos hepáticos.	23
5.1 Activación M1/M2 en las células de Kupffer	25
5.2 Adenosina	26
La inflamación crónica en el contexto hepático	29
Fibrogenia	30
Activación de macrófagos inflamatorios por fagocitosis de hepatocitos.	31
La activación alternativa de los macrófagos en la inflamación crónica.	32
La cirrosis como un proceso de inflamación crónica.	33
Origen y cinética de las células Kupffer. El modelo de cirrosis experimental CCl ₄ .	34
La inflamación hepática y su reversión. Participación de las células de Kupffer	36
Antecedentes de la molécula experimental en el tratamiento de la cirrosis IFC-305	40
Justificación	45
Hipótesis	46
Objetivos	47
Objetivos Secundarios	48

Técnicas y procedimientos experimentales	49
Material y métodos	51
Obtención del cultivo primario de células Kupffer	51
Adición de Tratamientos <i>in vitro</i> en CK	53
Adición de inhibidores de transportadores y receptores de Adenosina	53
Citometría del flujo	54
Detección de Óxido Nítrico	55
Actividad de la enzima arginasa	56
Detección de citocinas por ELISA	56
Obtención de Proteínas de CK	57
Evaluación por Western Blot de la expresión de proteínas relacionadas con las CK y su activación	57
Resultados	59
Identificación de la Población de células de Kupffer extraídas de hígado de rata	59
Estado de activación de las células obtenidas identificadas como CK	60
Viabilidad de las células extraídas y dosis de activación con LPS e IFC-305.	62
Cinética de secreción de citocinas de CK en cultivo tratadas con LPS e IFC-305	66
Efecto del IFC-305 y el LPS sobre la actividad de arginasa y la iNOS	70
Actividad enzimática de arginasa <i>in vitro</i> en CK en cultivo en presencia de teofilina, dipiridamol y antagonistas de los receptores de adenosina.	72
Mecanismos de señalización del IFC-305 en CK activadas en cultivo.	76
Discusión	79
Conclusiones	91
Perspectivas	93
Referencias	95

APÉNDICE

anti-KCA-3: Detecta receptor C3 de complemento en células de Kupffer de rata, exclusivo para macrófagos, excluye reactividad con timo, piel, corazón, cerebro, riñones, sangre periférica y médula ósea.

APC: Célula Presentadora de Antígeno

BrdU: Bromodeoxiuridina

C3: receptor y fragmento específico de la cascada de complemento, las interacciones con éste facilitan y posibilitan la fagocitosis.

C5a: glicoproteína de 74 amino ácidos, factor de la cascada de complemento potente mediador proinflamatorio.

CCl₄: Tetracloruro de carbono.

CD11b: glicoproteína expresada (subunidad α de Mac-1) por macrófagos y monocitos y en menor proporción por granulocitos, NK y CD5, así como algunas estirpes de células dendríticas. Es el receptor proteínico de iC3 (165 kDa) también es reconocido como la cadena α de la integrina MAC-1, forma MAC-1 por la unión a CD18. Se expresa en monocitos, granulocitos y células T y B. Esta es la subunidad de MAC-1, que media las interacciones entre neutrófilos y monocitos con el endotelio estimulado, la fagocitosis de partículas cubiertas con iC3b o IgG, la diseminación o la quimiotaxis de leucocitos; molécula de unión a ligando que se unen a C3b, ICAM-1, CD45, ICAM-2 (CD102) y fibrinógeno (4).

CD14: Receptor de naturaleza proteica-glicofosfatidilinositol anclado a la superficie de los monocitos y leucocitos polimorfonucleares. Funge como co-receptor al LPS (lipolisacárido) en colaboración con TLR4.

CD68: Glicoproteína expresada en la membrana plasmática de los macrófagos, pertenece a la familia ácida. Receptor de unión a LDL. Se encuentra en los gránulos citoplasmáticos y en el citoplasma de varios tejidos no-hematopoyéticos como hígado y túbulos renales y glomérulo. También presente en la superficie de monocitos, neutrófilos, basófilos y linfocitos mayores.

COX-2: Ciclooxygenasa-2, una enzima clave en la generación de prostaglandinas proinflamatorias, como PGE₂ (prostaglandina E₂).

EBM11: Hibridoma específico para CD68 en humano.

ED1: Hibridoma específico para CD68 de conejo.

ED2: Hibridoma específico para CD163 de rata. Es una glicoproteína monocatenaria tipo I con un peso de 130 Kda. Se expresa en monocitos, macrófagos, células estromales de la médula ósea, subgrupo de progenitoras eritroides. Participa en la interacción de células progenitoras hematopoyéticas y células hematopoyéticas y células estromales y en la endocitosis. En ratas, este receptor se expresa en los macrófagos tisulares y su contribución es proinflamatoria incrementando citocinas como IL-1, IL-6 y NO. De la familia de los receptores *scavenger*, involucrado en la endocitosis del complejo hemoglobina-haptoglobina.

ERO: Especies reactivas de oxígeno

Fc: Los complejos inmunes solubles interaccionan con los monocitos y macrófagos, mediante la región Fc del anticuerpo o receptor (iniciales de fracción cristalizable).

FITC: Fluorocromo, Isotiocianato de fluoresceína, rango de absorción de 410-550nm.

FL-#: Localización del láser de excitación para cada fluorocromo en particular, FL1: FITC; FL2: Phycoerythrin (PE), Propidium Iodide; FL3: TriColor; FL4: DAPI

FSC-H: Por su localización respecto al paso de la muestra *Forward Scatter*, Correlaciona el volumen celular o tamaño.

G6DPH: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; factor estimulante de colonia granulocitos-macrófagos.

HIS36: anticuerpo monoclonal de ratón, empleado para la detección de un antígeno semejante a ED-2 localizado en macrófagos tisulares de rata, excluyendo monocitos y otras estirpes.

HSC: Hepatic Stellate Cells; células estelares también denominadas de Ito.

IFC-305: Derivado del ácido aspártico y de la 6-aminorribofuranosil purina (6-ARP, adenosina).

IL-#: Interleucina, moléculas de naturaleza proteica involucradas en la cascada de señalización en la respuesta inmune innata.

IMH: Inmunocitoquímica/Inmunohistoquímica.

INF: Interferón con importantes funciones inmunoregulatorias, potente activador de macrófagos con efecto antiproliferativo en células transformadas.

Ki-M2R: Anticuerpo monoclonal directo contra el sistema mononuclear fagocítico en rata. Se expresa por macrófagos de tejido únicamente.

KPI: Clona de ratón para CD68 en humano, reconoce un antígeno que persiste a través de la maduración de los monocitos hacia su estadio de macrófago.

Ku-1: Familia de receptores involucrados en autoinmunidad.

LO-5: Lipooxigenasa-5, su función es la de transformar a los ácidos grasos en leucotrienos, los cuales se involucran en procesos inflamatorios.

LPS: Lipopolisacárido

LTB4: leucotrieno B4, estimula la función leucocitaria, incluyendo quimiotaxis, producción de anión superóxido en adhesión y expresión del receptor C3b

Mac 387: Reacciona con subpoblación de macrófagos tisulares, pero es poco reactivo con los macrófagos germinales. Reconoce la molécula de calprotectina.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos.

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor; factor estimulante de colonia de macrófagos.

MTT: En ésta prueba, la deshidrogenasa mitocondrial (enzima de todas las células vivas), oxida la molécula amarilla de MTT (colorante vital) por Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

NCP: Células No Parenquimales

NO: Óxido nítrico.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PDGF: platelet-derived growth factor; factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PE: Fluorocromo, Ficoeritrina, rango de absorción 500-650nm.

PGE2: Prostaglandina E2

RANTES: Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, quimiocina también conocida como CCL5 participa en el rodamiento y atracción de leucocitos al sitio de inflamación. Una quimiocina atrayente selectiva para los linfocitos T de la memoria y de los monocitos. Se une a CCR5, es un acrónimo de Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted. También es conocido como CCL5.

Scavenger BI: receptor para lípidos involucrado en los mecanismo que transporte de HDL y ésteres de colesterol, expresado primordialmente en hígado.

SEC: Sinoidal epithelial cells; células epiteliales del sinusoide

SSC-H: Por su localización respecto al paso de la muestra *Side Scatter*, Correlaciona la granularidad porque difracta la luz que refleja.

TGF: Transforming grow factor; factor de crecimiento transformante beta

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases; Inihidor de metaloproteinasas.

TNF: Tumoral Necrosis Factor; factor de necrosis tumoral

Marco Teórico

Origen de los macrófagos en el sistema inmune

El sistema inmune es una red biológica compleja, conformada por células y moléculas que tiene como principal función la protección y defensa de los organismos.

El origen del sistema inmune en los seres humanos, está determinado por una célula pluripotencial de la médula ósea, que mediante diferentes factores de maduración y transformación origina dos linajes celulares especializados: el linfoide y el mieloide (1).

El linaje linfoide da origen 1) las células asesinas naturales (NK Natural Killer, por sus siglas en inglés), que atacan directamente a los microorganismos que intentan invadir el organismo y a las células infectadas por virus. 2) Los linfocitos T que dan origen a subpoblaciones que, directamente o por medio de citocinas, atacan a los patógenos y 3) los linfocitos B que son responsables de la producción de anticuerpos y recientemente descritas las células linfoides innatas (*innate lymphoid cells* en inglés ILCs).

La estirpe mieloide da origen a 1) las células polimorfonucleares (PMN), neutrófilos, monocitos y células dendríticas (DC), que junto con los macrófagos (MØs), derivados de monocitos, cumplen la función de llevar a los órganos linfoides secundarios las moléculas extrañas captadas en la periferia dentro del organismo. 2) Los eosinófilos, basófilos y mastocitos, son aquellos componentes celulares que participan en la iniciación o refuerzo del proceso de inflamación (1).

Macrófagos (Generalidades, definición, función)

Los macrófagos (MØs), son células antiguas en la filogenia metazoaria y fueron originalmente identificados a finales del siglo XIX por Metchnikoff por su naturaleza fagocítica. En los mamíferos adultos se encuentran en todos los tejidos, donde son organizados de manera particular en patrones definidos con cada célula o tejido o predeterminado por su dinámica inmunológica (2).

Metchnikoff propuso que los macrófagos participan en el mantenimiento de la integridad y homeostasis de los tejidos. Para hacerlo, estas células cuentan con la capacidad de discriminar lo propio de lo no propio, percibiendo el daño tisular y reconociendo agentes patógenos que invaden el organismo, dando origen al concepto de inmunidad innata (2). Durante más de 500 millones de años de evolución se ha conservado la función de los MØs como fagocitos, en múltiples especies se encuentran conservados, ya que sus funciones son indispensables en la inmunidad innata.

Los MØs se definen como células mononucleares con un gran número de funciones dentro del sistema inmune innato, entre ellas el desarrollo, homeostasis y reparación tisulares y la respuestas a patógenos e inflamación (3).

Diferenciación de monocitos a macrófagos tisulares

Durante la hematopoyesis en la médula ósea las células progenitoras de granulocitos y monocitos se diferencian en promonocitos, que salen de la médula ósea hacia la circulación sanguínea, en donde se diferencian de modo adicional en monocitos maduros. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo alrededor de ocho horas, durante las cuales proliferan, migrando posteriormente hacia los tejidos en donde se diferencian en MØs específicos de tejido (4).

La diferenciación de un monocito en un macrófago tisular incluye varios cambios: la célula incrementa su tamaño de 5 a 10 veces; sus organelos intracelulares aumentan en número y complejidad; adquieren mayor capacidad fagocítica, producen concentraciones altas de enzimas hidrolíticas, y comienza a secretar una diversidad de factores solubles. Mediante factores de diferenciación y quimiocinas, los MØs se dispersan en la totalidad del cuerpo, algunos residen en tejidos particulares y se transforman en MØs fijos, en tanto que otros permanecen móviles y se llaman MØs libres o errantes. Los MØs libres se desplazan a través de los tejidos mediante movimientos ameboides (2). En la actualidad se ha demostrado que muchos de los macrófagos residentes del tejido, se establecen durante la etapa embrionaria y permanecen hasta la adultez de manera independiente al flujo sanguíneo de monocitos (5). En los tejidos los monocitos se convierten en macrófagos residentes con un fenotipo determinado por el microambiente tisular, la matriz extracelular (MEC), y los productos de secreción y moléculas de superficie de las células vecinas. Esta especialización contribuye al desarrollo de su heterogeneidad, por lo anterior, existen diversos tipos de MØs de tejido como el adiposo (en inglés, *adipose tissue macrophages*, ATMs), células de Kupffer en el hígado, microglía en el sistema nervioso central, osteoclastos en el hueso, histiocitos en el tejido conjuntivo, e incluso macrófagos asociados a tumor, etc (**Figura 1**) (2,6).

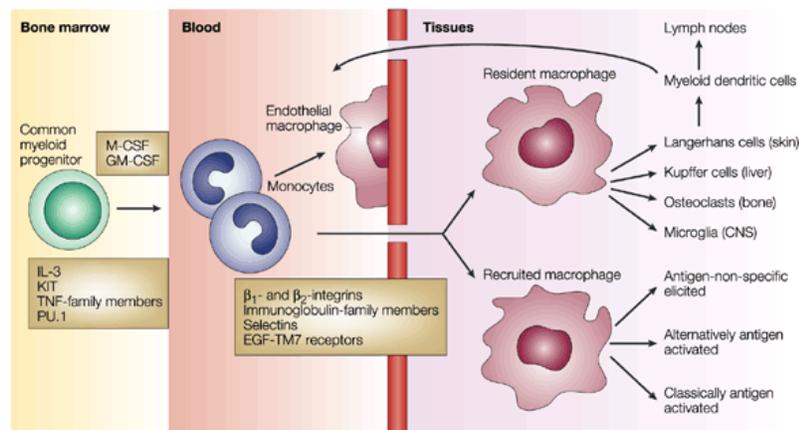


Figura 1. Origen y diferenciación de los monocitos a macrófagos. Los macrófagos que se distribuyen en diversos tejidos tienen su origen en la médula ósea a partir de una sola célula progenitora de la estirpe mielóide (2).

De manera particular, en el caso de los macrófagos, más allá de su origen, cuentan con la propiedad de expresar amplios rangos de fenotipos morfológicos y funcionales, permiten que estas células cumplan con actividades específicas por la inducción de la inflamación y la resolución de la misma. Una de estas estirpes localmente especializada se denomina célula de Kupffer, y se albergarán en el hígado; estas células y su participación en estos fenómenos, son el tema principal del presente trabajo.

Macrófagos en el sistema inmune y sus funciones fisiológicas

Se han atribuido diversas funciones a los MØs durante el proceso inflamatorio. Estas células dinámicas, junto a los monocitos circulantes, pertenecen al sistema mononuclear fagocítico cuya principal es la eliminación de microorganismos invasores, células extrañas, y detritos de tejidos en necrosis y apoptosis. Por otra parte, los MØs, también son células secretoras de mediadores como las citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y quimiocinas (MCP-1), que promueven la respuesta inflamatoria ya que estimulan la fagocitosis, activan a los linfocitos T, estimulan la hematopoyesis, atraen a otras células inmunes hacia el sitio inflamatorio, etc (7). Estas células, una vez activadas, además de secretar factores quimiotácticos, liberan también otros mediadores proinflamatorios, como son los lípidos bioactivos, y mediadores citotóxicos, como los radicales libres de nitrógeno y de oxígeno.

Otra de las funciones fundamentales del macrófago activado es su capacidad presentadora de antígenos. Tras la fagocitosis, los macrófagos degradan las proteínas y procesan los antígenos para presentarlos en los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) en la superficie celular, permitiendo que los linfocitos T puedan reconocer estos antígenos y se activen y con ello guían el curso de la respuesta inflamatoria e intervienen en la síntesis y reparación del tejido

dañado durante el proceso inflamatorio, participando de forma activa en la resolución de la inflamación (7).

En el proceso inflamatorio participan diferentes tipos de células efectoras que varían a medida que evoluciona la respuesta inflamatoria. Uno de los tipos celulares directamente implicado desde el inicio hasta la resolución de la inflamación es el macrófago. Los MØs permanecen inactivos en los tejidos y pueden activarse tras reconocer estímulos como el lipopolisacárido de la pared de bacterias Gram negativas (en inglés, lipopolysaccharide, LPS), o diversas moléculas de tamaño reducido que están asociadas a patógenos llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (en inglés, Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs), a través de los receptores transmembranales conocidos como receptores tipo Toll (en inglés, Toll-like Receptors, TLRs), desencadenando así la activación y maduración de los macrófagos (7).

1. Fagocitosis y Desarrollo

La fagocitosis es el proceso por el cual las células especializadas buscan, localizan, identifican y endocitan partículas, patógenos o células extrañas para destruirlas y extraer de ellos los antígenos (Ag) que se deben presentar a los linfocitos. Esta función la ejercen principalmente PMN, MØs y DC conocidos como células fagocíticas profesionales, así como las células fijas que integran el sistema llamado monocito-macrófago o retículo-endotelial, ubicado en hígado, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea (2).

Como fagocitos profesionales, los macrófagos fueron originalmente definidos por su excepcional habilidad fagocítica en múltiples procesos fisiológicos, realizan funciones críticas en la remodelación de tejidos, tanto durante el desarrollo y la adultez; por ejemplo, durante la eritropoyesis en humanos, los eritroblastos que maduran están

rodeados de macrófagos que ingieren los núcleos de eritrocitos extruidos. (4) Las deficiencias de remodelación en ausencia de macrófagos también se ha observado en varios otros tejidos, incluidos la glándula mamaria, el riñón y el páncreas, lo que sugiere que los macrófagos son esenciales para la formación del patrón tisular y la morfogénesis ramificada. La glándula mamaria, es uno de los tejidos que se ha estudiado con mayor profundidad, el crecimiento de la estructura ductal y su pérdida resulta en una tasa más lenta de crecimiento y ramificación vascular limitada dentro del tejido, esto se debe a la incapacidad de remodelar la matriz extracelular durante el crecimiento de las estructuras ductales. Además, se ha descrito el papel de estas células en la regeneración del hígado, a través de la expresión de ligandos de la vía de WNT (Wingless «Wg» en *Drosophila melanogaster*) la cuál desempeña un papel fundamental en la diferenciación celular (8).

2. Inflamación y citocinas

Las células endoteliales, los MØs y los linfocitos T son los tipos celulares que liberan mayor cantidad de citocinas. Generalmente actúan de forma sinérgica entre ellas o junto a otros estímulos induciendo a su vez la síntesis de otras citocinas. Los MØs, dentro de la red de citocinas, son una fuente importante de muchas de ellas implicadas en la respuesta inmune, la hematopoyesis, inflamación y muchos otros procesos homeostáticos. Tras la estimulación por microorganismos, productos microbianos o factores endógenos incluyendo a las propias citocinas de manera autócrina, los macrófagos puede sintetizar *de novo* y liberar una gran variedad de estas moléculas, entre ellas: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL -12, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , MCP-1, MCP-3, MIF, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1, MIP-2 y TGF- β .

La citocinas son proteínas de bajo peso molecular implicadas en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa y en la hematopoyesis; actúan también como

moduladores inflamatorios, participando tanto en la inflamación aguda como en la crónica, son similares a las hormonas y se producen y liberan en respuesta a diversos estímulos incluyendo, inflamación y daño tisular. El hígado es el principal órgano que produce y elimina citocinas; todos los tipos de células en el parénquima hepático y no parenquimatosas son capaces de producir citocinas (9).

Algunas citocinas pueden regular el incremento en la producción de citocinas por los macrófagos (IL-3, GM-CSF, IFN- γ) mientras que otros pueden inhibirla (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) en mecanismos de polarización que se detallarán más adelante. Además, estas citocinas pueden modular la mayoría de las funciones de los MØs y la expresión de marcadores de superficie celular. Por otra parte, las quimiocinas como MCP-1,2,3, MIP-1,2 y RANTES contribuyen al reclutamiento de monocitos circulantes dentro de los tejidos y una activación o polarización de manera local (10).

3. Tipos de activación M1 y M2 (plasticidad/fenotipos)

Una característica clave de los macrófagos es su capacidad para adaptar su respuesta de acuerdo a estímulos ambientales. Al encontrar patógenos o PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos) o DAMPs (Patrones moleculares asociados a daño), los MØs secretan citocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que ayudan a las funciones de activación antimicrobiana e inmunológica necesarias para matar y controlar la diseminación de patógenos o los procesos infecciosos asociados. Por el contrario, las señales homeostáticas inducen a los MØs para adoptar fenotipos relacionados con remodelación y reparación de tejidos durante el desarrollo y otros procesos (11).

Los MØs polarizados difieren en términos de expresión del receptor, función efectora y producción de citocinas y quimiocinas. Por ejemplo, el metabolismo de la arginina es

caracterizado por altos niveles de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos M1, mientras que la vía de arginasa predomina en macrófagos M2 con generación de ornitina y poliaminas. La producción diferencial de citocinas es una característica clave de los macrófagos polarizados como se muestra en la **figura 2**.

El fenotipo M1 comúnmente induce la liberación de IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF- α), mientras los macrófagos M2 típicamente producen IL-10, antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) y expresan el receptor de IL-1 de tipo II.

En los M ϕ s, los estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido (LPS) y el interferón- γ (IFN- γ) inducen un fenotipo inflamatorio M1 que promueve la respuesta efectora Th1 y las propiedades antimicrobianas y tumorocidas. Los macrófagos con este fenotipo se denominan macrófagos "clásicamente activados". Por el contrario, la estimulación de macrófagos con citocinas como la IL-4 o la IL-13 conduce a un estado de activación "alternativo", caracterizado por una disminución de la capacidad para producir citocinas proinflamatorias, metabolismo preferencial de arginina a ornitina mediante expresión de la enzima arginasa, así como un aumento de la expresión de los receptores de captura y la actividad de fagocitosis y reparación y remodelación tisular (12).

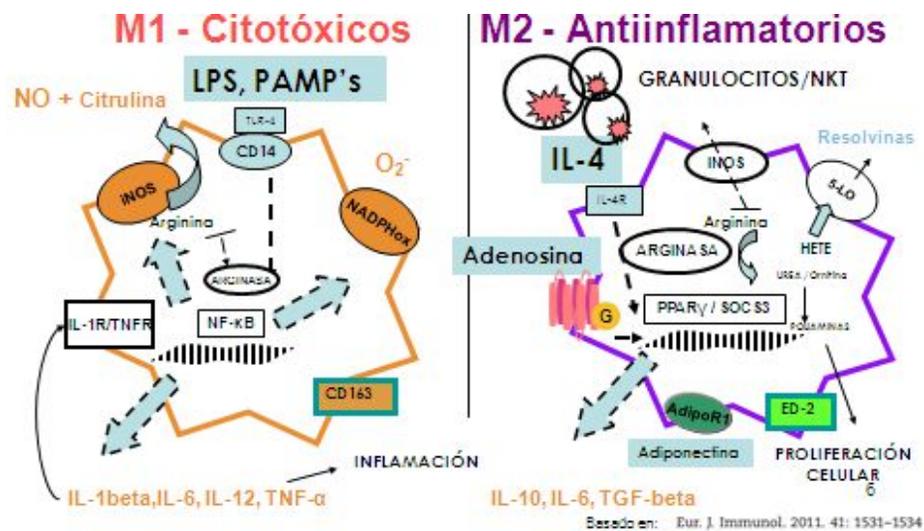


Figura 2. Clasificación de macrófagos por su activación. Los macrófagos pueden presentar dos tipos de activación y marcadores específicos que se relacionan con ellas, para el tipo 1, por ejemplo: iNOS, NADPHoxidasa, CD163 y la liberación de citocinas proinflamatorias y para tipo 2: ED-2, arginasa y 5-LO, así como la secreción de IL-4 e IL-10.

Dependiendo del estímulo antiinflamatorio *in vitro* usado para generar MØs M2, estas células pueden mostrar sutiles variaciones fenotípicas. Por lo tanto, el fenotipo M2 está subdividido en M2a, M2b y M2c (12 y 13) y algunos recientemente sugieren un fenotipo M2d. Los macrófagos M2 que presentan una activación alternativa, se subdividen por su molécula de activación y los 3 tipos de respuestas; (13):

- M2a: activados por IL-4 ó IL-13;
- M2b: activados por complejos inmunes en combinación con IL-1 o LPS;
- M2c: activados por IL-10, o TGF.

Estos MØs están asociados a la respuesta de tipo Th2. En general, los macrófagos M2 liberan IL-10 y presentan una actividad inmunosupresiva, inhibiendo la proliferación las células T. Juegan un papel importante en la resolución de la inflamación a través de la fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos, reduciendo la producción de citocinas proinflamatorias, e incrementando la síntesis de mediadores importantes en la remodelación de tejido, angiogénesis, reparación y cicatrización (13). Uno de los marcadores que se han utilizado ampliamente para su identificación es la actividad de la enzima arginasa.

4. Vías de señalización en el macrófago activado

Activación Clásica

Los macrófagos M1 también denominados proinflamatorios, presentan una activación clásica, la cual consiste en recibir la señal de citocinas del tipo I, como interferon- γ (INF- γ) o el Receptor del Factor de Necrosis Tumoral TNFR o por el reconocimiento de PAMP's (patrones moleculares asociados a patógenos, por ejemplo: LPS, lipoproteínas, RNA de doble cadena, etc) mediante receptores de tipo Toll. Este tipo de macrófagos exhiben una alta actividad microbicida y liberan principalmente IL-1 β e IL-12, además de poseer actividad citotóxica y antiproliferativa debida en parte, a la liberación de especies

reactivas oxígeno (NO y ión superóxido) y nitrógeno y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) **figura 3**, cooperando con todo ello a una exacerbación del daño tisular. Se activan enzimas de estrés oxidativo como iNOS y NADPH-oxidasa como parte de sus mecanismos defensivos (14).

Los receptores tipo Toll (TLRs) constituyen una familia de once proteínas (en el ser humano) y cada una está codificada por un gen diferente. Todos comparten un dominio citoplasmático similar, que se encuentra también presente en receptores de IL-1, razón por la cual se le denominó dominio TIR (Toll/IL-1 receptor). Después de unirse a sus ligandos, los TLRs forman heterodímeros u homodímeros, lo que resulta esencial para su activación. Estos receptores pueden desencadenar la migración de las células presentadoras hacia los tejidos linfáticos secundarios, así como provocar el incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras para la respuesta inmune como CD80/86. En células con capacidad fagocítica, los TLR pueden actuar estimulando la fagocitosis además de aumentar el potencial microbicida e inducir la producción y secreción de quimiocinas y citocinas, mediante la activación de NF κ B (15).

El factor de transcripción NF κ B es uno de los principales factores de transcripción implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria es el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (en inglés, nuclear factor kappa B, NF- κ B). La activación de este factor es necesaria para el desarrollo de la respuesta inmune al inducir la expresión de genes de primera defensa frente a microorganismos. En condiciones basales, el NF- κ B está presente en el citoplasma de forma inactiva unido a las proteínas inhibitorias κ B (I κ B). La familia de proteínas I κ B se caracteriza por la presencia de unas secuencias de repetición de anquirina y está compuesta por siete miembros: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B ζ , I κ Bns y Bcl3. Las proteínas I κ B α , β , ϵ y γ se localizan en el citoplasma y se encuentran unidas a distintas unidades de NF- κ B. Estas cuatro proteínas se degradan tras ser fosforiladas, lo cual no ocurre con el resto de miembros (I κ B ζ , I κ Bns y Bcl3) que se localizan principalmente en el núcleo (16). En

mamíferos, la familia de proteínas NF- κ B comprende cinco proteínas, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF κ B1) y p100/52 (NF κ B2) que se asocian entre sí formando homodímeros y heterodímeros para actuar como complejos transcripcionales activos. Se han descrito varias vías de activación del factor de transcripción NF- κ B. La activación clásica comienza en respuesta a diferentes señales extracelulares como son las citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β), mitógenos o LPS. En esta vía, las proteínas I κ B α son fosforiladas por las proteínas I κ B quinasas o complejo IKK, formado por dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y una reguladora (IKK γ , también llamada NEMO). Tras esta fosforilación se lleva a cabo la poliubiquitinación de I κ B α y su posterior degradación por la subunidad 26S del proteasoma. Como consecuencia de la degradación de I κ B, el complejo p65/p50 se transloca al núcleo donde va a regular la transcripción de numerosos genes proinflamatorios, como aquellos que codifican para la expresión de citocinas, receptores implicados en la adhesión y migración leucocitaria y enzimas que producen mediadores inflamatorios secundarios como COX-2 y NOS-2 (16,17).

Señalización vía LPS/ IL-1 β

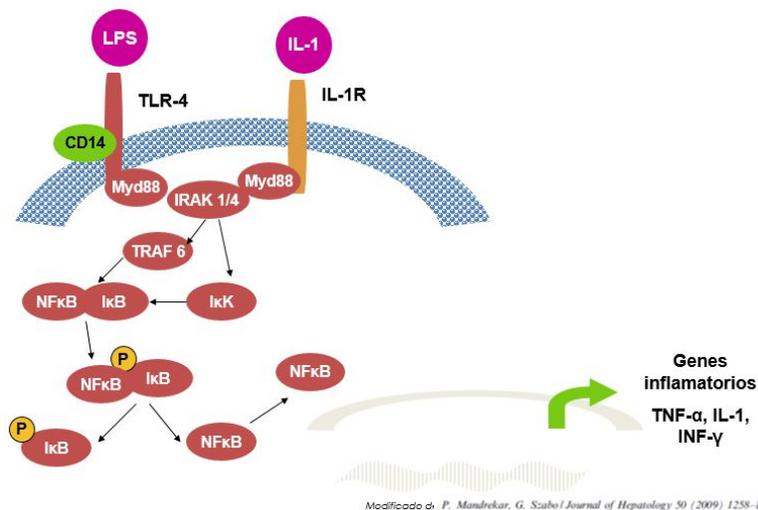


Figura 3. Vías de señalización clásica para macrófagos M1. Los macrófagos pueden estar activados clásicamente por LPS y la citocina IL-1 β , secretando citocinas proinflamatorias al medio extracelular.

Las principales citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos son IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Las citocinas IL-1 β y TNF- α actúan conjuntamente en el sitio local inflamatorio estimulando la expresión de enzimas proinflamatorias, como la ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX) y la óxido nítrico sintasa-2 (NOS-2 ó iNOS), responsables de la producción de prostaglandinas (PGs) (18). Actúan además como agentes quimiotácticos e inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y selectina E). El IFN- γ es otra citocina proinflamatoria (también llamada linfocina) sintetizada por los macrófagos, linfocitos T activados y células asesinas naturales o Natural Killer por sus siglas en inglés (NK) desempeñando un importante papel en los mecanismos de defensa al inducir la producción de NO y aumentar la actividad del TNF- α (19).

Activación Alternativa

Los macrófagos M2 tienen propiedades antiinflamatorias, inhiben la producción de IFN- γ , antagonizan las respuestas a ésta -incluida la activación M1- y son inducidos por diferentes mediadores. Algunas de las propiedades bioquímicas y funcionales de estos macrófagos se describen a continuación, y son similares en células humanas y murinas, y dentro de los fenotipos se han mencionado 3 subtipos: M2a, M2b, M2c, y algunas autores indican un posible fenotipo M2d.

La activación M2a es promovida por IL-4 e IL-13, las cuales inducen fenotipos semejantes, probablemente porque sus receptores comparten la cadena IL-4R α . Ambas señalizan a través de componentes comunes; la unión de IL-4 e IL-13 causa la activación de JAK1 y Tyk2 y el reclutamiento del STAT-6, su fosforilación, dimerización, translocación al núcleo y activación transcripcional. STAT-6 actúa además secuestrando moléculas coactivadoras de STAT-1 y NF- κ B, suprimiendo la activación de genes inducidos por LPS e IFN- γ (20, 21). La IL-13 regula positivamente la expresión de los supresores de la señalización de citocinas como SOCS-1 que consecuentemente

bloquea a los STAT. IL-4 e IL-13 ejercen un gran número de acciones en los MØs que disminuyen la expresión de CD14, CD64, CD32 y CD16, incrementan la expresión de superficie de las subunidades de integrinas y receptores de complemento CD11b, CD11c y del MHC II, favoreciendo la presentación antigénica. Las IL-4 e IL-13 regulan negativamente la expresión de CD163 en monocitos humanos, favoreciendo el reconocimiento de carbohidratos de microorganismos y disminuyendo el de los cuerpos apoptóticos.

La producción de citocinas como IL-1 α / β , IL-6, IL-8, IL-10, PGE2, IFN- α y TNF- α promovidas por la estimulación con LPS es inhibida por IL-4 e IL-13 (22). En el metabolismo de lípidos, tanto IL-4 como IL-13 tienen diversos efectos. Ambas son moduladoras positivas de la 15-lipoxigenasa, mediando la producción de ligandos para el "Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ " (por sus siglas en inglés PPAR γ), receptor involucrado en la inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias, la expresión de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS2) y la transcripción de IL-2, lo que sugiere este mecanismo como vía indirecta de inhibición de la proliferación de células T por IL-4 (23, 24). IL-4 e IL-13 estimulan la expresión Arg1 *in vitro*, extinguiendo el sustrato de NOS2 (iNOS) e inhibiendo la liberación de ON. Los macrófagos productores de Arg1 participan en procesos de reparación tisular, fibrogénicos, en síntesis de colágeno y pueden tener acciones antiinflamatorias mediante la producción de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) que inhiben la expresión de NOS2 y la síntesis de citocinas proinflamatorias. La regulación del balance de los niveles NOS2-Arg1, sugiere que las mediciones de los niveles de ON y de la actividad Arg1 en distintas poblaciones de macrófagos podría reflejar su estado de activación (25); los macrófagos M2a modulan la proliferación y la síntesis de colágeno de los fibroblastos a través de la expresión de altos niveles de TGF- β 1. Estas acciones se llevan a cabo durante la resolución de reacciones inflamatorias agudas y crónicas (26,27).

Los macrófagos M2b difieren en gran medida a los M2a y M2c, pues tienen alta secreción de IL-10 y baja de IL-12, producen altos niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6; no expresan Arg1. Se caracterizan por promover la diferenciación Th2, la exacerbación de patologías relacionadas con citocinas de este tipo como asma, infecciones con helmintos, entre otras. En modelos murinos se ha descrito que la transferencia de macrófagos M2b en ratones con endotoxemia inducida por LPS, lo que ha sido asociado a su capacidad de producir IL-10 (28). Estudios en modelos murinos para la caracterización de esta población de macrófagos han mostrado que existe mayor semejanza celular entre los M2b y M1 que entre M2a y M2b, aunque los patrones de producción de citocinas (IL-12 e IL-10) entre estas dos poblaciones difieren (29). Tanto los M2b como los M2a producen altos niveles de ON y presentan baja actividad Arg1. Este fenotipo es opuesto al presentado por los M2a.

En el caso particular de la activación de tipo M2c, aunque IL-10, TGF- β y glucocorticoides son considerados moléculas inductoras del fenotipo, no comparten mecanismos de señalización intracelular y regulación génica. IL-10 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, la liberación del ON y ERO y las actividades antimicrobiales de los macrófagos. El TGF- β presenta un papel dual en la modulación de la función del macrófago, debido a que en algunas ocasiones actúa como activador proinflamatorio estimulando la transcripción de PDGF, IL-6, TNF- α e IL-1 β , mientras que en otras inhibe la producción de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β y también antagoniza la producción de ERN y ERO. Esto depende del estado de diferenciación del fagocito mononuclear; en estados tempranos de inflamación, TGF- β actúa localmente como un agente proinflamatorio a través del reclutamiento y activación de monocitos no activados; en la resolución de la inflamación predominan sus acciones antiinflamatorias debido a que los monocitos activados y diferenciados a macrófagos regulan negativamente la expresión del TGF β R y disminuyen parcialmente su sensibilidad al TGF- β . IL-10 y el TGF- β inhiben la expresión de MCP-1 inducida por LPS e IL-1 β .

En el caso de la IL-10 incrementa los niveles totales de Arg1 y 2 en fagocitos mononucleares. Esta citocina, al igual que el TGF- β , induce Arg1. IL-10 sinergiza con el LPS para incrementar la expresión de Arg2, IL-10 y TGF- β también se encuentran involucrados en la remodelación de la MEC y del tejido.

Otras citocinas que participan en conjunto son IL-10, IL-4 y IL-13 en la expresión de citocinas Th1, la inflamación y la activación inmune, que pueden ser explicados en parte por la regulación negativa de las acciones del NF- κ B y STAT1. La inhibición del NF- κ B parcialmente se explica por la activación común del zipper de leucina inducida por glucocorticoides (GILZ), que inhibe la expresión de TLRs (30).

Las principales características fenotípicas entre subtipos de macrófagos activados se resumen a continuación:

TIPO DE MACRÓFAGO	SEÑAL ACTIVADORA	FENOTIPO	
M1 ACTIVACIÓN CLÁSICA	M1	INF- γ TNF- α GM-CSF LPS PAMP's	Liberan citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6). Expresan MHC-II Presentan antígenos a células T Citotóxicos Microbicidas Destrucción y lesión tisular
		M2 ACTIVACIÓN ALTERNATIVA	M2a
M2b	Complejos inmunes TLR agonista a IL-1 β		Microbicidas Fagocitosis Expresan MHC-II Presentan antígenos a células T Expresan receptores scavenger
M2c	IL-10		Liberan IL-10, TGF- β , PDGF Altos niveles de arginasa Anti-inflamatorios (bajo regulan la respuesta M1) Liberan proteínas de matriz extracelular Promueven la cicatrización, reparación de tejidos Inflamación crónica

Figura 4. Tabla comparativa de los principales fenotipos de activación de macrófagos. La Activación M1 de manera general se considera citotóxica y proinflamatorio, sin embargo para la activación M2 existen tres subtipos de respuesta que dependen del ligando (16).

En un contexto antiinflamatorio, para inhibir la expresión de genes inflamatorios o impedir la acción de las citocinas proinflamatorias se han determinado las citocinas

antiinflamatorias, entre las que destacan las IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). La IL-6 es una citocina pleiotrópica que, en función del entorno, actuará como anti o proinflamatoria con un amplio espectro de actividades en la regulación inmune, hematopoyesis, inflamación y oncogénesis. Cuando esta citocina actúa como antiinflamatoria disminuye la liberación de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ y potencia la síntesis de las citocinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β . Por su parte, la IL-10 es una citocina esencial para la regulación de la respuesta inmune y el mantenimiento de la homeostasis tisular; es sintetizada mayoritariamente por los linfocitos T reguladores, monocitos, macrófagos y células dendríticas y su función principal es la de inhibir la síntesis de IFN- γ e IL-2, además de bloquear la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B (31).

Adicionalmente, en el desarrollo del proceso inflamatorio también se ha descrito la participación de otros mediadores proinflamatorios entre los que se incluyen distintos lípidos bioactivos (eicosanoides, prostanoides, resolvinas, protectinas y lipoxinas) (32). En la fase inicial de la inflamación, los neutrófilos y macrófagos liberan eicosanoides, mediadores lipídicos derivados del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico (AA) de las membranas celulares. El AA es sustrato de diferentes enzimas, como las del sistema citocromo P-450 o las lipoxigenasas (LOX) y ciclooxigenasas (COX), responsables de la síntesis de leucotrienos (LTs) y prostaglandinas (PGs), respectivamente.

Los macrófagos como una de las primeras líneas de defensa celular del sistema inmune, están directamente relacionados con mecanismos de respuesta inmediata a los desequilibrios sistémicos, tal es el caso de la inflamación aguda; sin embargo también están vinculados con la cronicidad de la misma en órganos tan especializados como el hígado y en mecanismos antiinflamatorios mediados por los mismos a través de las citocinas. Adicionalmente se ha descrito su participación central en fenómenos de resolución y reversión de la misma (33, 34, 35), y nos centraremos en lo que ocurre en el tejido hepático en particular y sus macrófagos.

5. Las células de Kupffer, los macrófagos hepáticos.

Como se ha mencionado anteriormente, los monocitos tienen la propiedad diferenciarse y depositarse en diversos tejidos, en donde adquieren características y fenotipos específicos. En el hígado se localizan y especializan, desde el origen fetal, las células de Kupffer; estas células eliminan de la circulación sanguínea todo tipo de partículas extrañas, innecesarias o alteradas mediante el proceso de fagocitosis y la depuración constante del hígado, el cuál es el órgano detoxificador por excelencia. También participan en el metabolismo de las lipoproteínas y desempeñan un papel clave en el proceso de captación y detoxificación de la endotoxina que llega del flujo venoso portal. Al igual que otros fagocitos mononucleares, actúan como células presentadoras de antígenos activando la respuesta inmunitaria derivada de los linfocitos T, y también pueden desencadenar una respuesta citotóxica semejante a la realizada por las células NK (*natural killer*) para eliminar células tumorales circulantes. El proceso de activación de los macrófagos da lugar a la secreción de potentes mediadores biológicos como radicales libres derivados del oxígeno, intermediarios del nitrógeno, numerosas citocinas y eicosanoides.

Sin embargo en recientes publicaciones se han descrito diferentes estadios de activación para los macrófagos: M1 y M2, y se ha demostrado que las células de Kupffer presentan la capacidad de polarizarse a cualquiera de estos dos fenotipos. Esta dualidad se debe a su plasticidad celular, la cual le confiere la capacidad de tener todo un espectro de activación con fenotipos diversos, pero de manera general se les ha denominado M1- proinflamatorio por un mecanismo de activación clásica y M2- antiinflamatorio por la vía de activación alternativa, cada uno contribuyendo con diferentes fenómenos de la respuesta inmune (8).

Las células de Kupffer se activan por partículas fagocitadas, cuerpos apoptóticos o detritos celulares así como por la unión a través de receptores específicos de compuestos como ésteres de forbol, LPS, factor del complemento C5a, factores de crecimiento como GM-CSF o M-CSF, IFN- γ y TNF- α . La endotoxina procedente de *Escherichia coli* o de otras bacterias (LPS) suele ser el compuesto habitualmente utilizado en el estudio de la activación de estos macrófagos. Se considera que los signos indicativos de la activación de las células de Kupffer son el incremento de su actividad fagocítica, la mitosis, el aumento de la rugosidad de la membrana, así como la liberación de compuestos con actividad biológica. Entre éstos destacan los mediadores inorgánicos, como el ión superóxido producido por la NADPH-oxidasa que tiene como objetivo el inactivar y destruir el material fagocitado (36).

Además de los radicales libres del oxígeno, las células de Kupffer activadas sintetizan óxido nítrico, proteasas, citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , factor de crecimiento transformante beta TGF- β , IFN- γ , ácido araquidónico, prostaglandinas (PG) y leucotrienos. Algunos de estos productos son también estimuladores o inhibidores de su propia síntesis. Así por ejemplo, el TNF- α estimula la síntesis de PGE₂, que a su vez inhibe la liberación de TNF- α . Por otro lado, la presencia de IFN- γ estimula la producción de PGE₂ y TNF- α , suprimiendo la síntesis de IL-1 β . También se ha comprobado tanto *in vitro* como *in vivo* que el IFN- γ puede desencadenar una respuesta citotóxica de las células de Kupffer contra células tumorales (37).

Gran parte de los mediadores liberados por las células de Kupffer ejercen sus acciones de forma paracrina sobre las células adyacentes. Por ejemplo, la IL-1 β por sí misma o en combinación con la IL-6 y el TNF- α no sólo modula la síntesis de ADN y la cantidad de proteína en los hepatocitos, sino también actúa sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos, así como la síntesis de albúmina en estas células; al tiempo que puede favorecer la secreción de adiponectina (38). Asimismo se ha demostrado que eicosanoides como los cisteinil-leucotrienos actúan de forma paracrina sobre las HSC e

inducen un incremento de la concentración intracelular de calcio y su contracción, mientras que el LTB₄ y la PGE₂ liberados por la célula de Kupffer inducen la secreción de IL-8 en los hepatocitos circundantes (39).

5.1. Activación M1/M2 en las células de Kupffer

En recientes publicaciones se han descrito diferentes estadios de activación para los macrófagos: M1 y M2, y se ha demostrado que las células de Kupffer presentan la capacidad de polarizarse a cualquiera de estos dos fenotipos. Esta dualidad se debe a su plasticidad celular. Dicha plasticidad le confiere la capacidad de tener todo un espectro de activación con fenotipos diversos, a los que se les ha denominado de manera general M1- proinflamatorio por un mecanismo de activación clásica y M2- antiinflamatorio por la vía de activación alternativa (54) cada uno contribuyendo con diferentes fenómenos de la respuesta inmune (7).

En el caso de las células de Kupffer, los macrófagos residentes del hígado, es posible detectar los mismos estados de activación M1/M2, que han sido estudiados *in vitro* en líneas celulares a través de la activación M1 mediada por lipopolisacárido LPS o las propias citocinas señalizadoras como INF- γ (63). En el caso de M2, Se ha descrito que la señalización que ocurre por la unión de la IL-4 a su receptor IL-4R participa de manera muy importante en el mecanismo de activación alternativa (46). Se ha detallado que la polarización a estos fenotipos, puede medirse por la señalización de moléculas como la adenosina (11) y muy recientemente se ha confirmado que es mediante receptores A_{2a} y A_{2b} en particular (12, 62).

5.2. Adenosina

El mecanismo de la adenosina descrito para la mayor parte de las células del sistema inmune es vía receptores, con potente acción inmunosupresiva endógena, reportándose que las células endoteliales y neutrófilos son las principales responsable de liberar altas concentraciones de adenosina en sitios de inflamación e infección. De la misma manera el efecto quimiotáctico de la adenosina se ha elucidado como protector, en el sentido de que provee señales para el reclutamiento de las células presentadoras de antígeno (APC) como macrófagos y dendríticas, responsables del aclaramiento de células apoptóticas y detritos, así como el combate de microorganismos y otros agentes patógenos.

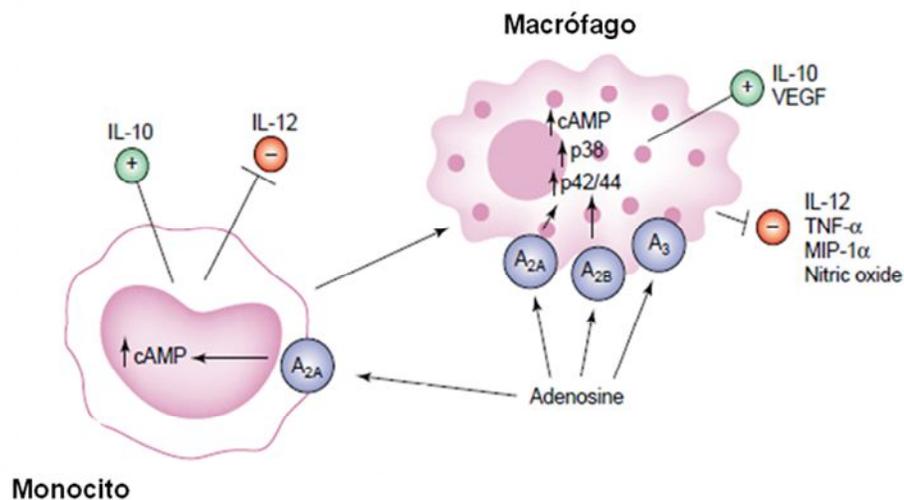


Figura 5. Adenosina en la respuesta inmune. Efectos de la adenosina y sus receptores en la respuesta inmune. Se ha descrito que los macrófagos expresan receptores de tipo A_{2A}, A_{2B} y A₃, los cuales regulan la liberación de citocinas pro y antiinflamatorias (11).

También se ha reportado que esta molécula, en etapas tardías del fenómeno inflamatorio o inmunológico contribuye a la etapa de resolución a través de bajo regulación de la activación de los macrófagos (72).

Señalización vía A2a/A2b

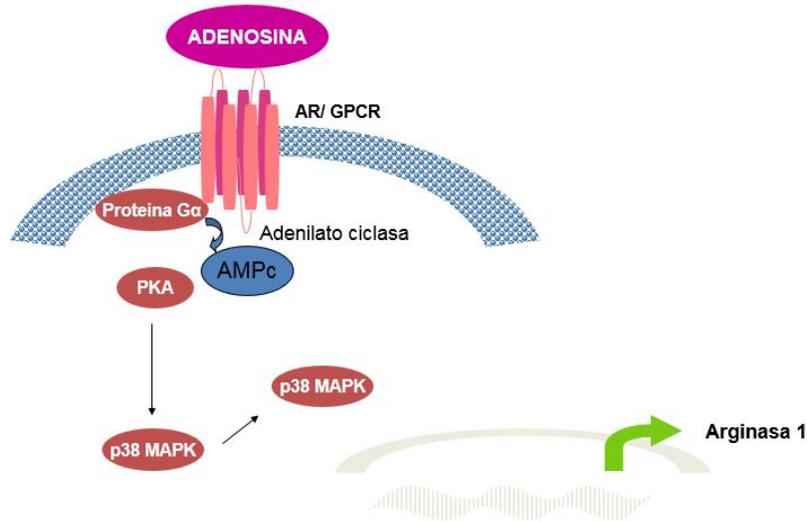


Figura 6. Vías de señalización alternativa para macrófagos M2. Los macrófagos pueden estar activados alternativamente por adenosina y la citocina IL-4, secretando citocinas antiinflamatorias al medio extracelular como IL-10 y mediante la activación de la enzima arginasa.

La adenosina se ha implicado en la supresión de las respuestas proinflamatorias de los macrófagos activados clásicamente inducidos por las citocinas Th1. La activación de macrófagos alternativa es inducida por las citocinas tipo Th2 como la interleucina IL -4 e IL-13; sin embargo, el papel de la adenosina en el control de la activación de macrófagos alternativa es desconocido (11). Se ha demostrado que el tratamiento con adenosina de macrófagos activados con IL-4 o IL-13 aumenta la expresión de marcadores de macrófagos alternativos como arginasa-1, el inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 de matriz (TIMP-1) y la lectina de tipo C y galactosa de macrófagos tipo-1. El efecto estimulante de la adenosina comúnmente requiere principalmente receptores de adenosina, en específico, el tipo A2B, esto debido a que experimentalmente, un agonista no selectivo de este receptor de adenosina, el 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) incrementó la actividad de la arginasa (EC (50) = 261.8 nM) y la producción de TIMP-1 (EC (50) = 80.67 nM). En este grupo de investigación, tanto el bloqueo farmacológico como el genético de los receptores A2B impidieron el efecto de NECA. Los receptores A2A también contribuyeron al aumento de

adenosina de la liberación de TIMP-1 inducida por IL-4. Con lo anterior se ha sugerido que la activación del receptor A2A de adenosina suprime la inflamación y promueve la restitución del tejido, en parte, al promover la activación alternativa de los macrófagos (11, 73).

En otro reporte, se identificó que los macrófagos murinos pueden ser activados por interferon- γ y / o agonistas del receptor tipo Toll (TLR) como la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS) para expresar un fenotipo inflamatorio (M1) caracterizado por la expresión de iNOS y citocinas inflamatorias como el TNF- α e IL-12. En contraste, las citocinas IL-4 e IL-13 de Th2 activan los macrófagos al inducir la expresión de arginasa-1 y la citocina antiinflamatoria IL-10 en una forma dependiente del receptor-IL (IL-4R α) de IL-4. Los macrófagos activados de esta manera se designan como macrófagos "activados alternativamente" (M2a). Los agonistas del receptor A2A de adenosina (A2AR) actúan de forma sinérgica con los agonistas TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9 para cambiar los macrófagos a un fenotipo "similar a M2"; sin embargo en 2013, Ferrante y colaboradores decidieron clasificarlos como un nuevo fenotipo denominado "M2d" (72). La señalización de adenosina suprime la expresión dependiente de TLR de TNF- α , IL-12, IFN- γ y otras citocinas inflamatorias que son liberadas por macrófagos e induce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e IL-10. En ratones que carecen de un gen funcional de IL-4R α (ratones IL-4R α (- / -)) la activación se está mediado por adenosina y no se requiere señalización dependiente de IL-4R α . Los macrófagos M2d expresan niveles altos de VEGF, IL-10 e iNOS, niveles bajos de TNF- α e IL-12 y niveles ligeramente elevados de arginasa-1. Por lo anterior y para facilitar el estudio de estas células, el uso de estos marcadores *in vivo* nos permite identificar macrófagos "M2" y proporcionar así una imagen del estado funcional de los macrófagos (74).

La inflamación crónica, en el contexto hepático

La acumulación y activación de macrófagos constituyen la piedra angular de la inflamación crónica. Las citocinas liberadas por macrófagos activados de manera crónica estimulan la proliferación de fibroblastos mediante la transformación de las células estelares hepáticas (hepatic stellate cells por sus siglas en inglés HSC) quiescentes y la producción de colágena (75). Un tipo de tejido cicatrizal se desarrolla en los sitios de inflamación crónica mediante un proceso denominado fibrosis a través de la acumulación excesiva de MEC, respuesta que puede interferir con el funcionamiento tisular normal. Adicionalmente se desencadena un estrés oxidante producto de la liberación de ión superóxido y óxido nítrico, cuyas fuentes principales son los propios macrófagos activados. Es posible que dicha inflamación origine granulomas, consistente en una zona central de macrófagos activados rodeada por linfocitos también activados, rodeados por exceso de matriz extracelular. A menudo el centro de este granuloma contiene células gigantes multinucleadas formadas por la fusión de macrófagos activados. Es por ello que las células de Kupffer desempeñan un papel clave en la defensa inmunitaria innata.

Por otro lado, se considera que las células de Kupffer también implicadas en la patogénesis del rechazo agudo del hígado, puesto que estos macrófagos son capaces de modular la respuesta inmunitaria local al actuar como células presentadoras de antígenos, de regular la activación de los linfocitos T y de participar en el desarrollo de tolerancia a antígenos solubles de origen gastrointestinal.

La capacidad para modificar su fenotipo a distintos tipos de activación, podría ser clave en la activación de procesos de reparación de tejido.

Fibrogenia

La fibrosis hepática es el resultado de un proceso inflamatorio y de reparación del tejido que se produce en respuesta a una agresión externa del hígado. De forma muy resumida, se puede decir que la inflamación es la respuesta defensiva de los organismos vivos a la agresión de agentes externos, y comprende un amplio abanico de eventos como la activación enzimática, la liberación de mediadores solubles, la extravasación de fluidos/células, la adhesión y migración celular y la destrucción del tejido lesionado y, su posterior, reparación. En condiciones normales, mediante la respuesta inflamatoria se consigue eliminar el agente causante del daño hepático. Sin embargo, en determinadas circunstancias, especialmente si el daño se genera de forma crónica, la respuesta inflamatoria no se resuelve de forma adecuada y se autoperpetúa en el tiempo, dando lugar a procesos de secreción inadecuada de matriz extracelular y a la aparición de fibrosis (76).

El principal tipo celular responsable de la secreción de proteínas de matriz son las HSC en su estado activado. Por este motivo, la activación y proliferación de las HSC constituye un proceso clave en el desarrollo de fibrosis hepática. Por su parte, las células de Kupffer, mediante su acción de liberación de citocinas, eicosanoides y factores de crecimiento, desempeñan un papel primordial en la activación y proliferación de las HSC. En este sentido, se ha observado que el medio condicionado procedente de cultivo de células de Kupffer promueve la proliferación de los HSC y la síntesis de colágeno, proteoglicanos y hialuronato, efecto que es más acentuado cuando las células de Kupffer proceden de hígados de ratas tratadas con CCl_4 (77), el cuál es un modelo experimental de cirrosis inducida. Se han identificado numerosos compuestos liberados por las células de Kupffer que pueden ejercer este efecto proliferativo y estimulador de las HSC, y entre ellos destacan el $\text{TGF-}\beta$, eicosanoides, PDGF, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{IFN-}\gamma$.

Las células de Kupffer contribuyen también a la activación de las HSC mediante la degradación de la matriz extracelular subendotelial, la cual, como es sabido, mantiene a

las HSC en su estado quiescente. En resumen, las células de Kupffer activadas son las principales productoras de colagenasa tipo IV/ gelatinasa tipo B y MMP9, con capacidad de digerir esta matriz extracelular y, por lo tanto, de inducir la activación, proliferación y migración de las HSC.

Activación de macrófagos inflamatorios por fagocitosis de hepatocitos.

Es importante mencionar que existe una correlación directamente proporcional entre la apoptosis de los hepatocitos y el proceso de fagocitosis y activación intracelular, durante los procesos patológicos hepáticos, tales como la cirrosis (83). En cirrosis y fibrosis hepática, en particular, se ha descrito desde el año 2004, una asociación entre la apoptosis de hepatocitos por la presencia de estímulos hepatotóxicos, como el etanol y el proceso patológico (83), tal y como se ha descrito para los macrófagos en cultivo que requieren esencialmente de las células apoptóticas para su activación (19). Se sugiere que los cuerpos apoptóticos son señal suficiente para que las células de Kupffer se diferencien en un fenotipo M1, por lo que se propone que el cuerpo apoptótico actúa vía los TLRs (señal tipo PAMP), generando cascadas de activación intracelular y activando la expresión de genes de citocinas proinflamatorias. Se reconocen dos fenómenos principales que son consecuencia de la activación de macrófagos: el primero es la liberación de TGF- β , que activa a las células estelares y, por tanto, se induce la acumulación de matriz extracelular durante el proceso profibrótico y el otro que relaciona con la reparación de tejidos. Sin embargo probablemente existe un segundo tipo de macrófagos involucrados los M2c que exhiben este mismo comportamiento profibrogénico, aunque se consideren antiinflamatorios, ya que su mecanismo de activación es distinto vía IL-10 y TGF- β , y se han relacionado directamente con la respuesta inflamatoria crónica.

Parte de los procesos que realizan estas células de Kupffer son metabólicos, tal es el caso de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas que son principalmente

captadas y metabolizadas en el hígado por éstas células y las endoteliales (Sinusoidal Endothelial Cells por sus siglas en inglés SEC) (83). Los receptores responsables de la captación de lipoproteínas por las células de Kupffer son los denominados receptores *scavenger*, también presentes de forma muy evidente en las SEC, los cuales internalizan las lipoproteínas haciéndolas susceptibles a la degradación endosomal. Las células de Kupffer y las SEC poseen la misma capacidad de captación de LDL oxidadas y acetiladas, pero el proceso no está mediado por los mismos receptores. De hecho, se ha caracterizado recientemente un receptor para LDL oxidadas en las células de Kupffer homólogo a la molécula CD68 murina que no está presente en las SEC. También se ha identificado en estos macrófagos hepáticos la expresión del receptor *scavenger* BI (scavenger receptor class B type I, SR-BI por sus siglas en inglés) para la lipoproteína de alta densidad (HDL) rica en ésteres de colesterol, receptor que desempeña un importante papel en el llamado transporte reverso de colesterol y el metabolismo de lípidos que se encuentra alterado en las hepatopatías como hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis y en cirrosis de igual manera.

La activación alternativa de los macrófagos en la inflamación crónica.

Se conoce que en los macrófagos, existen 3 de los receptores para adenosina (A2a, A2b y A3) y que su mecanismo intracelular consiste en el incremento de cAMP, p38 y p42/44 dando como consecuencia una elevación en los niveles de IL-10 (citocina antiinflamatoria) y VEGF y disminución en los niveles de TNF- α , NO y MIP-1 α . Tres de estas respuestas (aumento de IL-10, disminución de NO y TNF-alfa) se han observado a nivel de tejido hepático con el IFC-305 en un modelo *in vivo* de cirrosis inducida con CCl₄ (90), dando paso a la propuesta del estudio a detalle del papel de las células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado) en este efecto. Se ha reportado que de manera puntual, la presencia de un fenotipo M2, promueve la protección hepática en cirrosis alcohólica.

La cirrosis como un proceso de inflamación crónica.

La respuesta inmunitaria adaptativa ocurre posterior a la respuesta inflamatoria, y en ella las células inmunológicamente competentes (monocitos-macrófagos y linfocitos) migran y se activan en respuesta a sustancias liberadas durante la fase inflamatoria aguda (IL-1 β , IL-2, TNF- α o leucotrienos). El desarrollo de la respuesta inmunitaria suele ser transitorio y autorregulable por el propio tejido cuando el agente agresor es neutralizado o fagocitado. Sin embargo, cuando esto no ocurre se llega a la fase crónica de inflamación en donde se liberan numerosos mediadores (GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , PDGF) que autoperpetúan el proceso inflamatorio, donde los inhibidores pierden su capacidad regulatoria, como en el caso de las caspasas o los TIMPs factores denominados inhibidores de las metaloproteasas.

Dependiendo de las condiciones, algunos microorganismos son capaces de evadir los mecanismos de eliminación por el sistema inmunitario y llevar a una infección crónica o latente en el hígado, por ejemplo los virus de hepatitis poseen componentes en la pared celular que les permiten resistir la fagocitosis, tal es el caso del virus de hepatitis B y C, aunque también se han reconocido otros mecanismos para la evasión de la respuesta inmune por parte de estos virus. Adicionalmente, otras moléculas de exposición crónica tales como el etanol o el CCl₄ pueden inducir una reacción inflamatoria crónica a nivel hepático y dar lugar a una lesión tisular grave. Asimismo puede ocurrir inflamación crónica como consecuencia de procesos autoinmunes o por la lesión tisular que acompaña a muchos tipos de cáncer.

Para estudiar de manera más detallada, el comportamiento de esta población celular, en una hepatopatía como la cirrosis, se ha empleado un modelo de un agente hepatotóxico denominado CCl₄ (Tetracloruro de carbono).

Origen y cinética de las células Kupffer. El modelo de cirrosis experimental CCl₄.

En la actualidad todavía existe gran controversia sobre el origen y la capacidad proliferativa de las células de Kupffer en condiciones normales. De acuerdo con el concepto de sistema mononuclear fagocítico, los macrófagos residentes en un tejido proceden del reclutamiento de monocitos circulantes y, por lo tanto, serían células muy especializadas de vida corta, terminalmente diferenciadas y sin capacidad proliferativa (75). Sin embargo, en estudios experimentales se ha observado que la población de macrófagos tisulares o de sus precursores no se ve afectada por la inducción de monocitopenia grave mediante la administración de estroncio (Sr) o la irradiación fraccionada de la médula ósea. Estas observaciones serían compatibles con el concepto actualmente vigente de que, en condiciones normales, la población de células de Kupffer es capaz de proliferar localmente y mantenerse durante largos períodos sin el aporte de monocitos circulantes. De hecho, estudios de ontogenia hepática sugieren la existencia en el hígado de 2 tipos de macrófagos de distinto origen hematopoyético (75). Según estos estudios, existiría una población de macrófagos procedentes de los monocitos circulantes originados en la médula ósea y otra población de macrófagos tisulares resultantes de la hematopoyesis temprana acontecida durante el desarrollo embrionario. La capacidad proliferativa de las células de Kupffer ha sido también analizada en distintos modelos experimentales, confirmando el potencial mitótico de estas células en condiciones normales y la posibilidad de modular tanto *in vivo* como *in vitro* su maduración y capacidad proliferativa mediante factores solubles, tales como el M-CSF.

La capacidad proliferativa de las células de Kupffer adquiere mayor relevancia en el curso de los procesos inflamatorios hepáticos crónicos. En este sentido, se ha descrito que la población de células de Kupffer se incrementa significativamente durante las etapas iniciales de la lesión hepática y que tiene una participación esencial en la progresión de las lesiones (76). En el caso concreto de la fibrogénesis y cirrosis, esta puede ser inducida por tóxicos o moléculas que se denominan hepatotóxicos, entre ellos de uso común se encuentra el tetracloruro de carbono o CCl₄ y el uso de sobredosis de

paracetamol. En el modelo de CCl_4 puede reproducirse experimentalmente la falla hepática aguda (administración intragástrica) o fibrosis y cirrosis (hepatotoxicidad crónica por vía de administración intraperitoneal). Esto comúnmente se realiza en modelos murinos (ratas o ratones), los cuáles son administrados con el hepatotóxico a concentraciones definidas y que generan cambios en la estructura y función hepática, esencialmente la muerte de hepatocitos por el metabolismo por citocromo del tetracloruro de carbono a ión triclorometano, sobreactivación de enzimas como ALT y AST. También se ha identificado que en el modelo se producen los cambios que celularmente dan origen a la cirrosis, como la transformación de las HSC a miofibroblastos, la acumulación de matriz extracelular de manera exacerbada y la cascada inflamatoria, en la que participan las células de Kupffer. La población de células de Kupffer triplica su número (Células ED-2+) entre las 4 y las 8 semanas de tratamiento, dependiente de la concentración empleada de dicho hepatotóxico. En la **Figura 7** se muestra el comportamiento teórico de la población durante la inducción experimental de la cirrosis por CCl_4 .

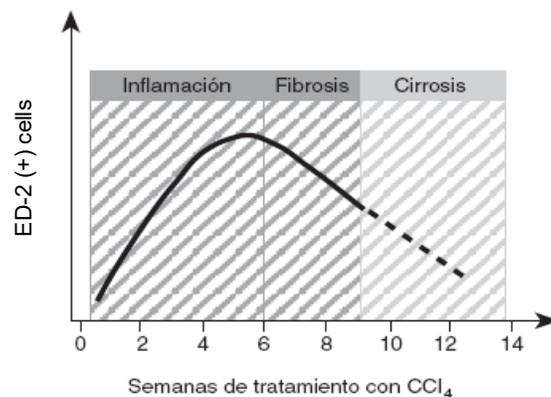


Figura 7. Cinética de la población de células de Kupffer en el daño hepático por CCl_4 . En la gráfica se muestra de forma resumida los datos disponibles sobre el crecimiento de la población de células de Kupffer durante el curso de la enfermedad hepática inducida por CCl_4 en ratas (77).

Durante la cirrosis experimental, se propone que las células Kupffer participan como consecuencia del incremento de los niveles de calcio y de estrés oxidante por el CCl_4 . A continuación también se liberan eicosanoides tóxicos y las citocinas $\text{IL-1}\beta$ por un

mecanismo dependiente de calcio intracelular (78) y de INF- γ (79). Además, en este modelo experimental existe una asociación muy estrecha entre el número de células de Kupffer y el grado de desarrollo de fibrosis. Sin embargo, una vez que la cirrosis se ha establecido, el número de células de Kupffer disminuye significativamente coincidiendo con la aparición de una alteración en la función reticuloendotelial y fagocítica del hígado (80). En la actualidad no se conoce sí el aumento de la población hepática de células de Kupffer durante la lesión ocasionada por CCl₄ es consecuencia del reclutamiento de monocitos circulantes o de la proliferación local de células de Kupffer, aunque se sugiere que posiblemente sea el resultado de ambos procesos.

Además de ser el principal tipo celular responsable de la liberación de productos biológicamente activos en el microambiente hepático, las células de Kupffer activadas incrementan significativamente su número en el hígado cuando se activa su reparación. Por ejemplo, en las 6 h posteriores a la administración de CCl₄ se ha observado su aumento, alcanzando un máximo a las 72 h (81) y por otra parte son esenciales en la conservación de la estructura del tejido parenquimal. Su papel clave en el desarrollo de la lesión hepática ha sido confirmado al inactivar o eliminar selectivamente esta población mediante el tratamiento con cloruro de gadolinio (GdCl₃); en estas circunstancias, no se observaron incremento en niveles de aspartato aminotransferasa (AST) o la muerte de las células hepáticas parenquimales tras la administración de CCl₄ (82).

La inflamación hepática y su reversión. Participación de las células de Kupffer.

La dinámica de la respuesta inflamatoria está mediada celular y molecularmente, de manera esencial por quimiocinas y citocinas, pero también existe un fenómeno local mediado por las mismas y el microambiente celular. El origen esencialmente de todos los mediadores inflamatorios es el hígado, donde se regula la secreción de proteínas de fase aguda y la síntesis *de novo* de diversas citocinas. El resultado del estado activado

clásicamente, del macrófago M1, muestra un aumento de la expresión de moléculas como MHC II, mayor actividad microbicida y secreción de citocinas inflamatorias. No obstante en una inflamación crónica, los macrófagos activados liberan enzimas hidrolíticas e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, que provocan daño a los tejidos circulantes.

De forma inicial la **IL-1 β** es secretada de manera inmediata ante la presencia de daño en el tejido y depende su secreción de la activación del inflamosoma (43) Se le considera como una citocina “maestra” ya que regula múltiples procesos inmunológicos y fisiológicos. También se han descrito a los macrófagos, como principales productores de IL-1 β para la inducción del inflamosoma por NLRP3, mediante la inducción por LPS. Esta activación es rápida y relativamente corta y requiere de ATP, es regulada por la presencia de IL-10, que reduce la señal de Akt. Se ha reportado que el tratamiento en cultivos de macrófagos con adenosina incrementa la secreción de IL-1 β , pero que este mecanismo es específico del subtipo de macrófago, esencialmente por el microambiente, lo que podría representar una opción terapéutica directa en la modulación o regulación de la producción de IL-1 β (43). La citocina IL-1 β interacciona con 2 tipos de receptores y juega un papel esencial en las señales que derivan en la cirrosis. Recientemente se ha observado que su acción *in vivo* tiene relación directa en la activación de las HSC, para el establecimiento de la fibrosis hepática (44). Junto con IL-6, la IL-1 β causa elevación de las proteínas hepáticas de fase aguda (por ejemplo el fibrinógeno y proteína C reactiva), las cuales están mediando mecanismos de señalización intracelular, por unión a su receptor, cómo la activación de transducción de señales para la unión de factores de transcripción como NF-kB (45). Es importante señalar, que dentro de las citocinas proinflamatorias, la IL-1 β juega un papel esencial en la señalización de la cirrosis, recientemente se ha demostrado que su acción *in vivo* está directamente relacionada con la activación de las HSC para el establecimiento de la fibrosis hepática (35).

En el caso de **IL-6** la liberación está inducida por la IL-1 β y se incrementa en respuesta a TNF- α . Esta es una citocina con diversos efectos inflamatorios, aunque se han sugerido efecto antiinflamatorios asociados con la activación de TGF- β o con procesos fibrogénicos, con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria y debido a esto se ha involucrado con la activación de los mecanismos fibrogénicos de la cirrosis (47).

Asimismo, induce la expresión de metaloproteinasas (MMP's) y sus inhibidores específicos (TIMP's). Por otra parte, se conoce su papel para favorecer la proliferación de los hepatocitos inducida en una hepatectomía parcial. Se ha observado que sus niveles, en conjunto con IL-1 β y TNF- α , se elevan en pacientes con hepatitis alcohólica, lo cual sugiere una asociación con el curso de la enfermedad (48). La citocina IL-6 es una importante citocina pro-fibrogénica que todavía se produce en la cirrosis de manera crónica pero se han descrito otras funciones de regulación autocrina, que se detallarán más adelante (58).

En cuanto a un contexto antiinflamatorio, el caso de **IL-10**, una citocina que es secretada principalmente por algunos subtipos de linfocitos T activados (Tregs, Tr). Asimismo, favorece la activación y la proliferación de células B, timocitos y células cebadas. En cooperación con TGF- β , favorece el cambio de isotipo y la síntesis de IgA de las células B. Se conoce como una de las principales citocinas antiinflamatorias. La IL-10 es producida principalmente por células presentadoras de antígeno como las células dendríticas y los macrófagos, juega un papel muy relevante en la inmunorregulación, la defensa y homeostasis. La producción de IL-10 por macrófagos y CD a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) ha sido la más ampliamente estudiada. Los macrófagos producen IL-10 como consecuencia del reconocimiento de PAMPs por sus PRRs, incluidos los TLR, los receptores de lectina de tipo C, los receptores RIG-1 (gen inducible por el ácido retinoico 1) y los receptores de tipo NOD. Los PAMP se unen a los TLR con su dominio de interacción con TLR (TIR), iniciando la señalización en macrófagos con la ayuda de adaptadores intracelulares que conducen a la activación de múltiples miembros de las MAPK y posteriormente los

factores de transcripción como NF- κ B y la proteína de unión al elemento AMP cíclico fosforilado (CREB). Los TLR también pueden actuar en sinergia con otros agonistas como IL-4 y PGE2 para aumentar la producción de IL-10 (49) e incluso se ha descrito su liberación mediada por adenosina.

En el caso de la regulación y la reversión de la inflamación la **IL-4** promueve el crecimiento y el desarrollo de las células B y tiene efectos *in vivo* sobre la hematopoyesis, asimismo favorece la reacción de fase aguda. Se ha descrito como una de las citocinas de activación alternativa para macrófagos, atenuando la producción de mediadores proinflamatorios, como citocinas, NO o ERO. También se ha reportado que esta citocina, junto con IL-13 y la presencia de células apoptóticas, son esenciales en la respuesta de los macrófagos para la antiinflamación y la reparación de tejidos (46).

Para el caso del factor **TNF- α** en el hígado parece ser secretado en mayor proporción por las células Kupffer y existen reportes de que la activación de éstas previene la lesión hepática inducida por alcohol (38). Asimismo, actúa de manera sinérgica con el INF- γ para iniciar la reacción inflamatoria crónica, al tiempo que promueven cambios en ICAM-1, selectina E y MHC de clase I. Este cambio en la cantidad de moléculas de adhesión intracelular facilita el reclutamiento de células sanguíneas (neutrófilos y linfocitos) durante la inflamación. En el modelo de CCl₄, se ha demostrado la participación de factores quimiotácticos tales como el TNF- α (37). El TNF- α provee señales importantes para el reclutamiento de monocitos y fibroblastos en las etapas iniciales de lesiones hepáticas. Durante el proceso de inflamación y reparación tisular se caracteriza por el reclutamiento ordenado y progresivo de células inflamatorias, empezando por las plaquetas, seguido por la emigración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, para concluir con la participación de los fibroblastos. En este mismo contexto, la quimiocina **MCP-1**, también conocida como MCAF ("monocyte chemotactic and activating factor") o CCL2 actúa de forma selectiva sobre poblaciones de monocitos, macrófagos, linfocitos T y basófilos, mediante unión a receptores específicos. Se piensa que la capacidad de MCP-1 de activar la quimiotaxis sobre estos tipos celulares está relacionada con la

inflamación crónica. Pruebas experimentales sustentan que durante la cirrosis se presenta un infiltrado inflamatorio con expresión de MCP-1 muy elevada, encontrándose incluso una relación lineal entre la concentración de MCP-1 y monocitos infiltrados, además de la liberación de ácido araquidónico (39, 40). Debido a su gran variedad de acciones se piensa que MCP-1 desempeña un papel muy relevante en la mediación de la respuesta inmune (41). MCP-1 al mismo tiempo que IL-8 son las quimiocinas más importantes para el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN) y monocitos, respectivamente. En la inflamación aguda el infiltrado es inicialmente de PMN y después de 24 a 48 horas predominan los macrófagos. Este proceso de transición entre estos dos tipos de leucocitos estaría relacionado a la cinética y propiedades funcionales de las quimiocinas IL-8 y MCP-1 respectivamente. Cuando los PMN y otras células son estimuladas por citocinas inflamatorias, la **IL-8** es producida tempranamente y por 24 horas, reclutando y activando localmente más PMN. Una producción prolongada de IL-8 puede producir una alta concentración de esta quimiocina en los vasos, lo cual inhibe la adhesión de PMN al endotelio y la extravasación de los mismos. La producción de MCP-1 está usualmente retardada pero sostenida por varios días, su producción no sensibiliza a las células y conduce a un reclutamiento tardío de monocitos. Es interesante destacar que la estimulación de neutrófilos con citocinas inflamatorias por varias horas produce selectivamente MCP-1 y no IL-8 observándose además que el complejo IL-6-s-IL-6Ra puede activar a las células endoteliales para secretar IL-8 y MCP-1 (42). El MCP-1 tiene actividad de citocina quimioatrayente y puede activar monocitos, se comporta de manera similar a la citocina IL-1 β durante las primeras fases de inflamación. El aumento de MCP-1 está reflejando el comportamiento de los macrófagos en el hígado, que presumiblemente está regulando por esta citocina quimioatrayente la migración de más monocitos al hígado, por causa del daño.

Por otro lado, dentro de estos fenómenos inflamatorios, de manera particular, mencionaremos a **RANTES**, es una citocina que es miembro de la superfamilia de citocinas interleucina-8. Es quimiotáctica para células T, eosinófilos y basófilos. Juega

un papel importante en el reclutamiento de leucocitos en sitios inflamatorios. Con la ayuda de citocinas particulares (IL-2 e IFN- γ) que son liberadas por las células T, CCL5 induce la proliferación y activación de ciertas células NK para formar células asesinas activadas por quimiocinas. CCL5 también puede promover la infiltración de células NK en el hígado durante una lesión hepática aguda y crónica a través de la interacción con CCR1 expresada en células NK, actúa como un importante regulador de las respuestas inmunitarias locales y dirige las células inmunitarias a los sitios de inflamación.

Estas interrelaciones entre citocinas y quimiocinas se producen en todos los procesos biológicos donde intervienen estas proteínas, es por ello el interés de su estudio en este trabajo. La resolución de la inflamación también se han considerado producto de éstas y otras moléculas bioactivas, como el ATP, que al ser liberadas al espacio intercelular pueden activar a los macrófagos alternativamente, tal es el caso de la adenosina. La adenosina como mencionamos previamente, es un nucleósido que se sintetiza *de novo* o por degradación de otras biomoléculas, posee un tiempo de vida media muy corto para ejercer sus múltiples acciones fisiológicas, inclusive sobre la respuesta inmune, lo que se ha detallado previamente, y esencialmente en la regulación de la polarización de los macrófagos, lo cual podría representar un fenómeno clave en los procesos cirróticos.

Actualmente se conoce que la cirrosis y las enfermedades del hígado son un problema de salud nacional en México, las estadísticas muestran que las estrategias terapéuticas aún no son suficientes para abatir el índice de mortalidad por diversas etiologías como el alcoholismo, virales, entre otras (84), que requiere un abordaje distinto como pudiera ser el uso de un activación de la respuesta inmune y los macrófagos particularmente.

En años recientes, se ha trabajado en el desarrollo de diversas moléculas que pudieran revertir la cirrosis, entre ellas, un fármaco denominado IFC-305 (85), una sal derivada

de adenosina que ha mostrado la capacidad de hepatoproteger y revertir la cirrosis experimental inducida por CCl₄ en un modelo murino (86,87).

Antecedentes de la molécula experimental en el tratamiento de la cirrosis IFC-305

En el estudio y búsqueda de moléculas que ejercieran efectos hepáticos de reversión de la cirrosis, el grupo de la Dra. Chagoya exploró el uso del nucleósido adenosina. La primera aproximación fue determinar algunos efectos de la molécula de adenosina sobre el daño producido por CCl₄ en un modelo de ratas Wistar inyectadas crónica o agudamente con el hepatotóxico, en este modelo se encontró que existe recuperación de tejido parenquimatoso. También se determinó que la función hepática se restablece, detectado mediante los niveles de bilirrubina, albúmina, alanina transaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). Por otra lado, hay normalización de la relación Colágena I / Colágena III y una considerable disminución de los inhibidores de colagenasas TIMP-I y TIMP-II. Se recupera la función del hepatocito, restableciendo la carga energética, la estructura y función de la mitocondria, normalizando el potencial RedOx (87) y reactivando la regeneración hepática (88). Sin embargo esta molécula de manera fisiológica no es muy estable, se metaboliza en menos de 20 minutos y no es posible patentarla para su uso por su naturaleza endógena, de ahí que surgiera el trabajo en conjunto con el Dr. Hernández-Luis de Facultad de Química y otros colaboradores para sintetizar derivados de adenosina en la UNAM. De las opciones químicas, la seleccionada fue una sal, que se forma a partir de aspartato y a la que se le denominó IFC-305 (siglas del Instituto de Fisiología Celular y Laboratorio de trabajo de la Dra. Chagoya). Esta molécula permitió que los resultados positivos de la adenosina en el hígado se reprodujeran con el compuesto IFC-305, la sal derivada, con la que adicionalmente se demostró que a nivel genético, desplaza la expresión de múltiples genes diferenciales de la cirrosis hacia valores normales, modificando más de 40 genes asociados a inmunidad y ejerce un efecto proliferativo en el ciclo celular (89, 90). De

manera muy reciente también se han demostrado efectos a nivel epigenético y en la reversión y control de hepatocarcinoma, así como cambios en los ciclos de diferenciación de células hepáticas.

Cuando se realizó la evaluación a nivel de respuesta inmunológica el efecto del fármaco IFC-305 en un modelo experimental de cirrosis inducida con CCl₄, se determinó que la cinética de población de las células de Kupffer detectada por citometría de flujo se modifica durante la evolución de la cirrosis, y en un proceso de reversión de la misma, disminuyendo el número de CK inflamatorias M1 (CD163+/CD11b+) en hígado (90). También se encontró que existen cambios en otras poblaciones inmunológicas asociadas, como el aumento de los precursores monocíticos de médula ósea y los granulocitos y las células T y B en hígado (90).

En el caso de las citocinas asociadas a la activación del proceso inflamatorio como IL-1 β disminuyen por efecto del tratamiento, así como sucede con los niveles del factor de crecimiento transformante TGF- β (92). Las concentraciones de citocinas con papeles duales y las asociadas a los fenómenos de activación como son IL-4, INF- γ , IL-10 e IL-6 también se ven modificadas a niveles séricos y en homogenados de hígado de ratas del modelo *in vivo*. A las 10 semanas de tratamiento con el fármaco IFC-305, se presenta un nivel elevado de adiponectina, disminución de la actividad iNOS, y aumento en la actividad de arginasa I, polarizando así, potencialmente, la respuesta de las células de Kupffer involucradas, a un fenotipo de tipo M2, antiinflamatorio *in vivo*.

En virtud de elucidar el mecanismo de acción, a nivel *in vitro*, se han estudiado y se encontraron los siguientes efectos del IFC-305, sobre distintas estirpes celulares aisladas como hepatocitos (91). Primeramente el IFC-305 es capaz de modificar la apoptosis inducida por CCl₄ en los hepatocitos, fenómeno vinculado con la activación del fenotipo M1/M2 de los macrófagos, reportado en la literatura (92). Del mismo modo, la molécula mencionada inhibe la activación de las células estelares a miofibroblastos;

mecanismo que se ha asociado a la interacción con las células de Kupffer en otros modelos por medio de TGF- β y/o citocinas (92).

Sin embargo, hasta el momento se desconoce el papel que éste fármaco IFC-305 tiene sobre las células de Kupffer aisladas, y principalmente el efecto que ejerce sobre los mecanismos de activación de tipo M1/M2, polarizando potencialmente a éstas células a un fenotipo antiinflamatorio que contribuya directamente a la reversión observada en la cirrosis inducida por CCl₄ *in vivo*.

En el presente estudio se pretende comprender, como ésta molécula IFC-305 podría estar modificando el fenotipo de los macrófagos residentes del hígado cuando son expuestos a LPS (activación clásica M1) mediante el uso de un modelo *in vitro* de células de Kupffer aisladas de ratas Wistar sanas. La disección del mecanismo implicado que puede estar relacionado con la activación enzimática de la arginasa y 5-LO (5-lipooxigenasa), acompañado de la liberación de citocinas antiinflamatorias de las células de Kupffer inducida por la IFC-305, conduciendo a estas células con el fenotipo denominado como M2 (alternativa células de Kupffer activa) que contribuye al efecto hepatoprotector de la molécula.

Justificación

La cirrosis y las enfermedades del hígado son un problema de salud Nacional en México, ocupan el 4º. lugar en tasa de mortalidad y las proyecciones estadísticas muestran que las estrategias terapéuticas aún no son suficientes para abatir el índice de mortalidad por diversas etiologías como el alcoholismo, virales, entre otras (84).

A pesar del desarrollo de moléculas antioxidantes, algunos derivados naturales hepatoprotectores como la silimarina e incluso moléculas que frenan y eliminan el virus de hepatitis C como la novedosa inmunoterapia con uso de anticuerpos monoclonales, aún se requiere un abordaje distinto como pudiera ser el uso de una activación de la respuesta inmune y los macrófagos reparadores de tejido particularmente, ya que las posibilidades terapéuticas actuales no han logrado frenar la patología en estadios avanzados, donde el tejido de matriz extracelular sustituye el tejido parenquimatoso e induce la pérdida de la función hepática y falla hepática letal.

Elucidar parte del mecanismo por el cual el fármaco experimental IFC-305 ejerce su acción antiinflamatoria y hepatoprotectora en las células de Kupffer *in vitro*; comparando sus efectos con los producidos por activación clásica del LPS; podría proveer más información que apoye su uso en la reversión de la cirrosis e incluso en terapias adicionales para combatir otras patologías asociadas a inflamación y la activación de los macrófagos, donde los macrófagos M2 reparadores de tejido contribuyen a la reversión de la inflamación y la reparación de los tejidos.

Hipótesis

El fármaco IFC-305 es capaz de activar alternativamente (fenotipo M2) a las células de Kupffer *in vitro*.

Objetivos

1. Determinar la concentración de IFC-305 y/o LPS para los ensayos *in vitro* mediante curvas dosis-respuesta de las células de Kupffer en cultivo.
2. Comparar el efecto que produce la activación M1 inducida con LPS respecto al fenotipo producido por el fármaco IFC-305 (M2) en las células de Kupffer en cultivo.
3. Caracterizar sí el tipo de activación que produce el IFC-305 en las células de Kupffer en cultivo es M2.
4. Determinar la interacción entre el fármaco IFC-305 y las células de Kupffer a nivel de receptores, transportadores y metabolismo de adenosina.
5. Analizar la vía de señalización por la que el fármaco IFC-305 modifica el estado de activación de las CK.

Objetivos Secundarios:

En tiempos más cortos de ensayo (2, 4, 6 y 24 horas) se recolectarán sobrenadantes y se cuantificarán por ELISA citocinas: IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α , INF- γ y sí es factible MCP-1, así como óxido nítrico indirecto por el método de Griess y la actividad de la enzima arginasa.

Técnicas y procedimientos experimentales

Los experimentos se realizaron en cultivos primarios de células de Kupffer, las cuales se obtuvieron con autorización previa para su uso del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular UNAM. Los roedores de esa unidad se mantienen con temperatura y humedad controlada, consumen agua y alimento *ad libitum* y cuentan con el debido control genético y microbiológico periódico. Se emplearon ratas wistar (peso promedio = 300g) intactas por digestión enzimática (pronasa/colagenasa), verificando el número y viabilidad (empleando azul tripano) y su identidad mediante el uso de anticuerpos específicos (CD14/ED-2) para cada cultivo. Una vez obtenido un cultivo con un buen rendimiento ($40\text{-}50 \times 10^6$ células/rata 300g) en comparación con lo reportado en la literatura, se procedió a:

1. Determinar la concentración de IFC-305 y/o LPS para los ensayos *in vitro* mediante curvas dosis-respuesta de las células de Kupffer en cultivo

- a) Caracterización inmunocitoquímica de las células obtenidas (ED2+)
- b) Caracterización por inmunofluorescencia de las células obtenidas. (CD11b+/CD163+)
- c) Estado de activación de las células obtenidas. Fagocitosis de carbón activado.
- d) Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular. Citotoxicidad con SRB a diferentes dosis de IFC-305
- e) Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular. Citotoxicidad con MTT a diferentes dosis de LPS

2. Comparar el efecto que produce la activación M1 inducida con LPS respecto al fenotipo producido por el fármaco IFC-305 (M2) en las células de Kupffer en cultivo.

- a) Citotoxicidad evaluada con LDH con diferentes tratamientos (LPS, LPS-IFC-305, IFC-305)
- b) Evaluación de iNOS por IMH y liberación de NO en sobrenadantes de cultivo

3. Caracterizar si el tipo de activación que produce el IFC-305 en las células de Kupffer en cultivo es M2.

- a) Evaluación de iNOS y arginasa por western blot.
- b) Detección de la actividad enzimática de arginasa in vitro.
- c) Detección de citocinas en sobrenadantes de células de Kupffer

4. Determinar la interacción entre el fármaco IFC-305 y las células de Kupffer a nivel de receptores, transportadores y metabolismo de adenosina

- a) Detección de la actividad enzimática de arginasa in vitro en presencia de teofilina y dipiridamol.
- b) Detección de la actividad enzimática de arginasa in vitro para los diversos tratamientos y en presencia de antagonistas selectivos de los receptores a adenosina:

- (A) DPCPX, A₁ receptor antagonist (100 nM)
- (B) MSX-3, A_{2A} receptor antagonist (10 µM)
- (C) MRS 1754, A_{2B} receptor antagonist (10 µM)
- (D) MRS 1523, A₃ receptor antagonist (10 µM)

5. Analizar la vía de señalización por la que el fármaco IFC-305 modifica el estado de activación de las CK.

Se estudiarán las vías de señalización por las cuales se pueden activar los fenotipos M1/M2 sobre las células de Kupffer aisladas, lo cual es dependiente de las moléculas que sean más dinámicas en el fenómeno producido, sean las mediadas por citocinas o sus receptores o las asociadas a receptores tipo toll: TLR's; mediante los receptores de adenosina acoplados a proteínas G, la vía de las MAPK y el mecanismo más reciente descrito para el fenómeno de activación alternativa M2, vía p38. Así como los efectos sobre factores de transcripción asociados a la polarización M2 como son PPAR-γ y NF-κB.

Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron en cultivos primarios de células de Kupffer aisladas de ratas wistar (300g) intactas por digestión enzimática (pronasa/colagenasa), verificando el número y viabilidad (empleando azul tripano) y su identidad mediante el uso de anticuerpos específicos (CD14/ED-2) para cada cultivo. Después de su cultivo durante 24 h, las células de Kupffer se incubaron con medio DMEM Dulbecco®, que contiene LPS 10µg/mL y / o IFC-305 durante 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h. Se midió la secreción de NO después de la estimulación por lipopolisacárido (LPS) por el método de Griess y la actividad enzimática por espectrofotometría, así como citocinas de sobrenadantes del cultivo por ELISA. Se obtuvieron proteínas y se realizó western blot para CD14, CD163, iNOS, A2bR, 5-LO, PPAR-γ, Arg-1 y β-Actina.

Obtención del cultivo primario de células Kupffer

Se emplearon ratas Wistar macho con un peso de ≤300 g, obtenidos del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular. El manejo de los animales se basó en la guía de manejo de animales del Posgrado de Ciencias en la Producción Animal, Veterinaria, UNAM.

1. Se emplearon 3 ratas macho Wistar de 300-350 g aproximadamente. La anestesia se realiza con pentobarbital sódico (100 mg/kg) vía intraperitoneal.
2. Se realizó la intervención en la que se expone la vena porta y se introduce una cánula (D.I. 1.19 mm, D.E. 1.70 mm, *Becton Dickinson* PE190) en la vena porta para la perfusión del hígado *in situ* con solución salina balanceada de Hank's libre de Ca⁺² y Mg⁺² (CMF-HBSS) a un flujo de 15 mL/min 10 min a 37°C.
3. Mediante una digestión enzimática perfundiendo Pronasa (Roche®) 30 ml al 0.2%, Colagenasa tipo IV (Worthington®) 120 mL al 0.01% en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a 37°C se procesa el hígado.

4. Se extirpa el hígado, se coloca en una cápsula de porcelana junto con 50 mL de Pronasa 0.03% y DNAsa (Roche®) 0.01% en HBSS, el tejido se corta en trozos pequeños.
5. Se incuba durante 30 min a 37°C en agitación constante a 200 rpm.
6. En una malla de nylon se filtra el total de la solución con el tejido digerido.
7. Una vez obtenida la suspensión se centrifuga a 600 rpm durante 7 min a 4°C, se obtiene el sobrenadante (SN) y se conserva en frío, este paso se repite una vez más.
8. Se colectan y combinan los SN para generar un "pool" que se centrifuga a 1700 rpm por 7 min a 4°C, se descarta el SN y se conserva el pellet en hielo. Se combinan los pellets y se llevan a un gradiente de densidad.
9. Se realiza un gradiente discontinuo de Percoll. En tubos falcon® de 15 mL se colocan dos fases de Percoll (Plus GE®) al 50% y 25%, en la última fase se colocan 4 mL de la suspensión celular, se centrifuga a 3000 rpm 15 min (sin freno) a 4°C.
10. Se obtiene la interfase, se centrifuga a 1800 rpm x 10 min a 4°C y se realiza un lavado con buffer fosfato salino (PBS) para eliminar las partículas de Percoll.
11. Se toman 5 µL de la suspensión de células y se colocan en un tubo eppendorf® junto con 195 µL del azul tripano 0.4%. Se mezcla perfectamente y se coloca en la cámara de Neubauer
12. Al microscopio se cuentan las células de los 4 cuadrantes de la cámara y se determina el número de células de acuerdo a la dilución.
13. Mediante el método de adherencia se purifican las CK. Se siembran en placas de 6 pozos 3.5×10^6 células por pozo con medio de cultivo DMEM (Gibco®) 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco®), 0.2% gentamicina (Gibco®) y 10% antibiótico (Gibco®) en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.
14. Se reemplaza el medio de cultivo después de 30 min en donde se remueven las células no-adherentes.

15. Una vez obtenido el cultivo se deja en incubación en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C, durante 24 h.

Adición de Tratamientos *in vitro*

Se retira el medio sobrenadante de cultivo a las 24 horas. Se realizó una curva dosis-respuesta para el fármaco IFC-305, con una concentración que va de [0 a 10 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM y 5 mM]. Por medio de la tinción con SRB se caracterizaron cambios de viabilidad y citotoxicidad de las células.

Una vez determinada la concentración del fármaco IFC-305 a usar, se adicionan los siguientes tratamientos: Control (sin tratamiento), IFC-305 100µM y 5Mm, LPS (Lipopolisacárido de *Escherichia coli*, Sigma Aldrich®) [1µg/mL], control positivo de activación clásica e IFC-305+LPS (al mismo tiempo).

El cultivo se mantiene durante 48 h en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C, se obtienen los sobrenadantes SN y se almacenan a -70°C; se procede con las ensayos que a continuación se describen.

Adición de inhibidores de transportadores y receptores de Adenosina

1. Se retira el medio sobrenadante de cultivo a las 24 horas
2. Se disuelven los inhibidores y/o transportadores conforme a la dilución sugerida en medio DMEM Teofilina [100µM], Dipiridamol [10µM], así como los antagonistas selectivos de los receptores a adenosina:
 - a. DPCPX, A₁ receptor antagonist (100 nM)
 - b. MSX-3, A_{2A} receptor antagonist (10 µM)

- c. MRS 1754, A_{2B} receptor antagonist (10 μM)
 - d. MRS 1523, A₃ receptor antagonist (10 μM)
3. Se pre-incubaban las células en cultivo durante una hora con las diluciones correspondientes y posterior a la incubación se adicionan los tratamientos correspondientes tiempo-concentración.
 4. Se colectan los sobrenadantes y se alicuotan para ser almacenados a -70°C hasta su uso.

Citometría del flujo

Con base a lo descrito en la introducción, aquí consideraremos como células de Kupffer las células viables positivas activadas para el doble marcaje de superficie: CD11b⁺/CD163⁺ (93). Con ese objetivo, las células extraídas de las muestras de tejido hepático fresco. A continuación se determinó el número y viabilidad de células mediante la técnica de azul tripano. Al mismo tiempo se detectó la presencia de CD14 en homogenados totales para correlacionar los resultados con los obtenidos en citometría con el total de macrófagos tisulares (96).

Las tinciones de la superficie celular se realizaron con los ajustes pertinentes de la concentración de cada uno de los siguientes anticuerpos:

Marcador	Fluoróforo	Dilución empleada	Células blanco
CD11b	FITC	1:200	Monocitos/macrófagos
CD163	PE	1:70	Kupffer

Las diluciones de anticuerpo se adicionaron directamente en placas de 96 pozos de fondo en U, en presencia de 1×10^6 células/pozo. Y se incubaron en oscuridad por una hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron en una solución de PBS-albúmina (PBA) y se fijaron con formaldehído al 0.4% cuando su lectura se realizó en un día posterior; cuando la lectura se realizó inmediatamente, las células se resuspendieron directamente en 500 μ L de PBA. El citómetro empleado fue de modelo FACScan de Beckton-Dickinson®, de la Unidad de Citometría de Flujo del Departamento de Inmunología del Instituto de Biomédicas, UNAM.

Detección de Óxido Nítrico

La prueba de Griess es un método el cual permite la cuantificación indirecta de NO a través de sus principales metabolitos, es decir nitritos y nitratos. Se detectó NO en sobrenadantes de las CK espectrofotométricamente.

1. Se realizó una curva estándar de nitrato de potasio (KNO_3), con diluciones seriadas como se 1mM-12 μ M, utilizando como blanco el medio de cultivo de las células DMEM.
2. Se tomaron 500 μ L de SN al cual se agregaron 2 lentes de cadmio activo. Se incubaron por 30 min para la reducción de los nitratos y nitritos.
3. Utilizando 100 μ L del SN reducido, se agregaron 100 μ L de la mezcla de reacción (N,N naftil etilendiamina 0.1% en HCl + sulfanilamida 1% en H_3PO_4 5% , proporciones 1:1).
4. El producto se leyó en un espectrofotómetro de microplacas a 548 nm.

Actividad de la enzima arginasa

La actividad de la arginasa se midió en sobrenadantes del medio de cultivo de las CK a diferentes tiempos 2, 4, 6, 24 y 48h, tal como se describe anteriormente (94).

1. Los sobrenadantes fueron tratados y se diluyeron con tampón de reacción que contenía Tris-HCl a una concentración 25 mM y 5 mM de $MnCl_2$ a pH = 7,4.
2. A continuación, la enzima se activa por calentamiento durante 10 min a 56 ° C.
3. La hidrólisis de arginina se convirtió en incubación en un 1:1 v / v con arginina 0,5 M, pH = 9,7, 37 ° C durante 60 min.
4. La reacción se detuvo con 400µL de la mezcla de ácido (H_2SO_4 , H_3PO_4 y H_2O concentraciones 1: 3: 7 v / v).
5. La urea formada se midió a 540 nm después de la adición de 9% α -isonitrosopropiofenona (disuelto en etanol absoluto) y el calentamiento de 100 ° C durante 45 min.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1µmol urea / min. La absorbancia se leyó empleando un detector o lector de tipo ELISA o en formato de microplacas.

Los resultados de estos experimentos son los valores medios \pm SD de muestras por triplicado y de ensayos independientes.

Detección de citocinas por ELISA

De las células de Kupffer tratadas, se colectaron los sobrenadantes en alícuotas de 100µL que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Se descongelan los sobrenadantes de CK y se procede conforme las hojas técnicas de los kits de MINIELISA Peptotech® para IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1 y RANTES.

Obtención de Proteínas de CK

De las células adherentes se realizó un lavado con PBS y se obtuvo proteína con un rastrillo celular “scraper” y buffer de lisis que contiene TNTE (Tris, NaCl, Tween) e inhibidores de proteasas Complete ® ROCHE. Las muestras se almacenaron a -70°C en alícuotas de 100 µL. Se realizó la cuantificación del contenido de proteínas por el método de Bradford, utilizando el reactivo *Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent* (Biorad®), utilizando como blanco el buffer de lisis, una curva de diluciones seriadas de albúmina y se detectó espectrofotométricamente en un lector a 595 nm.

Evaluación por Western Blot de la expresión de proteínas relacionadas con las CK y su activación

1. Las proteínas obtenidas con TNTE-Complete ® se diluyeron en loading buffer (4x), calentando a 65°C.
2. Se prepararon geles de acrilamida-bis acrilamida al 10-15% para la separación de las proteínas. Se cargaron 40 µg de proteína en cada pozo del gel, así como 7 µL de marcador de peso molecular *Dual color* BioRad®. La electroforesis se realizó con buffer de corrida a 100 V durante aproximadamente 2 h 30 min.
3. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Trans-Blot Transfer Medium*, en una cámara semi-seca Biorad®, utilizando buffer de transferencia con metanol a 100 V durante 1 h.
4. Las membranas se bloquearon con albúmina o leche al 5% en TBS-Tween en agitación constante durante toda la noche (ON = overnight) a 4°C. La **Tabla 1** a continuación describe las condiciones de incubación y los anticuerpos usados, donde TA indica Temperatura Ambiente.

Anticuerpo 1°	Dilución	Incubación	Anticuerpo 2°	Dilución	Incubación
NOS2 (iNOS)					
Santa Cruz Biotechnology®	1:500	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-conejo	1:5000	Albúmina 3%, TA 2h
P22		Leche 5% ON 4°C	Anti-ratón	1:10000	Leche 5% TA 2h
Arg I	1:2000	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-conejo	1:5000	Albúmina 3%, TA 2h
5-LO	1:200	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-conejo	1:5000	Albúmina 3%, TA 2h
CD163	1:1000	Leche 5% ON 4°C	Anti-ratón	1:5000	Leche 5% TA 2h
SOCS3	1:500	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-ratón		Albúmina 3%, TA 2h
STAT3	1:500	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-ratón	1:10000	Albúmina 3%, TA 2h
CD14	1:300	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-conejo	1:10000	Albúmina 3%, TA 2h
PPARγ	1:1000	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-conejo	1:5000	Albúmina 3%, TA 2h
A2aR	1:250	Albúmina 3% ON 4°C	Anti-ratón	1:10000	Albúmina 3%, TA 2h

Tabla 1. Anticuerpos y condiciones de incubación para Western blot de proteínas de CK

Una vez terminadas las incubaciones se revelaron las membranas con el sustrato *West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, SuperSignal®, en película fotográfica Kodak®. Y se fotodocumentaron mediante el programa Quantity One® de BioRad.

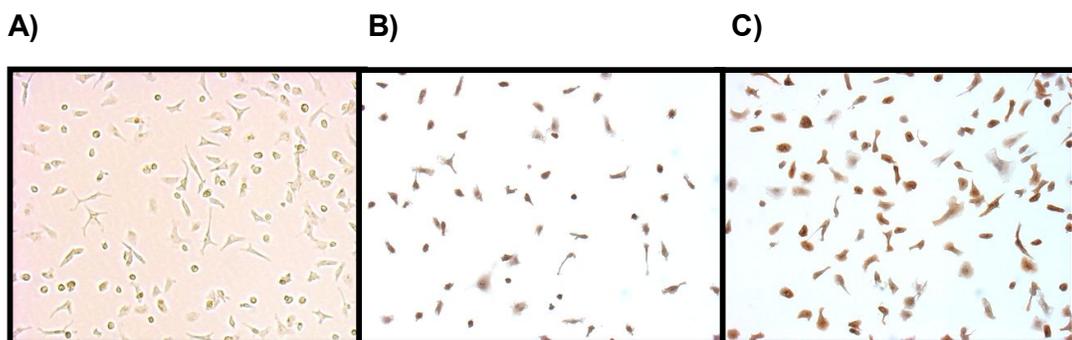
Resultados

Identificación de la Población de células de Kupffer extraídas de hígado de rata

Las células de Kupffer expresan una proteína de superficie ED-2, también denominada M130 de 130kDa. El anticuerpo ED-2 reacciona con dicho antígeno membranal que se localiza en los macrófagos residentes de tejido en rata. Esta proteína, tipo receptor scavenger, dependiente de calcio, puede estar regulada por cascadas de señalización y pertenece a las denominadas de fase aguda. Como receptor tiene la capacidad de unir hemoglobina mediando la endocitosis de complejos hemoglobina-haptoglobina (93).

Sé identificó la población de KC mediante el ensayo de inmunocitoquímica, utilizando el anticuerpo ED-2 (santa cruz Biotechnology®) [1:500]. Empleando el kit *EnVision™ + System, HRP (DAB)*, Dako®, una vez obtenido un cultivo con un buen rendimiento (40-50x10⁶ células/rata 300g) de células adherentes.

Los monocitos, las células dendríticas, los granulocitos peritoneales y otras células son negativas para este marcaje. Por lo tanto ED-2 discrimina entre los macrófagos tisulares (ED-2 (+)) de los medulares (ED-2 (-)), lo que permite ser ideal en el uso de la detección de las células de Kupffer de hígado. A continuación la **figura 8** muestra la detección inmunocitoquímica de este receptor ED-2.



D)

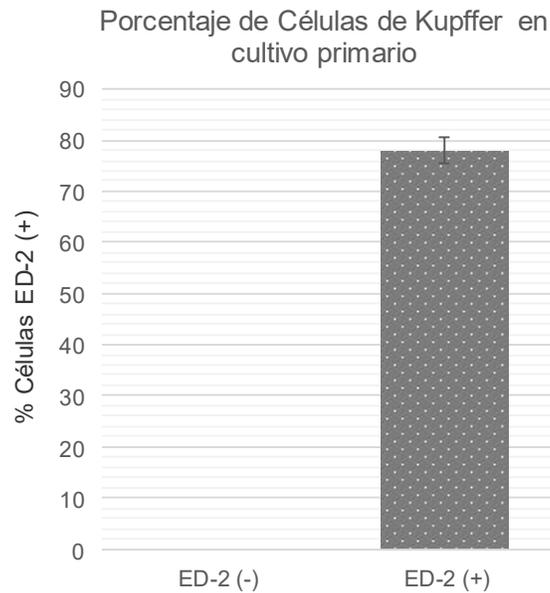


Figura 8. Células de Kupffer en cultivo primario (20X). A) Control sin tinción en campo claro / negativo a tratamientos; B) Hematoxilina; C) Hematoxilina / ED-2 (1:500) D. Cuantificación células ED-2 (+). Células NPC obtenidas de cultivo primario de ratas Wistar, identificadas por inmunocitoquímica del Anticuerpo ED-2 Santa Cruz® (revelado DAB, color marrón). Se muestra una imagen representativa del cultivo, así como la gráfica de cuantificación para la presencia del marcador ED-2 (+) para la identificación de macrófagos tisulares.

Podemos observar que el cultivo es positivo para ED-2, anticuerpo que reconoce a las células de Kupffer (**figura 8**), y que dicho reconocimiento correlaciona con la cantidad de anticuerpo presente en la inmunocitoquímica revelada con DAB y con un alto porcentaje del total de la células sembradas ($78 \pm 2.64\%$).

Estado de activación de las células obtenidas identificadas como CK

Los macrófagos permanecen en los tejidos durante semanas o meses. Sus precursores son los monocitos de la médula ósea. Aquellos que circulan en el organismo y los

macrófagos fijos del hígado, bazo, tejidos linfáticos presentan fagocitosis. El "estallido respiratorio" es una serie de eventos coordinados que incluyen aumento del consumo de oxígeno, aumento de la actividad de la vía de las hexosas monofosfato y aumento de la producción de diversas sustancias con propiedades antimicrobianas que derivan del metabolismo del oxígeno como por ejemplo el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido. La fagocitosis o la unión de IgG C5a o C3b están asociadas a un marcado aumento del metabolismo del oxígeno. Esto inicia el "estallido respiratorio" y el transporte de electrones al oxígeno disuelto y la formación de anión superóxido (O_2^-). Este anión es inestable y puede espontáneamente producir peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo o radicales orgánicos libres, todos ellos son oxidantes y poderosos agentes microbicidas. Sin embargo sí la célula huésped, que tienen mecanismos para defenderse por sí mismas como la superóxido dismutasa y la catalasa no logra superar las altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, se desintegra.

Con el fin de verificar que tras el aislamiento las células no hayan perdido su capacidad fagocítica y como método de identificación de un estadio clásico de activación o tipo M1, se realizó un ensayo con carbono coloidal (**Figura 9**).

Dicha técnica se ha reportado como método de identificación en la literatura (95).

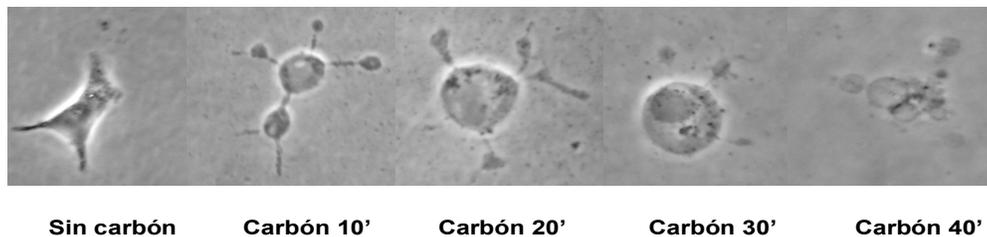


Figura 9. Estado de activación CK (100 X). Micrografías de células de Kupffer donde se muestra la fagocitosis de carbono coloidal a diferentes tiempos de incubación, desde los 10 a 40 minutos, hasta el estallido respiratorio.

Viabilidad de las células extraídas y dosis de activación con LPS e IFC-305.

Para el primer objetivo planteado, el cual es la realización de una curva dosis-respuesta de IFC-305 y LPS. Para ambos tratamientos se detectaron de los cambios en la viabilidad celular mediante el ensayo de SRB (sulforrodamina B). Dicho ensayo correlaciona una absorbancia con el porcentaje de sobrevivencia de las células tomando en cuenta un control de la cantidad de células sin estar sometidas a tratamiento. Se detecta mediante la presencia de color fucsia en los platos de cultivos, por el intercalado de la SRB con las proteínas de células vivas, el color se ve modificado conforme hay pérdida en la permeabilidad de la membrana celular, producto de mecanismo de muerte de las células.

En los ensayos con la molécula experimental IFC-305 (aspartato de adenosina) se utilizaron como referencias dosis de adenosina que se encuentran reportadas y que ejercen un efecto sobre las células mononucleares en pacientes cirróticos y son las siguientes: 100 μ M, 500 μ M y 1000 μ M; adicionalmente se consideró la dosis que mostró efectos en la inactivación de células estelares en cultivo (92) 5mM, las diluciones se realizaron en el medio de cultivo DMEM, ajustando el pH a 7.4 (**Figura 10**) e incubándose a 37°C, 5% de CO₂ por 48 horas.

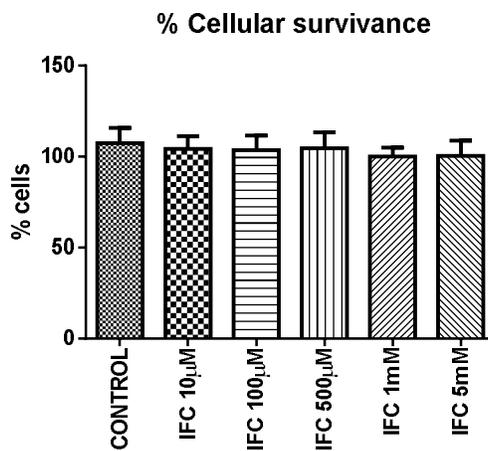


Figura 10. Efecto del IFC-305 sobre la viabilidad de células de Kupffer en cultivo.

Se muestran el porcentaje de células viables determinadas con SRB en los cultivos primarios de CK, que se incubaron durante 48 horas con la molécula IFC-305 a cinco concentraciones diferentes (10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1mM y 5mM) en ensayos independientes; n = 3, 48horas; ANOVA p = 0.5943

En el caso del LPS múltiples fuentes en la literatura utilizan una concentración de 10mg/mL o menor, por lo que se decidió utilizarla para los ensayos y comparar el efecto sobre la viabilidad de una dosis mayor 20mg/mL (**Figura 11**), a la cual las CK no sobreviven.

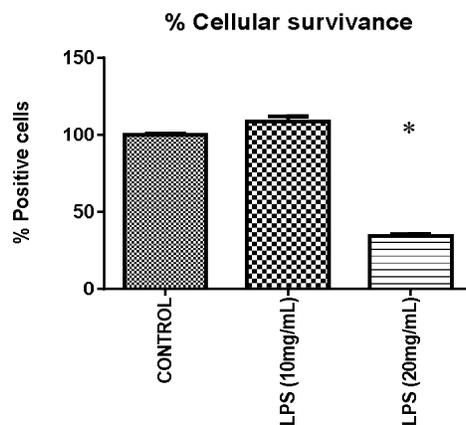


Figura 11. Efecto del LPS sobre la viabilidad celular de células de Kupffer en cultivo. Se muestran el porcentaje de células viables determinadas con SRB en los cultivos primarios de CK, que se incubaron durante 48 horas con LPS a dos concentraciones diferentes (10 y 20 mg/mL) en ensayos independientes; n = 3, 48horas; ANOVA *p < 0.0001

Para el caso de la molécula IFC-305 se eligieron las concentraciones 100 μ M y 5mM, dicha elección se realizó tomando en cuenta que a estas concentraciones no se modificara la cantidad o viabilidad celular y que el efecto observado corresponde exclusivamente a un estadio de activación. Lo cual se corroboró por dos métodos SRB y

LDH (**Figura 12**). LDH es un método que permite la identificación de células con actividad enzimática que cataliza la reducción del piruvato por NADH, obteniéndose lactato mediante la presencia de la lactato deshidrogenasa; esto permite identificar las células que se encuentran en una fase de muerte celular, ya que el aumento de dicha actividad enzimática es un reflejo de la pérdida de la viabilidad normal de una célula en cultivo, que produce una elevada cantidad de lactato.

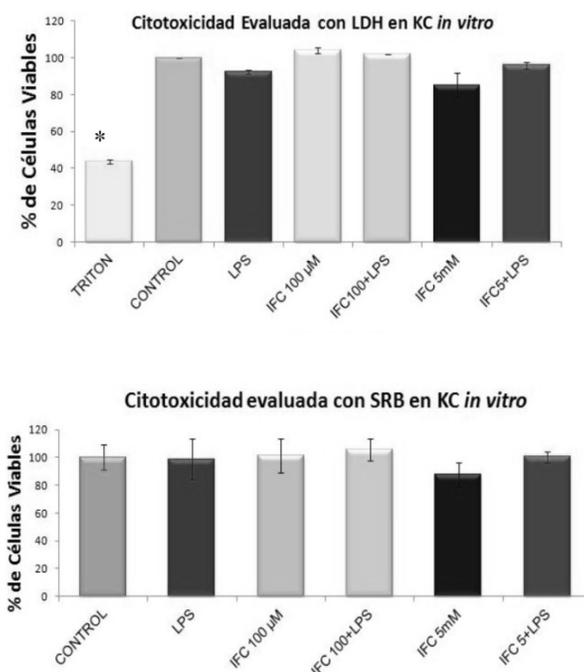


Figura 12. Efecto del LPS y el IFC-305 sobre la viabilidad celular de las células de Kupffer. Se evaluaron los efectos del LPS y el IFC-305, así como la adición de ambos al cultivo al mismo tiempo, por dos métodos A) LDH actividad de lactato deshidrogenasa y B) SRB sulforrodamina B, en cultivos de KC tratados por 48h, n =3; sin diferencias en los valores de viabilidad o citotoxicidad.

Para comparar el efecto que produce la activación M1 inducida con LPS respecto al fenotipo producido por el fármaco IFC-305 en las células de Kupffer en cultivo M2, se empleó citometría de flujo (**Figura 13**), con el fin de cuantificar la expresión de receptores de superficie en las células de Kupffer que se asociarán a la activación

inducida por el LPS o por el IFC-305, se realizó un ensayo de citometría de flujo para células dobles positivas (CD11B-FITC / CD163-PE) tratadas durante 48 horas.

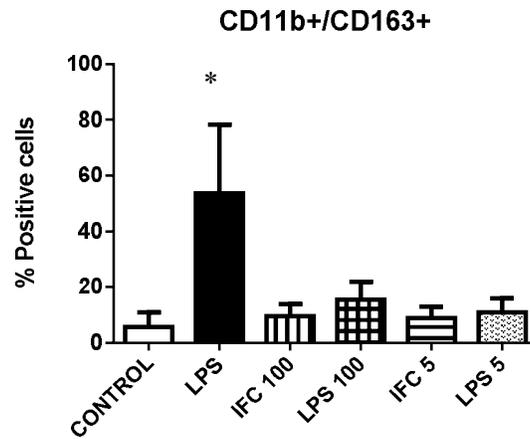


Figura 13. Efecto del LPS y el IFC-305 sobre el porcentaje de células de Kupffer.

La figura muestra el porcentaje de células dobles positivas para los marcadores de superficie % (CD11b + / CD163 +) \pm SD; ANOVA *p = 0.0003, n = 3. Ensayos con fechas independientes. Incubación por 48horas.

Este resultado indica que las concentraciones empleadas en los ensayos están modificando los marcadores de superficie, de manera independiente al porcentaje de células viables, indicando con ello que el efecto del LPS y el IFC-305 radica en los mecanismos de activación intracelulares, el LPS induce mayormente la expresión de CD163.

Como parte de la caracterización del efecto del IFC-305, a través de la polarización de las células de Kupffer, de las células de Kupffer tratadas en cultivo con LPS e IFC-305 se tomó el sobrenadante a diferentes tiempos de cultivo, se extrajo proteína total para determinar la expresión de diversas proteínas por western blot, así como la caracterización por inmunocitoquímica de proteínas esenciales en la activación de las células de Kupffer, como la óxido nítrico sintasa inducible y la arginasa.

Cinética de secreción de citocinas de CK en cultivo tratadas con LPS e IFC-305

La dinámica de las citocinas, las cuáles son moléculas que orquestan de manera regulada las respuestas inflamatorias y antiinflamatorias, es un reflejo de la activación del microambiente celular, lo mismo ocurre, cuando las citocinas son liberadas al medio de cultivo de células que se encuentran en un ensayo *in vivo*; como en el presente estudio, se trataron CK con LPS e IFC-305, se recolectaron los sobrenadantes a diferentes tiempos de incubación.

De los sobrenadantes se determinó por ELISA, la presencia de las citocinas secretadas por las CK a los medios de cultivo, lo anterior se muestra en las siguientes gráficas, en donde se presenta la detección de citocinas de células de Kupffer aisladas y tratadas por 2, 4, 6 horas (**Figura 14**). Posteriormente se analizaron los sobrenadantes de las células incubadas a las 24 y 48 horas con LPS y el compuesto IFC-305 (**Figura 15 y 16**).

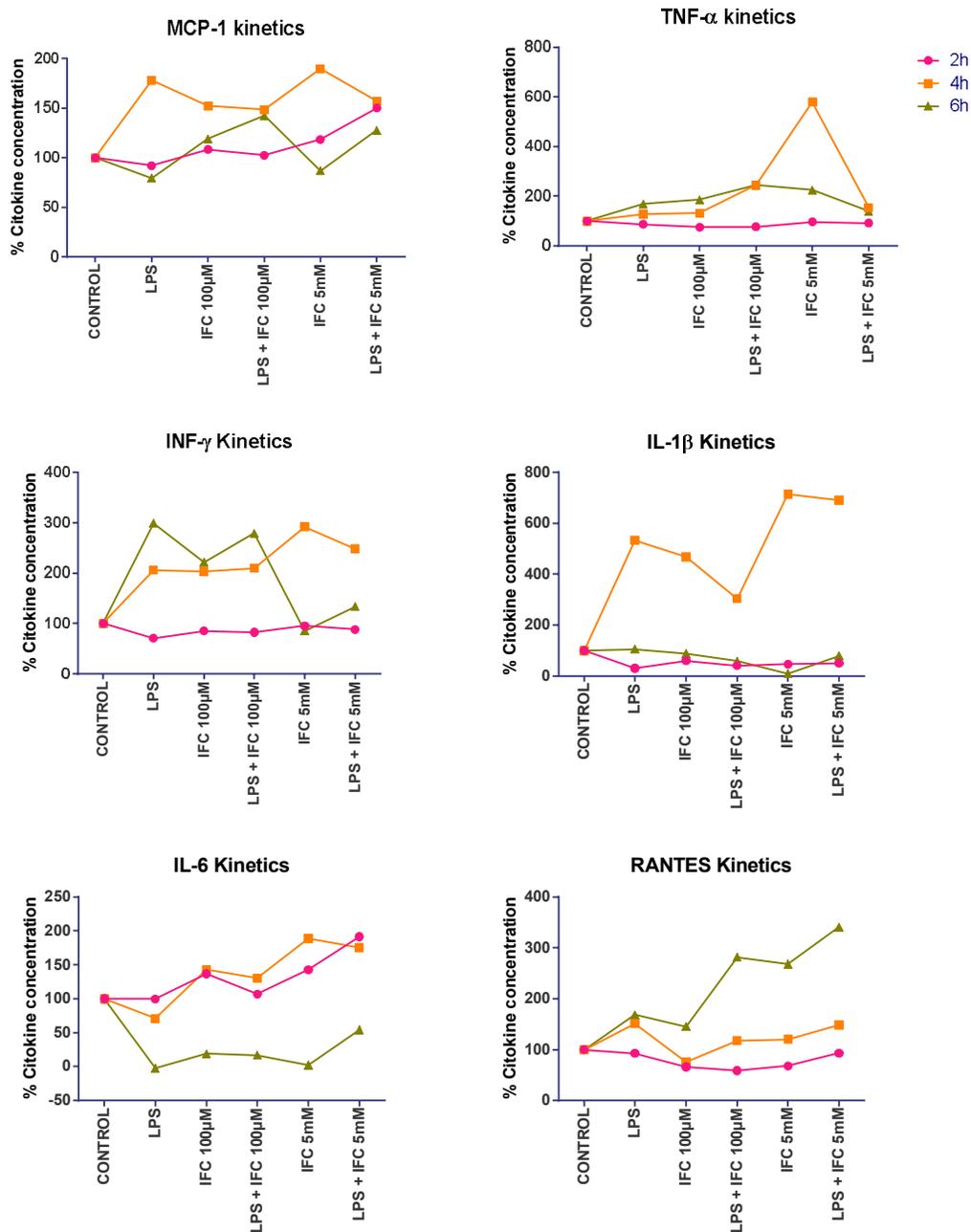


Figura 14. Cinética de las citocinas secretadas por las células de Kupffer en cultivo a las 2, 4 y 6 horas tratadas con LPS e IFC-305. Se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones porcentuales de las citocinas secretadas al medio: MCP-1, TNF-α, INF-γ, IL-1β, IL-6 y RANTES, de las CK en cultivo tratadas con IFC-305 Y LPS, Incubación por 2, 4 y 6 horas. Dos ensayos independientes.

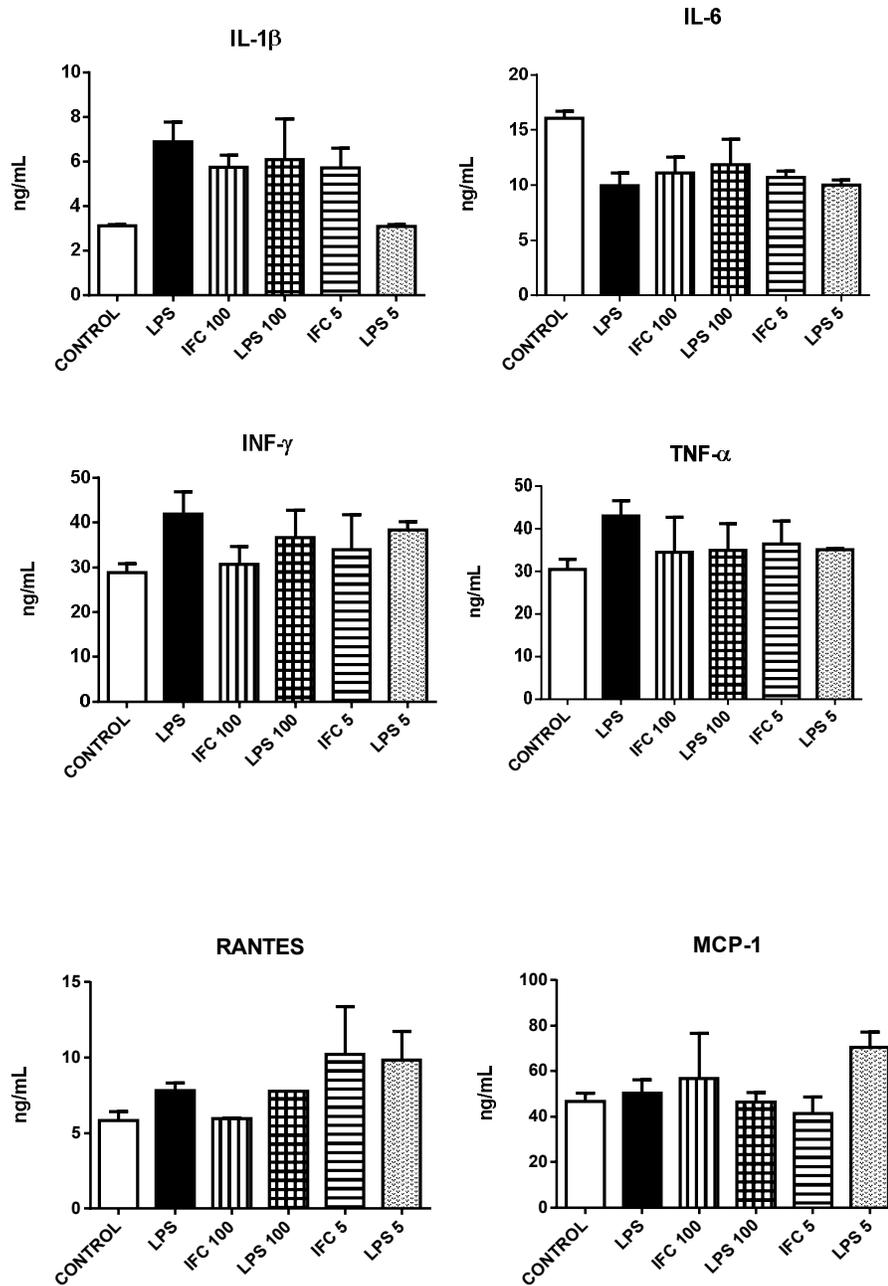


Figura 15. Efecto del LPS y el IFC-305 en las citocinas liberadas de las células de Kupffer en cultivo a las 48 horas. Se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones porcentuales de las citocinas secretadas al medio: MCP-1, TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-6 y RANTES, de las CK en cultivo tratadas con IFC-305 Y LPS, Incubación por 24 horas. Concentraciones expresadas en ng/mL; n = 3.

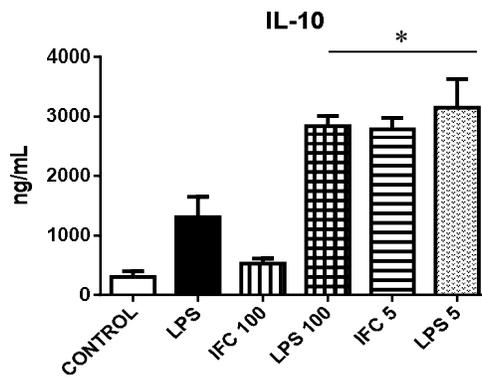
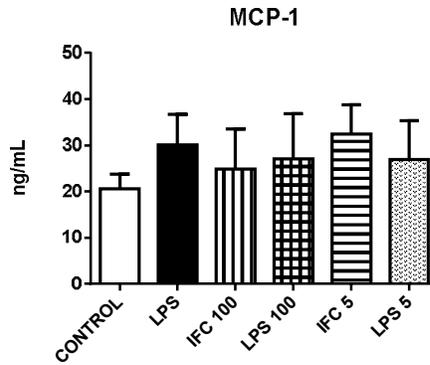
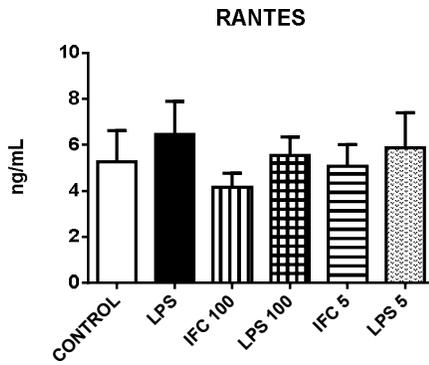
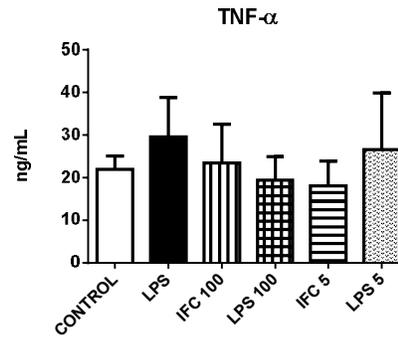
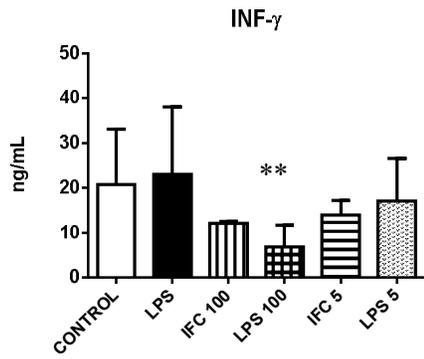
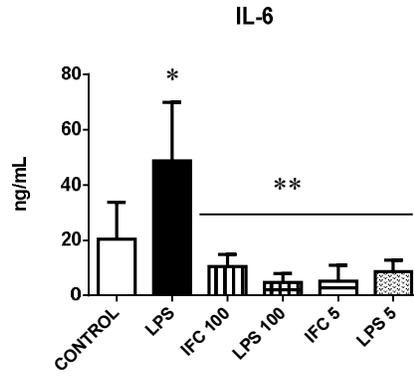
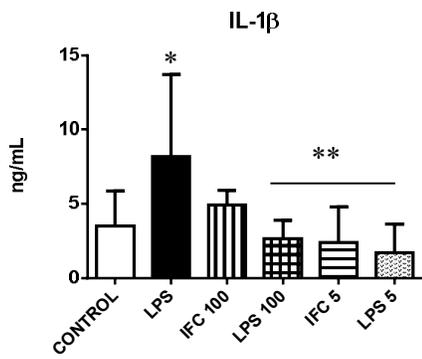


Figura 16. Efecto del LPS y el IFC-305 en las citocinas liberadas de las células de Kupffer en cultivo a las 48 horas. Se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones porcentuales de las citocinas secretadas al medio: MCP-1, TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 y RANTES, de las CK en cultivo tratadas con IFC-305 Y LPS, concentraciones expresadas en ng/mL, *p = 0.05 respecto a control ** p = 0.05 respecto a LPS; n \geq 6. Ensayos con fechas independientes.

Las citocinas secretadas al medio, son el reflejo del estado de activación, en el caso de MCP-1, TNF- α , INF- γ , IL-1 β como parte del proceso inflamatorio de las CK activadas como M1, fenómeno inducido por el LPS; en el caso de IL-6, IL-10 y RANTES, los efectos son diferentes, de acuerdo a lo inducido por la molécula IFC-305, el cual produce una activación potencialmente de tipo M2, sugiriendo que la modulación de las citocinas inflamatorias, puede estar mediada por la citocina reguladora IL-10 en células de Kupffer tratadas con IFC-305.

Efecto del IFC-305 y el LPS sobre la actividad de arginasa y la iNOS

Recordaremos que respecto a la actividad metabólica de la célula, dos enzimas son relevantes en los mecanismos de activación, por un lado la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la enzima generadora de NO para M1 y la arginasa tipo 1, la enzima que utiliza el sustrato arginina de la iNOS para la síntesis de urea para el fenotipo de activación alternativa y otros marcadores de M2.

Como resultado el NO total liberado al medio puede tener origen desde dos enzimas, la iNOS o eNOS, por lo que se buscó la relación que existe con la expresión de iNOS por inmunocitoquímica directamente sobre las células de Kupffer en cultivo con distintos tratamientos (**Figura 17 y 18**).

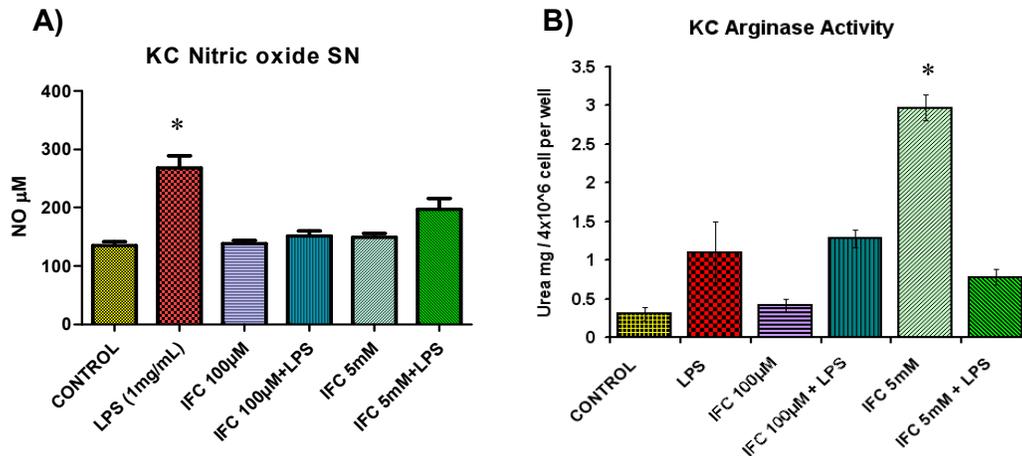


Figura 17. Efecto del LPS y el IFC-305 de la actividad de iNOS y arginasa de las células de Kupffer en cultivo. La figura A) presenta la cuantificación de la concentración de los nitratos y nitritos, método indirecto para determinar NO en los sobrenadantes de células en cultivo tratadas con LPS e IFC-305. La figura B) corresponde a la determinación de urea, como producto de la actividad de arginasa, la cual se cuantifica por un producto colorido derivado de alfa-isonitropropiofenona. Todos los cultivos son ensayos con fechas independientes. Incubación por 48 horas; n = 3; *p = 0.05.

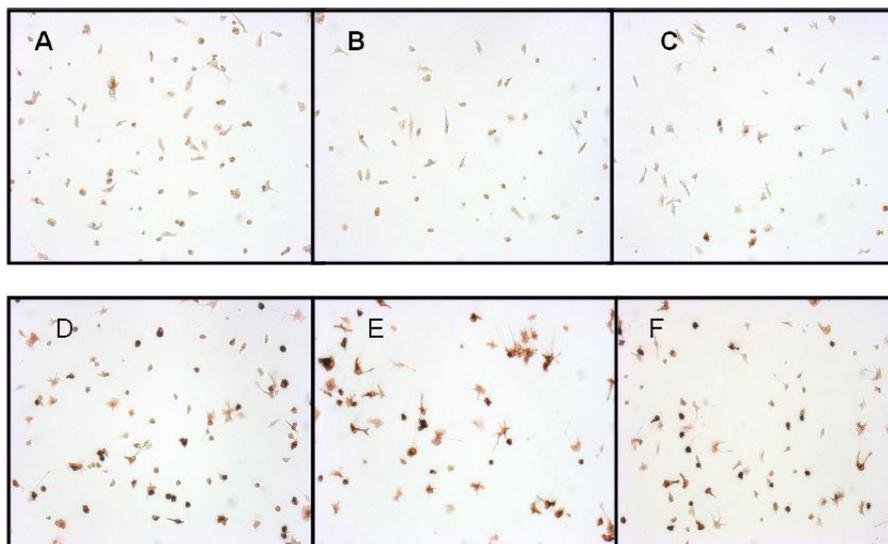


Figura 18. Efecto del LPS y el IFC-305 sobre la expresión de iNOS y la liberación de NO de las células de Kupffer en cultivo. La figura muestra imágenes representativas de la inmunocitoquímica de iNOS de las CK en cultivo, tratadas de la siguiente manera: A) Control; B) IFC-305 100µM; C) IFC-305 5mM; D) LPS; E) LPS + IFC-305 100µM; F) LPS + IFC-305 5mM; Incubación por 48horas. El color marrón corresponde a una marca positiva para la enzima, relevada por DAB.

Detección de la actividad enzimática de arginasa *in vitro* para los diversos tratamientos y en presencia de teofilina, dipiridamol y antagonistas de los receptores de adenosina.

Uno de los principales marcadores que se han reportado para el estadio de activación alternativo en macrófagos M2, es la presencia de la enzima arginasa. Para determinar si dicha enzima era activada por el tratamiento con IFC-305 y su núcleo molecular de adenosina y cuál era el mecanismo de activación M2 específico, ya sea mediante una regulación de la unión a receptores, bloqueando los 4 receptores A1,A2a, A2b y A3 al mismo tiempo, con un antagonista denominado teofilina o vía transportadores de adenosina, mediante el uso de un agente bloqueador de canales: dipiridamol, se realizaron ensayos enzimáticos para la actividad de arginasa a las 24 y 48 horas, empleando el método descrito previamente.

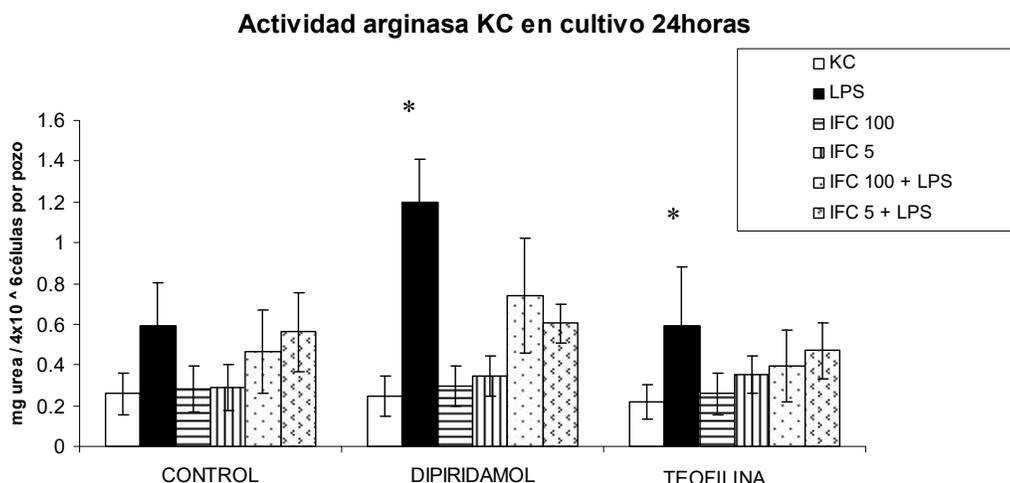


Figura 19. Efecto del LPS e IFC-305 mediado por receptores o transportadores de adenosina en células de Kupffer a las 24 horas de cultivo. Las células fueron tratadas en presencia de dipiridamol y teofilina con una pre-incubación de 30mins; posterior a ello se adicionaron los tratamientos con las concentraciones establecidas previamente para LPS e IFC-305, se tomó el sobrenadante y se analizó el efecto del bloqueo sobre la actividad enzimática de arginasa, durante tratamientos a 24horas. Dos ensayos independientes, $n = 4 \pm$ E.S. * $p < 0.05$ respecto al Control.

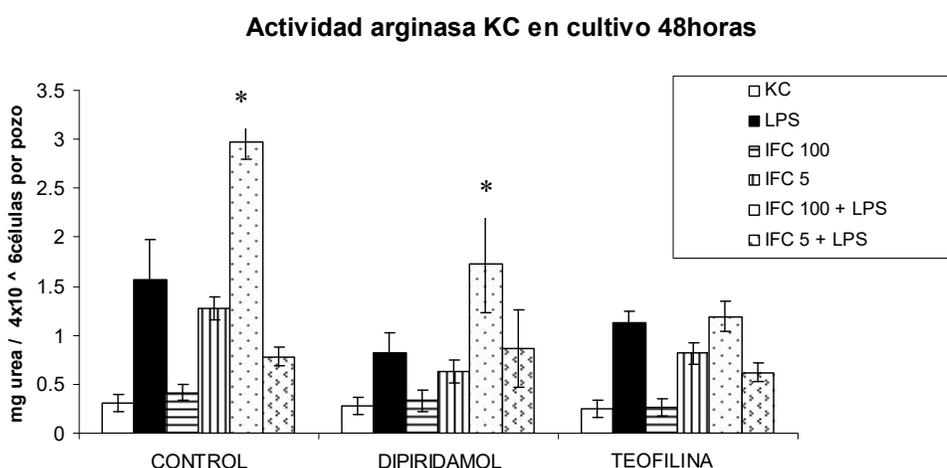


Figura 20. Efecto del LPS e IFC-305 mediado por receptores o transportadores de adenosina en células de Kupffer a las 48 horas de cultivo. Las células fueron tratadas en presencia de dipiridamol y teofilina con una pre-incubación de 30mins; posterior a ello se adicionaron los tratamientos con las concentraciones establecidas previamente para LPS e IFC-305, se tomó el sobrenadante y se analizó el efecto del bloqueo sobre la actividad enzimática de arginasa, durante tratamientos a 48horas. Tres ensayos independientes, $n = 9 \pm$ E.S. * $p < 0.05$ respecto al Control.

Cómo podemos observar, los resultados para la actividad enzimática de arginasa *in vitro* sobre las células en cultivo muestran que el LPS es capaz de activar a la enzima a las 24 y 48 horas de ensayo, como parte de una respuesta secundaria a la activación M1 inicial que ocurre rápidamente en las células, en cuestión de pocas horas. Sin embargo

el efecto de la administración de LPS en conjunto con IFC-305 (100 μ M) potencia la actividad de la enzima aún más, tal y como podemos observar a las 48 horas (**figura 20**), lo que apoya la hipótesis que se tiene de que el fármaco es capaz de polarizar los macrófagos a un fenotipo M2 en fenómenos crónicos o a tiempo largos, activando la enzima arginasa pero no de manera inmediata, sino como parte de una respuesta de resolución de la inflamación o reparación tisular. En el caso de 24 horas será necesario realizar un ensayo más, para disminuir los niveles de desviación y obtener un grado mayor de significancia en los resultados, ya que hasta el momento se observa una tendencia, que no resulta significativa.

El mecanismo mediante el cual se da la activación de tipo M2, tiene un aporte mayor por la regulación vía receptores, lo que se relaciona con lo reportado referente al receptor A2b como uno de los principales mediadores de la activación alternativa en macrófagos y que se discutirá posteriormente.

A partir de los experimentos anteriores y con la finalidad de explorar aún más en el mecanismo que ejerce el IFC-305 sobre las CK tratadas con LPS, se sugirió que debía estudiarse cuál receptor pudiera mediar la activación alternativa que se presenta en las CK a las 48 horas. En este tiempo de cultivo, hay actividad enzimática de arginasa elevada y sostenida y una disminución de citocinas inflamatorias, IL-1 β principalmente. Por lo anterior, la detección de la actividad enzimática de arginasa *in vitro* se utilizó para los diversos tratamientos y en presencia de antagonistas selectivos de los receptores a adenosina como marcador de activación alternativa por IFC-305.

Se cultivaron las células en presencia de 4 antagonistas de receptores a adenosina:

- (A) DPCPX, A₁ receptor antagonist (100 nM)
- (B) MSX-3, A_{2A} receptor antagonist (10 μ M)
- (C) MRS 1754, A_{2B} receptor antagonist (10 μ M)
- (D) MRS 1523, A₃ receptor antagonist (10 μ M)

La literatura sugiere el empleo de concentraciones entre 1-10 μ M en otras estirpes celulares hepáticas, sin embargo no existen reportes con células de Kupffer, por las concentraciones que se emplean de IFC-305 (100 μ M y 5mM) se eligió la mayor concentración y se realizaron ensayos adicionales para ajustar el método en el uso de estos antagonistas.

Recordando que la actividad de arginasa es distintiva del fenotipo alternativo M2 y converge con el producido por el IFC-305, se realizaron ensayos enzimáticos para la actividad de arginasa, empleando el método descrito previamente y se obtuvo la siguiente **Figura 21**:

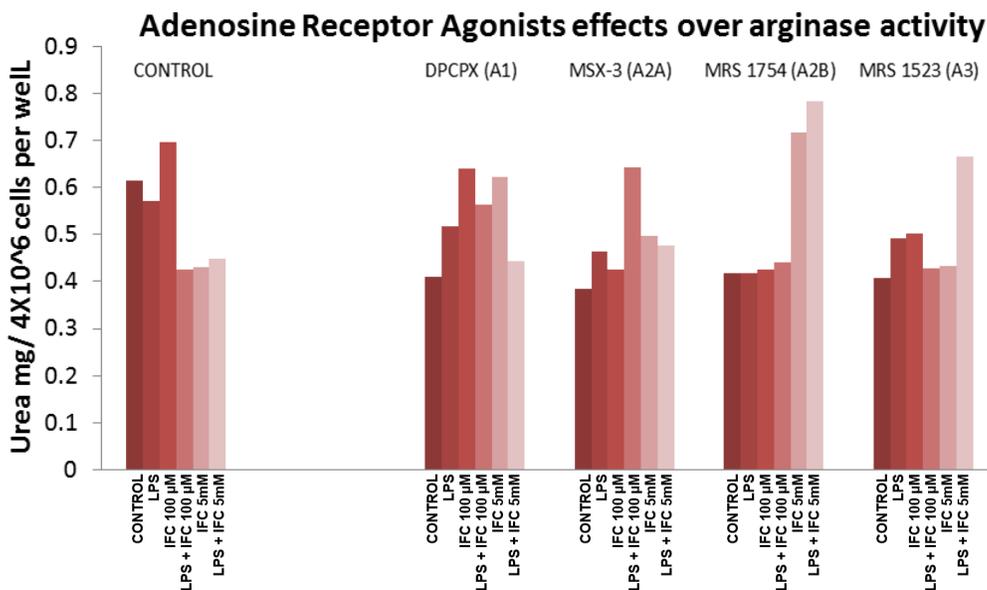


Figura 21. Efecto de los antagonistas a receptores de adenosina, con LPS y el IFC-305 sobre la actividad de arginasa I. Se realizó una pre-incubación por 1h con DPCPX, A1 receptor antagonist (100 nM); MSX-3, A2A receptor antagonist (10 μ M); MRS 1754, A2B receptor antagonist (10 μ M); MRS 1523, A3 receptor antagonist (10 μ M). Después del bloqueo se adicionaron los tratamientos correspondientes para determinar la actividad de arginasa. n = 2; ANOVA p = 0.85.

Empleando antagonistas específicos de los 4 receptores se observaron cambios a nivel de actividad arginasa I. Lo que podemos observar en esta figura es que la actividad arginasa se ve modificada en presencia de los 4 antagonistas: DPCPX, A1 receptor antagonist (100 nM), MSX-3, A2A receptor antagonist (10 μ M), MRS 1754, A2B receptor antagonist (10 μ M), MRS 1523, A3 receptor antagonist (10 μ M). Lo que es relevante es indicar que a concentraciones mayores el efecto se abate para los receptores A2A y A2B, lo que no ocurre con el antagonista de A1 a concentraciones 5mM, sugiriendo que a estas concentraciones estos receptores no juegan un papel relevante en el mecanismo de acción del IFC-305, proponiendo la participación de los transportadores de adenosina. Será necesario en un futuro realizar más ensayos con la intención de evidenciar algún efecto estadísticamente significativo.

Mecanismos de señalización del IFC-305 en CK activadas en cultivo.

Para el análisis de la vía que está mediando la activación de los hacia el fenotipo M2 por efecto del IFC-305 y así determinar si la célula de Kupffer está modificando su estado activado a diversos niveles, se sugirió analizar por western blot la expresión de proteínas relacionadas con los dos estados de activación: para la activación clásica M1: CD163, iNOS, STAT3 y p22; para la activación alternativa M2: 5-LO, PPAR- γ , A2a, Arg1 y SOCS3. Se incluyen los datos de WB los *films* y el patrón de expresión de múltiples proteínas relacionadas con los efectos *in vitro* producidos por el IFC-305 sobre las células de Kupffer en cultivo (**Figura 22**).

A continuación se observan los *films* (o fotografías de las radiografías por quimioluminiscencia) representativos para cada proteína, distribuidos por su peso molecular.

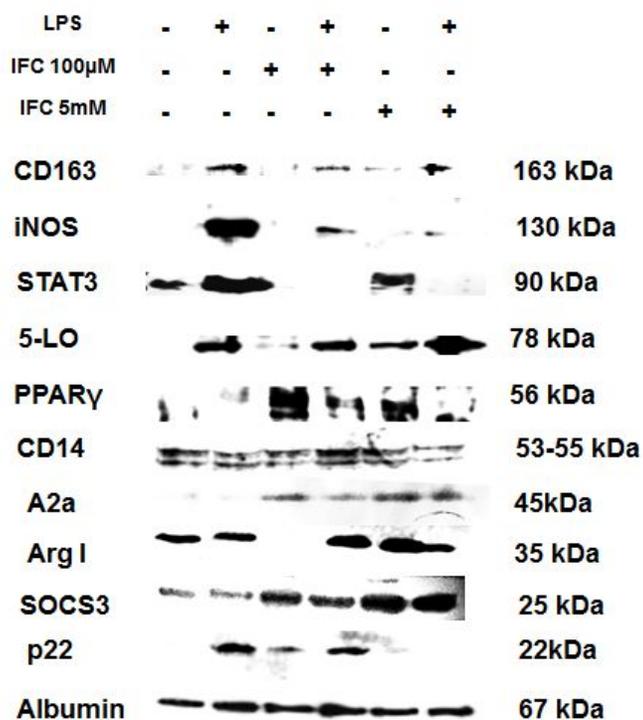


Figura 22. Efecto de LPS y el IFC-305 sobre la expresión de diversas proteínas. Se muestra la imagen fotodocumentada de los films representativos de la presencia de proteínas del western-blot para la activación clásica M1: CD163, iNOS, STAT3 y p22; para la activación alternativa M2: 5-LO, PPAR-γ, A2a, Arg1 y SOCS3. Se empleó en todos los casos albúmina como control de carga. B) Las gráficas muestran la cuantificación de la densidad de bandas en cada caso, para las proteínas determinadas

De diversos ensayos repetidos, se realizó la cuantificación de las densitometrías de las bandas para los *films* correspondientes empleando el programa Quantity One® de BioRad, reportando el valor de volumen que corresponde a la intensidad de la banda*mm². Los datos se normalizaron respecto al control (albúmina para todos los casos) y se obtuvieron las gráficas de la expresión de proteínas para M1: CD163, iNOS, STAT3 y p22; para la activación alternativa M2: 5-LO, PPAR-γ, A2a, Arg1 y SOCS3; como parte de la elucidación del mecanismo de acción del fármaco IFC-305 sobre la activación M1/M2, así como el control de carga para todos los casos.

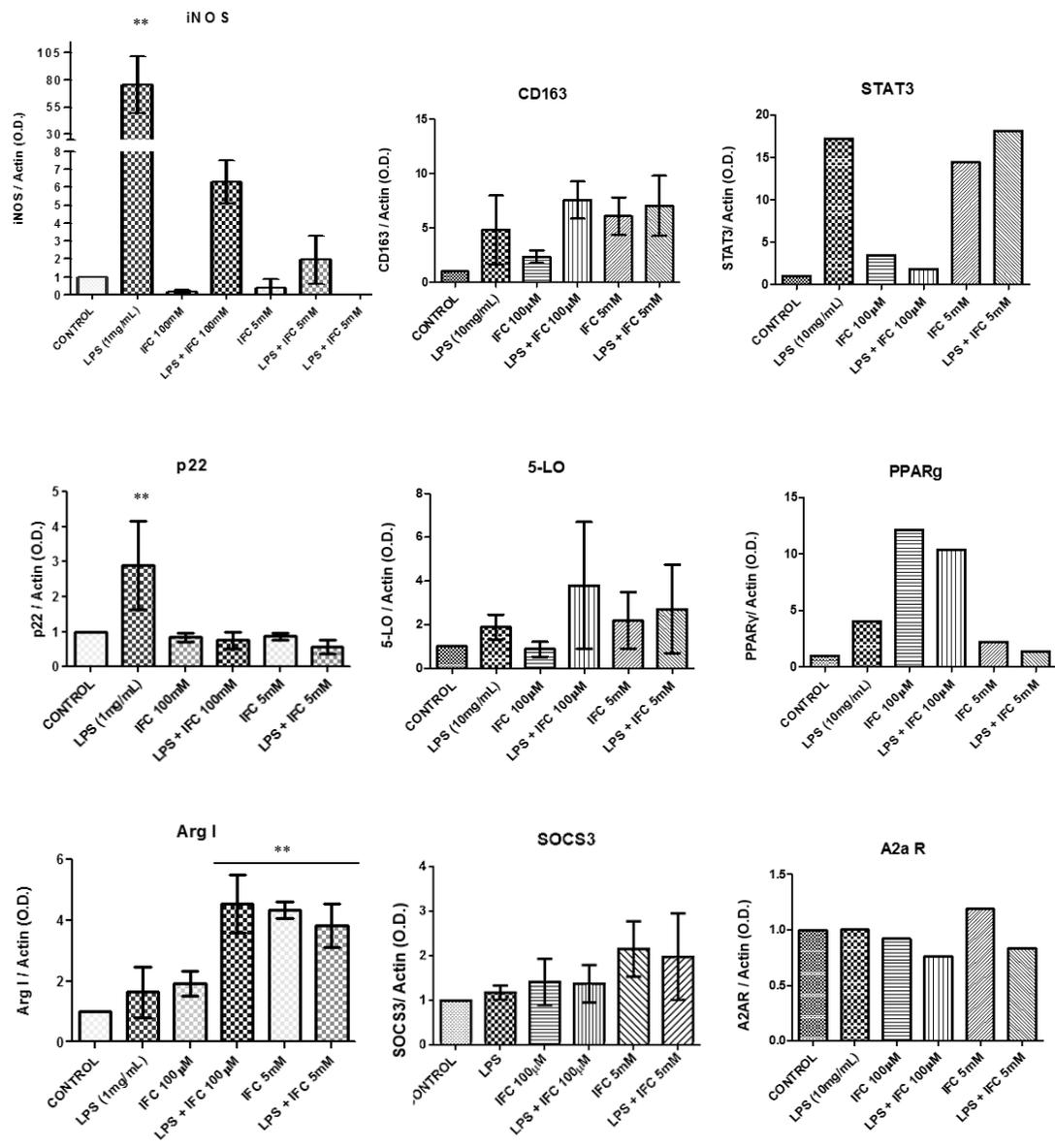


Figura 23. Efecto de LPS y el IFC-305 sobre la expresión de diversas proteínas. Se muestran las gráficas de la densidad de banda en cada imagen fotodocumentada de los films representativos de la presencia de proteínas del western blot para la activación clásica M1: iNOS, CD163, STAT3 y p22; para la activación alternativa M2: 5-LO, PPAR- γ , Arg1 y SOCS3 y A2a, Se empleó en todos los casos albúmina como control de carga, $n \leq 3$ y se graficó la O.D. \pm D.E. (Optical density o densidad óptica de la intensidad de la banda*mm²) ** $p < 0.05$.

Discusión

Los macrófagos son células de la respuesta inmune innata, que cumplen principalmente con proteger al organismo de diversos agentes exógenos que podrían resultar patológicos. Se ha descrito una heterogeneidad fenotípica en el macrófago dependiendo del grado de diferenciación, distribución tisular y respuesta a estímulos endógenos y exógenos (98). Los macrófagos tienen capacidad para modificar su perfil funcional en respuesta a una variedad de estímulos y polarizarse en distintos fenotipos. Recientemente, haciendo referencia a la dicotomía de linfocitos T colaboradores 1 y 2 (en inglés, T helper cells 1/2, Th1/Th2), se han propuesto dos subtipos de macrófagos según sean activados por la vía clásica (M1) o por la vía alternativa (M2) (97). Estos diferentes estados de polarización van a depender del microambiente y del daño que se haya producido e incluso presentarse combinados en una población particular. La activación clásica es fundamental para el inicio y mantenimiento del proceso inflamatorio, así como para la respuesta frente a patógenos y la respuesta inmune. La activación clásica o M1 es producida por la interacción de TLR-4 con los PAMPs como el LPS de la pared de bacterias Gram negativas, o por determinadas citocinas como el TNF- α o el IFN- γ . Este grupo de macrófagos activados de forma clásica produce cantidades elevadas de citocinas proinflamatorias como TNF- α , interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-12), quimiocinas proinflamatorias como MCP-1 y óxido nítrico (NO), promoviendo la activación de la respuesta inmune (7).

En presencia de citocinas secretadas por linfocitos Th2, como la IL-4 o la IL-13, se induce en el macrófago una activación alternativa característica de los macrófagos M2 (8). Estos macrófagos M2 tienen muy baja capacidad de presentar antígenos, mientras que secretan altos niveles de citocinas antiinflamatorias como la IL-10. A diferencia de la activación clásica, estos macrófagos no son capaces de producir óxido nítrico a partir de L-arginina y tampoco consiguen controlar el crecimiento de patógenos intracelulares

(99). Sin embargo, son capaces de producir una elevada cantidad arginasa 1, enzima que metaboliza la L-arginina para producir prolina, glutamato y poliaminas favoreciendo la reparación tisular. La prolina actúa como precursora del colágeno y las poliaminas que han sido ampliamente relacionadas con procesos de proliferación y diferenciación (98). Dentro de este contexto antiinflamatorio, estos macrófagos también pueden producir TGF- β , que inhibe la generación de especies reactivas de oxígeno e intermediarios del nitrógeno. Además, también se ha descrito que los macrófagos M2 liberan factores proangiogénicos (VEGF, MMP9) (100). Se han descrito varias subpoblaciones M2 (a, b, c y d recientemente descrita). La M2a interviene en la cicatrización de heridas, angiogénesis y remodelado tisular tras la estimulación de IL-4 o IL-13, activando la vía de STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) (101). Por otra parte, la subpoblación M2b participa en la modulación y finalización de la respuesta inmune tras la unión de complejos inmunes con los ligandos de TLR y ligandos del receptor de IL-10, respectivamente (102).

Más allá de evaluar la activación clásica por LPS sobre estas células a M1, el objetivo del presente trabajo era elucidar los cambios que producía el hepatoprotector IFC-305 y si era capaz de modificar un fenotipo M1 a M2, el cual había demostrado su efecto en el modelo de cirrosis inducida por CCl₄ en ratas Wistar. La hepatoprotección en este modelo, demostró estar relacionada con la respuesta inflamatoria y con la cantidad de macrófagos presentes en el tejido hepático (89).

Se ha sugerido que CD163 juega un papel durante la activación del macrófago, asociado a ambos fenotipos M1/M2. El CD163 de manera soluble es un factor que correlaciona con la severidad de las enfermedades hepáticas (105, 115) pero por otro lado el receptor asociado a la membrana juega un papel relevante en la respuesta antiinflamatoria. Para la identificación de las células activadas se empleó citometría de flujo y se observó que se activan con LPS y el fenotipo cambia con el IFC-305 (**Figura**

13), para corroborar el resultado, se empleó una cuantificación por western blot de las proteínas extraídas del cultivo de células de Kupffer (por lo que no se considera el CD163 que pudiera liberarse al medio de cultivo); por lo tanto el efecto del IFC-305 se relaciona mayormente con antiinflamación tal como ocurren con su expresión en la respuesta al fármaco IFC-305. Los resultados de citometría de flujo, muestran un aumento en la cantidad de células CD11b+/CD163+ (**Figura 13**), resultado que se replica en la expresión directa de la proteína por western blot (**Figura 22**).

En los últimos años, los investigadores han prestado mucha atención a las diversas funciones de los macrófagos y sus contribuciones al desarrollo del tejido, la cicatrización de heridas y la angiogénesis. Los macrófagos son los principales contribuyentes a los procesos inflamatorios potencialmente patológicos (102,103).

Los macrófagos están preparados para producir rápidamente grandes cantidades de citocinas inflamatorias en respuesta a señales de peligro. La producción de estas citocinas puede iniciar una cascada de liberación de mediadores inflamatorios que puede conducir a la destrucción total del tejido. La capacidad inflamatoria destructiva de los macrófagos se amplifica por la exposición a interferón- γ exógeno, que prolonga y aumenta las respuestas inflamatorias. Los resultados del presente trabajo han demostrado que las células de Kupffer de rata en un cultivo, no pierden esta capacidad fagocítica, pero que a la par reaccionan y se activan mediante la acción del LPS a las pocas horas de exponerse a este antígeno y otros como el carbón coloidal (**Figura 9**).

De los sobrenadantes obtenidos del cultivo se analizó la secreción de las citocinas inflamatorias, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , INF- γ , RANTES e IL-10 y de las citocinas evaluadas a lo largo del tiempo, 2, 4, 6, 24 y 48 horas, los cambios significativos se dieron en dos citocinas principalmente: IL-1 β e IL-6 para las células tratadas con LPS en un fenotipo M1 a las 48 h de cultivo (**Figura 14, 15 y 16**) que se modifica a M2 por efecto del IFC-305 en cultivo.

Durante la inflamación del hígado, las células inmunes de la fibrogénesis y la carcinogénesis desempeñan un papel fundamental. Se ha descrito que RANTES en modelos humanos y murinos de inflamación crónica del hígado conducen al desarrollo del carcinoma hepatocelular (CHC), esto le confiere un papel en la progresión de la enfermedad hepática y especialmente el desarrollo del carcinoma hepatocelular en estas especies, lo cual sucede en un proceso crónico (104), que no es posible elucidar directamente en los cultivos a las 48 h que se utilizaron, donde los niveles de RANTES no presentaron una diferencia significativa respecto a los otros grupos de células tratadas al mismo tiempo (**Figura 16**).

Los macrófagos son una población heterogénea de células mieloides innatas involucradas en la salud y la enfermedad. Recordemos que las funciones principales de los macrófagos incluyen responder a los patógenos y modular la respuesta inmune adaptativa, la inducción y resolución de la inflamación, la reparación de tejidos y la homeostasis. Los macrófagos exhiben una notable plasticidad, en la cual las diferentes poblaciones de macrófagos con distintos roles fisiológicos y patológicos pueden desarrollarse en respuesta a diferentes estímulos. Dependiendo de los tipos de estímulos a los que están expuestos los macrófagos, estas células podrán polarizarse a macrófagos M1 (proinflamatorios) o M2 (antiinflamatorios) o inclusive a un espectro intermedio de activación. Los macrófagos M1 se inducen por estimulación con IFN- γ y LPS. En función de los estímulos y los cambios transcripcionales logrados, los macrófagos M2 se pueden subclasificar en cuatro: M2a activados por IL-4 o IL-13; M2b activados por complejos inmunes y LPS; M2c activados por glucocorticoides o IL-10 y macrófagos similares a M2 o M2d, activados por adenosina o IL-6 (109).

Cuando se aíslan células de Kupffer de ratas sanas y se colocan en cultivo, los resultados indican que el LPS [10mg/mL] actúa sobre la activación de las células de CK hacia un fenotipo M1 clásico, este fenotipo tiene como característica la expresión de la iNOS y p22 en un fenómeno citotóxico e inflamatorio, así como la secreción de IL-1 β ; el tratamiento con IFC-305 a ambas concentraciones (100 μ M y 5mM) disminuye la expresión de estas proteínas (**Figura 22 y 23**), así como una disminución en la liberación de especies reactivas como el NO (**Figura 18**), que contribuyen al fenómeno citotóxico e inflamatorio inducido por el LPS.

Por otro lado los resultados muestran que el IFC-305 es capaz de modificar la expresión de la arginasa I y su actividad, contribuyendo a la polarización de las CK a un fenotipo antiinflamatorio o activado alternativamente M2 (**Figuras 17, 22 y 23**).

Para demostrar el mecanismo específico por el cual se estaba mediando esta activación, se emplearon inhibidores de transportadores y receptores de adenosina así como antagonistas específicos de los receptores de manera independiente, analizando siempre la actividad de la enzima arginasa, que se ha establecido como un marcador para diferenciar a los macrófagos M2 (74).

Para determinar que la vía de activación sea mediada por transportadores de adenosina se empleó un antagonista denominado teofilina que bloquea los 4 transportadores de adenosina al mismo tiempo (A1, A2a, A2b y A3) y agonistas selectivos de cada transportador (**Figura 21**) y un agente bloqueador de canales: dipiridamol, en todos los casos se demostró una disminución de la actividad de arginasa, sin mostrar significancia estadística entre los grupos, por lo que potencialmente el efecto del IFC-305 en las células de Kupffer en cultivo esté mediado tanto por transportadores como por receptores. Sin embargo en ambos casos (24 y 48 horas) se muestra que la teofilina genera una disminución aún mayor sobre la actividad, por lo que podemos sugerir que

la mayor porción del efecto del IFC-305 en células de Kupffer en cultivo sobre la actividad de arginasa está mediada por receptores (**Figura 19 y 20**).

Por otro lado los resultados muestran la tendencia del IFC-305 para modificar la expresión de proteínas como la arginasa I, contribuyendo a la polarización de las CK a un fenotipo antiinflamatorio o activado alternativamente M2, asociado a la activación de 5-LO, ésta última enzima involucrada en la síntesis de mediadores de resolución de la inflamación, ambas mostrando una tendencia al incremento de la expresión de las proteínas con el tratamiento del IFC-305 en las células en cultivo a las 48h (**Figura 22**), de donde surge otra hipótesis, en la que el compuesto podría estar mediando otros factores de resolución de inflamación tales como resolvinas o protectinas.

En cuanto a parte del mecanismo de acción intracelular, empleando un homogenado de proteínas totales de las células cultivadas y lisadas, se determinó por western blot la expresión de SOCS3 (**Figura 22**), esta proteína es un supresor de la señalización de citocinas que atenúa la señalización proinflamatoria mediada por la familia de las proteínas STAT (106,112) a la que se le da una relevancia clínica terapéutica en mecanismos de antiinflamación; cómo podemos observar, la expresión sugiere un aumento respecto al control (**Figura 23**), por efecto del IFC-305, será necesario realizar un mayor número de experimentos para demostrar que el fármaco es capaz de incrementar esta señal de regulación intracelular y el resto de la vía molecular relacionada, como son los receptores a citocinas, principalmente IL-1 β e IL-4 y la IL-10, que atenúa la secreción de citocinas proinflamatorias, así como un análisis a detalle de otros mediadores de la vía de señalización involucrada en este mecanismo como cinasas JAK-STAT y el factor de transcripción NF- κ B.

A la par es relevante mencionar que CD14, el receptor acoplado al TLR-4 que señala intracelularmente a través de su unión a LPS, no muestra cambios que sean

significativos en sus niveles de expresión, excluyendo cambios a este nivel para los efectos del IFC-305 (**Figura 22**), sin embargo no es de ignorarse que la vía de TLR-4 dependiente de MyD88 deberá estudiarse más a detalle para consolidar los efectos que se producen a este nivel de señalización.

En el caso de PPAR- γ , es relevante mencionar que se produce un efecto del fármaco IFC-305 a nivel de tejido hepático y que ya se ha reportado por el grupo (117). Dicho receptor nuclear está asociado a la polarización de macrófago tipo M2 mediada por IL-4 (107), como podemos observar en la **Figura 22** esta proteína incrementa a las dosis bajas de IFC-305 100 μ M, dando indicio a que el mecanismo de acción a dosis más altas no involucra directamente a esta molécula y difiere de lo que podría ocurrir a dosis de 5mM del IFC-305, tal y como se demostró con otras células como hepatocitos y células estelares en cultivo primario, sugiriendo que muchos mecanismos del compuesto son dosis-dependientes.

La búsqueda del mecanismo por el cual el fármaco genera su efecto en las señales del espacio intracelular deberá continuarse a través de la observación de regulación a nivel de expresión de receptores de adenosina: A2a, A2b que se ha descrito también juegan un papel relevante en la polarización de los macrófagos (**Figura 21 y 22**) mediante los efectos que produce el bloqueo selectivo de los dichos receptores y la expresión regulada a nivel de proteína.

El IFC-305 es un compuesto derivado de la adenosina, que se ha demostrado como un potente regulador de la fibrosis hepática. La adenosina es un potente agente antiinflamatorio endógeno liberado por las células en condiciones metabólicamente desfavorables, como la hipoxia o la isquemia. La adenosina modula diferentes actividades funcionales en macrófagos (110). Se cree que algunas de estas actividades se inducen a través de la absorción de adenosina en los macrófagos, mientras que otras

se deben a la interacción con receptores específicos de la superficie celular. En los macrófagos derivados de la médula ósea murina, el uso de diferentes radio-ligandos para los receptores de adenosina sugiere la presencia de subtipos de receptores de adenosina A2B y A3. La presencia de receptores A2B se confirmó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. El receptor A2B es funcional en macrófagos murinos, como lo indica el hecho de que los agonistas de los receptores A2B, pero no los agonistas para A1, A2A o A3, conducen a un aumento en los niveles de AMPc. El IFN- γ regula al alza la proteína de superficie y la expresión génica del receptor de adenosina A2B mediante la inducción de la síntesis de *nov*. La regulación al alza de los receptores A2B se correlaciona con un aumento en la producción de AMPc en macrófagos tratados con un agonista del receptor de adenosina. La estimulación de los receptores A2B por la adenosina o sus análogos se ha demostrado que inhibe la expresión inducida por IFN- γ de los genes MHC de clase II y también la expresión inducida por IFN- γ de óxido nítrico sintasa y de citocinas proinflamatorias (110). En el caso de las CK de rata, que fueron tratadas con LPS al mismo tiempo que el IFC-305 mostraron una regulación de los mecanismos inflamatorios, pero de manera relevante, el fármaco *per se* es capaz de modular la secreción de citocinas hacia un fenotipo M2 mediante el receptor A2B principalmente, sugiriendo que es el núcleo de la adenosina de la molécula el que regula estos procesos de activación alternativa hacia M2d.

Por otro lado, en un estudio realizado para evaluar la eficacia de un agonista A2AR selectivo (FMLP a una concentración de 100 nM) para controlar la activación de macrófagos inflamatorios alveolares humanos en cultivo, se expusieron a durante 120 y se registró una elevación máxima de los niveles de calcio libre intracelular (97.0% sobre el valor inicial) (108). El análisis de inmunofluorescencia reveló un aumento dependiente del tiempo de la densidad A2AR en macrófagos alveolares tras la exposición a FMLP hasta el 148% del control a las 6 h. Estos resultados muestran que los estímulos proinflamatorios regulan al alza el A2AR y su activación amortigua el

impacto de los estímulos proinflamatorios. Esto apoya que el objetivo de A2AR es una terapia prometedora para las enfermedades inflamatorias, especialmente para las enfermedades con un componente inflamatorio fuerte. El efecto que se produce por el IFC-305 en CK en cultivo muestra que el aumento de activación y la regulación de los mecanismos que de ella dependen es regulada en el tiempo, ya que a diferentes horas en cultivo, los niveles de las citocinas secretadas al medio se ven modificados, no sólo por el efecto de la dosis de los tratamientos, sino por el tiempo de incubación con las moléculas, siendo 48 horas el tiempo en el que los efectos son más evidentes. Lo anterior sugiere que como se ha mencionado, la relevancia de los macrófagos alternativos y su activación por IFC-305 está ligada directamente con la resolución de la inflamación en patologías que presentan procesos inflamatorios crónicos, como ocurre con la cirrosis en el hígado y que la remodelación del parénquima hepático que se ha observado en los modelos *in vivo* con esta misma molécula experimental IFC-305, indicando con ello que se requiere de un proceso de activación alternativa M2d, potencialmente mediado por adenosina, para inducir el efecto reparador de tejidos.

Es de resaltar que existen avances importantes en la definición de los eventos inmunológicos asociados con la fibrosis en diversas enfermedades hepáticas crónicas. Dentro de los estudios, para contribuir en el mecanismo directamente asociado a las células de Kupffer y las citocinas, se ha estudiado en el modelo de fibrosis hepática murina inducida por CCl₄ los efectos de un inhibidor de la secreción de citocinas denominado sorafenib que atenuó significativamente la lesión hepática crónica y la fibrosis, incluida la reducción de la inflamación hepática, así como la disminución de la expresión de los genes relacionados con la fibrosis hepática, incluida la actina del músculo liso α , el colágeno, las metaloproteinasas de matriz y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1. Además, el tratamiento con sorafenib dio lugar a la translocación de STAT3 citoplasmático al núcleo en su forma activa. El STAT3 hepático era crítico para la protección mediada por sorafenib contra la fibrosis hepática, y que la regulación al

alza de la fosforilación de STAT3 dependía de la célula Kupffer y la liberación de IL-6 derivada (112). En el caso particular de los resultados del presente trabajo la elevación de este regulador en el modelo *in vitro*, podría relacionarse también de manera directa a la regulación de la liberación de citocinas tanto *in vivo* como directamente sobre las células de Kupffer en cultivo que han sido activadas con LPS. Sin embargo este mecanismo puntualmente podría demostrarse generando un bloqueo selectivo de la vía o un K.O. de la vía de señalización mediada STAT3 en CK para determinar otros efectos en las células que pudieran relacionarse con este intermediario de señalización.

Las enfermedades inflamatorias crónicas siguen siendo un problema de salud y se necesitan nuevos tratamientos antiinflamatorios. Dirigirse a los receptores A2A y A2B de adenosina (A2AR) ofrece fuertes efectos antiinflamatorios en modelos animales, pero la traducción de esta estrategia prometedora para los humanos ha sido un desafío, posiblemente debido a las diferencias entre especies en la distribución y los efectos de los receptores. Por ejemplo, la infección de macrófagos con LPS, un fragmento bacteriano tipo PAMP que activa a M1 por TLR4 desencadena una respuesta apoptótica debido a la inhibición de la activación de p38 MAP quinasa por la toxina letal producida por bacterias (111). Se ha descrito que gran parte del componente inflamatorio en cirrosis, está relacionado directamente con estos fenómenos fisiopatológicos: la inflamación por el lipopolisacárido de endotoxina bacteriano gramnegativo (LPS) está implicado en la lesión hepática aguda y crónica de hígado por los TLR4 hepáticos y la liberación de una alta concentración de citocinas inflamatorias. Al ser un proceso que se mantiene de manera crónica por años, los resultados desencadenan en una cirrosis irreversible y en muchos casos en carcinoma hepatocelular. Sin embargo, los efectos independientes de TLR4 de LPS pueden desempeñar un papel importante en la fisiopatología hepática. Analizando la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) y la lesión hepática aguda inducida por LPS en ratones salvajes (WT por sus siglas en inglés wild type) y una cepa con TLR4-KO (TLR4-knockout) se buscaron los efectos de

LPS en células estrelladas hepáticas fibrogénicas (HSC) de ratones WT y TLR4-KO *in vitro*. El CCl₄ produjo fibrosis y necroinflamación similares y aumentó la expresión de ARNm y proteínas de las citocinas y quimiocinas en ratones WT y TLR4-KO. Sin embargo, la concentración de LPS circulante no aumentó en los ratones tratados con CCl₄. El LPS indujo una activación similar de NF-κB y estimuló la expresión de citocinas y quimiocinas en HSC WT y TLR4-KO. Finalmente, el LPS causó inflamación y lesiones similares en ratones WT y TLR4-KO no tratados previamente (113). Los resultados proporcionan evidencia de los mecanismos de fibrosis hepática independientes de TLR4 / LPS y también indican que TLR4 no es completamente crítico para la lesión hepática aguda inducida por LPS. Los resultados indican además que la señalización de LPS en HSC activadas podría ser un mecanismo para limitar la fibrosis hepática, lo cual debiera demostrarse también para las CK y que nos se reportado hasta el momento.

Por otra parte, recordemos que el sistema inmune innato construye la primera línea de defensa del cuerpo contra los microorganismos patógenos invasores y que para la defensa efectiva de los invasores patógenos, se debe iniciar una reacción inflamatoria estructurada que depende en gran medida de la comunicación de célula a célula. La inflamación a su vez es una reacción potencialmente autodestructiva que está estrechamente controlada para equilibrar la actividad antimicrobiana y el daño al huésped. Las proteínas supresoras de señalización de citocinas (SOCS) se han identificado como reguladores negativos cruciales de varias citocinas hematopoyéticas que emplean Janus kinase (JAK) y transductor de señales y activador de señalización de transcripción (STAT) y que se encuentran en diversas estirpes celulares inmunes, entre ellas, los macrófagos. Otros resultados ahora implican que también la señalización por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del sistema inmune innato que usa una cascada de señalización distinta induce y se regula por las proteínas SOCS. Por lo tanto, las proteínas SOCS no solo modulan la comunicación celular a través de citocinas dependientes de JAK / STAT sino que también regulan la señalización mediante

receptores de reconocimiento de patrones que incluyen los receptores tipo Toll (TLR) (114). En la **figura 22** es posible observar que el IFC-305 a dosis altas por si solo fue capaz de incrementar la expresión de este factor a nivel STAT3 de proteína, lo cual podría contribuir a la activación alternativa de las CK, pero a la par a la disminución de las citocinas IL-1 β e IL-6 de los sobrenadantes del cultivo, sin embargo esta vía no es única, existen otros factores intermediarios de señalización que podrían mediar la secreción de estas citocinas en CK y que debieran analizarse como la vía de IL-1 β R dependiente de MYD88/MKK para NF-KB.

Más allá de una regulación mediada por proteínas y sus señales, está el nivel genético en la actualidad, de manera muy reciente se ha descrito que las enzimas epigenéticas están emergiendo como controladores cruciales de macrófagos, y que estas células inmunes innatas determinan el resultado de muchas enfermedades inflamatorias. Estudios recientes demuestran que la actividad de determinadas enzimas modificadoras de la cromatina está regulada por la disponibilidad de metabolitos específicos como acetil-coenzima A, S-adenosilmetionina, α -cetoglutarato, nicotinamida, adenina dinucleótido y poliaminas (116). De este modo, las enzimas modificadoras de la cromatina podrían detectar el estado metabólico del macrófago y traducirlo en expresión génica y cambios fenotípicos. Es importante destacar que los distintos subconjuntos de activación de macrófagos muestran vías metabólicas particulares. Los macrófagos activados por IFN γ / lipopolisacáridos (M1 IFN γ / LPS) muestran una glucólisis alta, que controla directamente su fenotipo inflamatorio. En contraste, el metabolismo mitocondrial oxidativo y la producción de poliaminas son características y requisitos para la activación de macrófagos inducida por IL-4 (IL-4/M2). Sería de relevancia para la elucidación del mecanismo intracelular de estas células, el poder estudiar en un futuro, mecanismos epigenéticos que se asocian directamente con esta activación, por ejemplo el mediado por la desmetilasa de histonas Jumonji H3K27 o JMJD3 que activa genes específicos de la activación M2, como IL-4 y la disminución de citocinas inflamatorias, lo

anterior porque el IFC-305 también ha demostrado tener una capacidad reguladora sobre mecanismos epigenéticos y sobre niveles energéticos (117-120). Actualmente ya se ha determinado que modulación de los macrófagos es esencial para múltiples procesos patológicos desde respuestas autoinmunes, cáncer, fibrosis cardiaca, asma, obesidad, entre otros; lo que sugiere que esta polarización y sus mecanismos así como la activación alternativa mediada por una molécula experimental derivada de adenosina IFC-305 abre una oportunidad para su tratamiento.

Conclusiones

- Las células en cultivo fueron identificadas con el fenotipo ED-2+ y se induce la expresión con LPS de las marcas CD11b+ / CD163+ que corresponden a macrófagos tisulares de hígado o células de Kupffer activadas.
- Las concentraciones a emplearse en los ensayos se determinaron por curvas de viabilidad: para LPS [10mg/mL], para IFC-305 [100µM y 5mM].
- El LPS activa a las células de Kupffer clásicamente a un fenotipo M1, demostrado por la liberación de NO al sobrenadante del cultivo y la expresión de proteínas como iNOS, p22 y CD163 por western blot.
- El IFC-305 es capaz de disminuir la activación clásica M1, inhibiendo la expresión de la proteína por iNOS y p22.
- El IFC-305 disminuye la secreción de citocinas inflamatorias IL-1β, IL-6 y TNF-α a las 24 y 48 horas de CK en cultivo, potencialmente mediado por la citocina inmuno-reguladora IL-10.
- El tratamiento con IFC-305 [5mM] incrementa la expresión en los niveles de proteína arginasa I y la expresión de SOC3.
- La actividad enzimática de arginasa disminuye en presencia de dipiridamol y de teofilina, por lo que el efecto del IFC-305 potencialmente está mediando tanto por transportadores como por receptores.
- Los antagonistas de los receptores A2A (MSX-3) y A2B (MRS 1754) bloquean los receptores disminuyendo la actividad de arginasa, por lo que el IFC-305 activa alternativamente a las células de Kupffer, lo cuál podría ser través de los receptores A2A y A2B hacía un potencial fenotipo M2d.

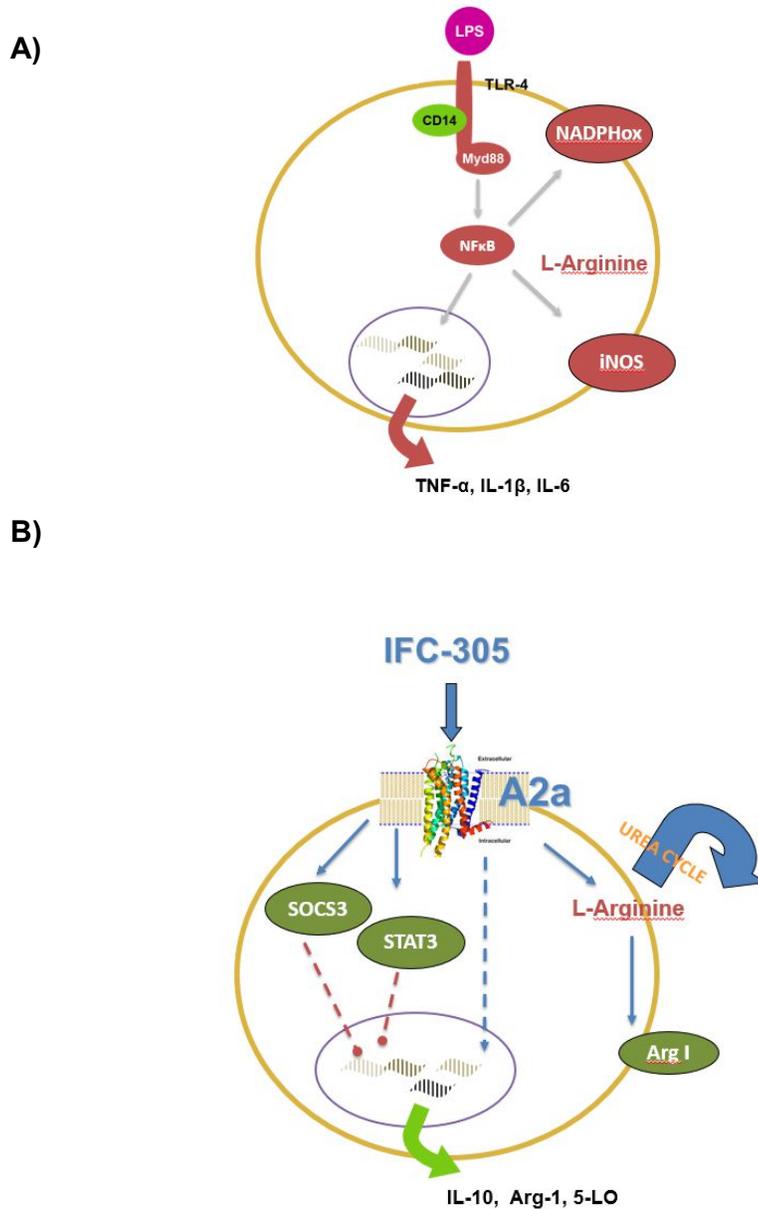


Figura 24. Mecanismo de acción de IFC-305 *in vitro* sobre las células de Kupffer.

A) La activación clásica M1 de CK en cultivo, tratadas con LPS, induce la expresión de CD163, iNOS, STAT3 y p22. Las células secretan citocinas inflamatorias como: IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; **B)** La activación alternativa potencial subtipor M2d inducida por IFC-305, aspartato de adenosina, aumenta la expresión de 5-LO, PPAR- γ , A2a, Arg1 y SOCS3, disminuyendo la síntesis de citocinas proinflamatorias, esto potencialmente mediado por un aumento en la secreción de la citocinas inmunorreguladora IL-10.

Perspectivas

- Profundizar en las vías de señalización de las células de Kupffer tratadas con IFC-305 *in vitro*.
- Bloquear selectivamente el receptor A2A y A2B para demostrar los efectos dependientes de receptor durante la activación de células de Kupffer tratadas con IFC-305.
- Demostrar que la activación inducida por IFC-305 es potencialmente M2d en otros tipos celulares de macrófagos, que pudieran ser peritoneales o alveolares en cultivo.
- Analizar el mecanismo epigenético de activación de las células de Kupffer con IFC-305.
- Profundizar en la regulación epigenética en activación M2d de macrófagos por adenosina.
- Activar selectivamente macrófagos en cultivo con IFC-305 y emplearlos en como terapia celular en modelos experimentales de patologías inflamatorias que requieran remodelación de tejido para su tratamiento, como en los casos de síndrome posttrombótico, fibrosis quística o alzheimer.

REFERENCIAS:

1. Rojas M W, Anaya JM, Aristizábal B, Cano LE, Gómez O LM., Lopera H D. Inmunología de Rojas. 16° edición. Medellín, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas, 2012.
2. Murray PJ. Macrophage Polarization. Annual Review of Physiology 2017 79:1, 541-566.
3. Mantovani A, Biswas S, Galdiero MR, Sica A, Locati M. *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. Journal of Pathology, Vol. 229, 176-185, 2013.
4. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. Inmunología de Kuby. Capítulo 2: Células y órganos del sistema inmunitario. 6° edición. Buenos Aires. McGraw-Hill Interamericana, pp. 36, 2007.
5. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. Cell Signal. 2014 Feb;26(2):192-7
6. Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, et al. (2014) The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. Biomaterials 35: 4477- 4488.
7. Laskin DL. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. Chem Res Toxicol. 2009 Aug;22(8):1376-85
8. Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature, 496 (7446), 445–455.
9. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 3: 23-35. 2003
10. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. Trends Immunol. 2004 Jan;25(1):33-9.

11. Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr, Gause WC, Leibovich SJ, Haskó G. Antonioli alternative macrophage activation via A(2A) and A(2B) receptors. *FASEB J*. 2011 Sep 16.
12. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):986-95. doi: 10.1038/ni.2705. Epub 2013
13. Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage
14. Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol*. 2011 Sep;41(9):2498-502.
15. Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, Hoffmann A, Montminy M, Karin M. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity*. 2005 Sep;23(3):319-29.
16. Jang BC, Kim DH, Park JW, Kwon TK, Kim SP, Song DK, Park JG, Bae JH, Mun KC, Baek WK, Suh MH, Hla T, Suh SI. Induction of cyclooxygenase-2 in macrophages by catalase: role of NF-kappaB and PI3K signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 2;316(2):398-406.
17. Martinez FO. Regulators of macrophage activation. *Eur J Immunol*. 2011 Jun;41(6):1531-4.
18. Rosas M, Davies LC, Jones SA, Taylor PR. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2011 Sep;41(9):2503-8.
19. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res* 2002; 25:229-245.
20. Hebenstreit D, Wirmsberger G, Horejs-Hoeck J, and Duschl A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17:173-188.
21. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor

- necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:3803- 3807.
22. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391:79-82.
23. Ricote M, Welch JS, Glass CK. Regulation of macrophage gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Horm Res* 2000; 54:275-280.
24. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998; 160:5347-5354.
25. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdts S. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scand J Immunol* 2005; 61:10-17
26. Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* 2001; 53:386-392.
27. Gerber JS, Mosser DM. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* 2001; 166:6861-6868.
28. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1298-1307.
29. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, BouchetDelbos L et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 2003; 101:729-738.

30. Turner M, Chantry D, Feldmann M. Transforming growth factor beta induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 1990; 2:211-216.
31. Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 2000; 204:19-28.
32. Parker GA, Picut CA Liver immunobiology. *Toxicol Pathol.* 2005;33(1):52-62. Review.
33. Mae Diejl A. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunological Reviews* 2000. Vol. 174:160-171.
34. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21;20(23):7312-24
35. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:79-88.
36. Imuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to Tumor Necrosis Factor Alfa Attenuate Hepatic Necrosis and Inflammation Caused by Chronic Exposure to Ethanol in the Rat. *Hepatology.* 1997 Dec;26(6):1530-7.
37. Armendariz-Borunda, J., Seyer, J. M., Postlethwaite, A. E., & Kang, A. H. Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat livers produce chemotactic factors for fibroblasts and monocytes: The role of tumor necrosis factor- α . *Hepatology*, 1991. 14(5), 895-900.
38. Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased Expression of Monocyte Chemotactic Protein-1 during Active Hepatic Fibrogenesis. Correlation with monocyte infiltration. *American Journal of Pathology*, Vol. 152, No. 2, February 1998
39. Locati M, Zhou D, Luini W, Evangelista V, Mantovani A, Sozzani S. Rapid Induction of Arachidonic Acid Release by Monocyte Chemotactic Protein-1 and Related Chemokines Vol. 269, No. 7, Issue of February 18, pp. 4746-4753, 1994

40. Domínguez, F. Implicación de las quimiocinas Il-8, MCP-1, RANTES, los receptores CXCR1, CXCR4, CCR2, CCR5 y el factor IGFBP-Rp1 en la interfase materno-embionaria. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Servei de Publicacions, 2003
41. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/quimio/quimio.htm>
<consulta: MAYO 2009>
42. Budai MM, Tózsér J, Benkő S. Different dynamics of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production in GM-CSF- and M-CSF-differentiated human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2017 Jun;101(6):1335-1347.
43. Gieling RG, Wallace K, Han YP. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Jun;296(6):G1324-31
44. Moshage, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *Journal of pathology*, 1997, vol. 181, 257-266.
45. Bosurgi L, Cao YG, Cabeza-Cabrerizo M, Tucci A, Hughes LD, Kong Y, Weinstein JS, Licona-Limon P, Schmid ET, Pelorosso F, Gagliani N, Craft JE, Flavell RA, Ghosh S, Rothlin CV. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science* 356, 1072–1076 (2017).
46. Kayano K. Does IL-6 regulate liver fibrosis / cirrhosis directly and indirectly? *J Gastroenterol* 2000; 35:250–251.
47. Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF. Plasma tumor necrosis factor predicts decreased long term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14:255-259.
48. Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, Li N, Wei F. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res.* 2015 Dec 17;4. pii: F1000 Faculty Rev-1465.

49. Reiner, Neil E. *Macrophages and Dendritic Cells: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology). Humana Press; 2009. ISBN-10: 1588299724. pp 29-43
50. Barbé E, Damoiseaux JG, Döpp EA, Dijkstra CD. Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. *Immunobiology*. 1990 Dec;182(1):88-99.
51. Polfliet MM, Fabrik BO, Daniëls WP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* 211: 2006, 419-425.
52. Ginhoux F, Williams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016 Mar 15;44(3):439-449.
53. Mosser, D. and Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec 8(12):958-69.
54. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*, 2006, December 14; 12(46): 7413-7420.
55. Serhan, C. Resolution on inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, 2005, Vol. 6 (12): 1191-1197.
56. Friedman, S. Mac the knife? Macrophage – the double - edged sword of hepatic fibrosis- *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, Vol.115(1): 29-32.
57. Bhatnagar R, Schirmer R, Ernst M, Decker K. Superoxide release by zymosan-stimulated rat Kupffer cells in vitro. *Eur J Biochem* 1981;119:171.
58. Iredale, JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science*, 2007, 112, 265–280
59. Nagy, L. Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: Role of adiponectin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Vol. 21. 2006: S30-S33

60. Gressner AM, Zerbe O. Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture. *J Hepatol* 1987;5:299-310
61. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature reviews*. Vol 13, 2013; pp 842-857
62. Mandal P, Pratt BT, Barnes M, McMullen MR, Nagy LE.. Molecular Mechanism for Adiponectin-dependent M2 Macrophage Polarization. *The journal of Biological Chemistry*, 2011, Vol. 286(15): 13460–13469.
63. Fleming BD, Mosser DM Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol*. 2011 Sep;41(9):2498-502.
64. Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, Hoffmann A, Montminy M, Karin M. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity*. 2005 Sep;23(3):319-29.
65. Jang BC, Kim DH, Park JW, Kwon TK, Kim SP, Song DK, Park JG, Bae JH, Mun KC, Baek WK, Suh MH, Hla T, Suh SI. Induction of cyclooxygenase-2 in macrophages by catalase: role of NF-kappaB and PI3K signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 2;316(2):398-406.
66. Martinez FO. Regulators of macrophage activation. *Eur J Immunol*. 2011 Jun;41(6):1531-4.
67. Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA, Taylor PR. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2011 Sep;41(9):2503-8.
68. Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2011 Aug;41(8):2155-64.

69. Van Loon, S. L. M., Smits, A. I. P. M., Driessen-Mol, A., Baaijens, F. P. T., & Bouten, C. V. C. (2013). The immune response in in situ tissue engineering of aortic heart valves. In *Calcific Aortic Valve Disease*. IntechOpen.
70. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):986-95. doi: 10.1038/ni.2705. Epub 2013 Sep 18.
71. Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, Leibovich SJ. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation*. 2013 Aug;36(4):921-31.
72. Haskó G, Pacher P. Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Apr;32(4):865-9
73. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
74. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J. Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53. Review
75. Geerts A, Schellinck P, Bouwens L, Wisse E. Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 1988;6:50-6
76. Clària J, Títos E. La célula de Kupffer. *Gastroenterología y Hepatología* 2004;27(4): 264-273.
77. Van Furth R. Monocyte origin of Kupffer cells. *Blood Cells* 1980;6:87-92

78. Edwards M.J., Keller B.J., Kauffman F.C., Thurman R.G. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. (1993) *Toxicology and Applied Pharmacology*, 119 (2), pp. 275-279.
79. Decker, K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells), *Eur. J. Biochem.* 192, 245-2611 (1990)
80. Bataller R, Ginès P. Nuevas perspectivas terapéuticas de la fibrosis hepática: bases patogénicas. *Med Clin (Barc)* 2002; 118:339-46
81. Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol.* 2003 Mar-Apr;23(2):103-8.
82. Esbach S, Pieters MN, Van der BJ, Schouten D, Van der Heyde MN, Roholl PJ. Visualization of the uptake and processing of oxidized low-density lipoproteins in human and rat liver. *Hepatology* 1993;18:537-45.
83. Le Moine O, Quertinmont E, Gulbis B, Devière J. Blunted anti-inflammatory response to adenosine in alcoholic cirrhosis. *J Hepatol.* 1999 Sep;31(3):457-63.
84. Programa Nacional de Salud 2007-2012. DGSI, Secretaria de Salud. Portal INEGI.
<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitals/bd/mortalidad/MortalidadGeneral.asp?s=est&c=11144>
85. Chagoya de Sánchez, V. Hernández-Muñoz R. Patente-MX.229679.
86. Pérez-Carreón J, et. al. An adenosine derivate compound, IFC-305, reverses fibrosis and alters genes expression in preestablished CCl₄-induced rat cirrhosis. *Biochem Pharmacol.* 2010 Dec 1;80(11):1690-9.
87. Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Suárez-Cuenca, J.A., Trejo-Solís, C., López, V., Sánchez-Sevilla, L., Yáñez, L. and De Sánchez, V.C., 2001. Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology*, 34(4), pp.677-687.

88. Chagoya de Sánchez V, Martínez-Pérez L, Hernández-Muñoz R, Velasco-Loyden G. Recovery of the Cell Cycle Inhibition in CCl₄-Induced Cirrhosis by the Adenosine Derivative IFC-305. *Int J Hepatol*. 2012;212530.
89. Pérez-Cabeza de Vaca R, Domínguez-López M, Guerrero-Celis N, Rodríguez-Aguilera JR, Chagoya de Sánchez V. Inflammation is regulated by the adenosine derivative molecule, IFC-305, during reversion of cirrhosis in a CCl₄ rat model. *Int Immunopharmacol*. 2018 Jan;54:12-23
90. Pérez-Cabeza de Vaca, R, et al. Effects of the novel compound IFC-305 over the Kupffer cells populations and inflammatory cytokines during cirrosis development stages. *16th Internacional Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid*, 2011. Florencia, Italia.
91. Cabrales-Romero, MP, et al.. Modulación de la vía intrínseca de la apoptosis por efecto del derivado de adenosina IFC-305 en cultivos primarios de hepatocitos expuestos a tetracloruro de carbono. *XXVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*, 2010. Chiapas, México.
92. Velasco-Loyden G, Velasco-Loyden G, Pérez-Carreón JI, Agüero JF, Romero PC, Vidrio-Gómez S, Martínez-Pérez L, Yáñez-Maldonado L, Hernández-Muñoz R, Macías-Silva M, de Sánchez VC. Prevention of *in vitro* hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochem Pharmacol*. 2010 Dec 1;80(11):1690-9
93. CD163(ED-2): sc 58965. Data sheet. Santa Cruz Biotechnology ®.
<http://datasheets.scbt.com/sc-58965.pdf>
94. Corraliza IM1, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Jan 17;206(2):667-73.

95. Praaning, D.P., Dalen, and Knook DL. Quantitative determination of in vivo endocytosis by rat liver kupffer and endothelial cells facilitates by an improved cell isolation method. *FEBS (1982) Lett.* 141(2):229-32.
96. Reiner, Neil E. *Macrophages and Dendritic Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press; 2009. ISBN-10: 1588299724. pp 29-43
97. Hristodorov D, Mladenov R, Huhn M, Barth S, Thepen T. Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases. *Toxins (Basel)* 2003, 4: 676-694.
98. Traves PG, Luque A, Hortelano S. Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflamm* 2012: 568783.
99. Kropf P, Fuentes JM, Fahnrich E, Arpa L, Herath S. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J* (2005) 19: 1000-1002.
100. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* (1988) 334: 260-262.
101. Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* (2014) 35: 4477- 4488.
102. Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, Chandrasekaran P, Mosser DM. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. *Annu Rev Physiol.* 2017 Feb 10;79:567-592. Epub 2016 Dec 7.
103. Mohs A, Kuttkat N, Reißing J, Zimmermann HW, Sonntag R, Proudfoot A, Youssef SA, de Bruin A, Cubero FJ, Trautwein C. Functional role of CCL5/RANTES for HCC progression during chronic liver disease. *J Hepatol.* 2017 Apr;66(4):743-753. Epub 2016 Dec 21

104. Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Nov;285(5):G949-58. Epub 2003 Jun 26.
105. Andersen ES, Rødgaard-Hansen S, Moessner B, Christensen PB, Møller HJ, Weis N. Macrophage-related serum biomarkers soluble CD163 (sCD163) and soluble mannose receptor (sMR) to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot study *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Jan;33(1):117-22.
106. Jo D, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nature Medicine*, Vol. 11, NUMBER 8, 2005
107. Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity. A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* (1992) 176, 287–292
108. Alfaro TM, Rodrigues DI, Tomé ÂR, Cunha RA, Robalo Cordeiro C. Adenosine A_{2A} receptors are up-regulated and control the activation of human alveolar macrophages. *Pulm Pharmacol Ther.* 2017 Aug;45:90-94. Epub 2017 May 9.
109. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods Mol Biol.* 2018;1784:119-126.
110. Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, Franco R, Celada A. IFN- γ up-regulates the A_{2B} adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3607-14.
111. Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, Hoffmann A, Montminy M, Karin M. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-

- induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity*. 2005 Sep;23(3):319-29.
112. Deng YR, Ma HD, Tsuneyama K, Yang W, Wang YH, Lu FT, Liu CH, Liu P, He XS, Diehl AM, Gershwin ME, Lian ZX. STAT3-mediated attenuation of CCl4-induced mouse liver fibrosis by the protein kinase inhibitor sorafenib. *J Autoimmun*. 2013 Oct;46:25-34. doi: 10.1016/j.jaut.2013.07.008.
113. Kumar S, Wang J, Shanmukhappa SK, Gandhi CR. Toll-Like Receptor 4-Independent Carbon Tetrachloride-Induced Fibrosis and Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury in Mice: Role of Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol*. 2017 Jun;187(6):1356-1367. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.01.021. Epub 2017 Apr
114. Strebovsky J, Walker P, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling proteins as regulators of innate immune signaling. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jan 1;17:1627-39.
115. Moestrup SK, Moller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med* 2004;36:347-354
116. Baardman J, Licht I, de Winther MP, Van den Bossche J Metabolic-epigenetic crosstalk in macrophage activation. *J Epigenomics*. 2015 Oct;7(7):1155-64.
117. Rodríguez-Aguilera JR, Guerrero-Hernández C, Pérez-Molina R, Cadena-Del-Castillo CE, Pérez-Cabeza de Vaca R, Guerrero-Celis N, Domínguez-López M, Murillo-de-Ozores AR, Arzate-Mejía R, Recillas-Targa F, Chagoya de Sánchez V. Epigenetic Effects of an Adenosine Derivative in a Wistar Rat Model of Liver Cirrhosis. *J Cell Biochem*. 2018 Jan;119(1):401-413.
118. Rodríguez-Aguilera, J. R., Pérez- Cabeza de Vaca, R., Guerrero-Celis, N., Velasco-Loyden, G., Domínguez-López, M., Recillas-Targa, F., & de Sánchez, V. C. (2019). Molecular and Cellular Aspects of Cirrhosis and How an Adenosine Derivative Could Revert Fibrosis. In *Liver Cirrhosis-Debates and Current Challenges*. IntechOpen.

119. Ishii M, Wen H, Corsa CA, Liu T, Coelho AL, Allen RM, Carson WF 4th, Cavassani KA, Li X, Lukacs NW, Hogaboam CM, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3244-54
120. Hsu AT, Lupancu TJ, Lee MC, Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA, Achuthan A. Epigenetic and transcriptional regulation of IL4-induced CCL17 production in human monocytes and murine macrophages. *J Biol Chem*. 2018 Jul 20;293(29):11415-11423