

00377
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVACION DE LOS GENES HGF, TGF α Y TGF β_1
DURANTE EL EFECTO DE LA ADENOSINA EN LA
REVERSION DE LA LESION HEPATICA TIPO
CIRROSIS INDUCIDA POR TETRACLORURO DE
CARBONO EN RATAS

299732

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A
MED. CIR. JUAN ANTONIO SUAREZ CUENCA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROLANDO E. HERNANDEZ MUÑOZ

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2001



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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de noviembre de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL) del alumno SUAREZ CUENCA JUAN ANTONIO con número de cuenta 99809889, número de expediente 3991109, con la tesis titulada: "ACTIVACION DE LOS GENES HGF, TGFalfa Y TGFbeta1 DURANTE EL EFECTO DE LA ADENOSINA EN LA REVERSION DE LA LESION HEPATICA TIPO CIRROSIS INDUCIDA POR TETRACLORURO DE CARBONO EN RATAS", bajo la dirección del DR. ROLANDO E. HERNANDEZ MUÑOZ.

Presidente: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Secretario: Dr. Rolando E. Hernández Muñoz
Vocal: Dr. Javier Espinosa Aguirre
Suplente: Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Suplente: Dr. Ricardo Lascurain Ledezma

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de noviembre de 2001


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. ROLANDO E. HERNÁNDEZ MUÑOZ.

LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, FUE POSIBLE GRACIAS AL APOYO ECONÓMICO DE LA BECA DE MAESTRÍA OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) Y LA BECA OTORGADA POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEPE).

DE IGUAL MANERA, AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS, DR. RICARDO LASCURAIN LEDEZMA Y DR. ROLANDO E. HERNÁNDEZ MUÑOZ, POR SUS VALIOSAS APORTACIONES PARA EL ADECUADO DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

AGRADECIMIENTOS

A Dios... por ser quién es y permitirme conocerle, a través de la ciencia como instrumento y la razón como medio de asombro y alabanza.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz... por su enorme nobleza y haberme otorgado la oportunidad que en algún momento creí perdida.

A Vilma y Jorge... por su amistad incondicional y sabios consejos, aún en las situaciones adversas.

A aquellas personas... que en esta pequeña porción de papel su nombre no fué escrito; y sin embargo, ambos sabemos que su apoyo se encuentra plasmado en esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres... porque todo lo que hago lleva su firma, tanto en mis genes como en el infinito agradecimiento y veneración hacia ellos.

A Angélica... porque ha sabido encontrar el equilibrio entre esclavizarme a su cariño, y obsequiarme mediante su comprensión, la libertad.

ÍNDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	HIPÓTESIS.....	15
III.	OBJETIVO	
	3.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	16
V.	DISEÑO METODOLÓGICO	17
	5.1 Animales y Tratamiento.....	17
	5.2 Manejo y Preparación de las Muestras Biológicas.....	19
	5.3 Procedimientos Analíticos.....	19
	5.3.1 Evaluación Histológica.	19
	5.3.2 Pruebas de Función Hepática.	19
	5.3.3 Determinación de la Expresión de Proteínas.....	19
	5.4 Manejo estadístico.....	20
VI.	RESULTADOS.....	21
	6.1 PESO DEL HÍGADO Y EL BAZO.....	21
	6.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.....	21
	6.3 PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPATICA.....	22
	6.4 EXPRESIÓN DE GENES.....	23
VII.	DISCUSIÓN.....	28
VIII.	CONCLUSIONES.....	35
IX	REFERENCIAS.....	36
X.	TABLAS Y FIGURAS.....	43

ABREVIATURAS

HSC	Células estelares hepáticas
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz extracelular
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF β ₁	Factor de crecimiento transformante beta 1
EGF	Factor de crecimiento epidermoide
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
TGF α	Factor de crecimiento transformante alfa
ET-1	endotelina 1
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermoide
TGF β RII	Receptor de TGF β 1 tipo II
c-met	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
S.S.	Solución salina
sem	Semanas
ADO	Adenosina
PBS	Solución amortiguadora de cloruro de sodio y fosfato
ALT	Alanino aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
TBS	Solución amortiguadora de cloruro de sodio y TRIS
MMP-2	Metaloproteasa de matriz extracelular tipo 2
MT ₁ -MMP	colágenasa con dominio de secuencia membranal tipo 1
MMP-13	Metaloproteasa de matriz extracelular tipo 13
TIMP-1	Inhibidor tisular de MMPs tipo 1
TIMP-2	Inhibidor tisular de MMPs tipo 2

RESUMEN

La cirrosis es un proceso dinámico que está regulado a distintos niveles, que en general promueven el depósito de matriz extracelular en el hígado. Normalmente, las citocinas y factores de crecimiento presentes en el microambiente hepático, regulan la homeostasis celular y el recambio de matriz extracelular. No obstante, ante un daño hepático los intentos por reestablecer la homeostasis pueden alterar el equilibrio entre citocinas, contribuyendo a una serie de modificaciones hepáticas que culminan en la condición denominada cirrosis.

En el presente trabajo se estudió la presencia de citocinas en un modelo de cirrosis inducida por CCl_4 , y su reversión inducida por el nucleósido adenosina. Se utilizó este modelo de reversión con el objeto de caracterizar más ampliamente los efectos benéficos que se han observado al administrar el nucleósido en hígados cirróticos. Se estudiaron las citocinas HGF, $\text{TGF}\beta_1$ y $\text{TGF}\alpha$, debido a sus efectos previamente descritos en fibrogénesis y regeneración. El análisis de su expresión proteica se llevó a cabo por el método de Western blot.

Después de confirmar los datos preestablecidos para este modelo, se estudiaron los patrones de expresión de citocinas en el hígado, encontrando que en la cirrosis instalada existe un estado altamente fibrogénico representado por el incremento de $\text{TGF}\beta_1$ y su receptor hepático. Posteriormente, al discontinuar el hepatotóxico se observó una coordinación recíproca en la expresión del HGF y $\text{TGF}\beta_1$ en el hígado, que junto con sus receptores favorecían la prevalencia de un estado fibrogénico poco reversible. Estas condiciones pro-fibrogénicas correlacionaron con un patrón colagenolítico insuficiente sugerido por la expresión de MMPs y TIMPs. Por otro lado, al inducir reversión con adenosina se produjo la elevación de HGF en el hígado cirrótico junto con la disminución de $\text{TGF}\beta_1$ y su receptor, estando mutuamente reguladas pero ahora mostrando una tendencia general

hacia la disminución de la fibrosis y regeneración del tejido, que junto con la disminución de expresión de TIMPs, se asoció a la recuperación de la actividad colagenolítica ya previamente reportada al administrar adenosina.

En este estudio también se observaron cambios regulados en la expresión de de HGF y $TGF\beta_1$ en suero, que se relacionaron a los patrones mostrados en el hígado, lo cual sugiere una posible regulación y participación de las citocinas sistémicas y sus fuentes de origen. $TGF\alpha$ únicamente se detectó a nivel plasmático, y de acuerdo al comportamiento observado se sugiere su posible participación; sin embargo, para confirmar esto se requiere de un mayor estudio y una mejor caracterización.

I. INTRODUCCIÓN

“...como castigo, un águila de Zeus se alimentaría eternamente de su hígado; devorándolo en el día, y permitiéndole regenerar durante la noche”. (1)

La capacidad de regeneración y remodelación del hígado ante un estímulo, es una característica que ha sido reconocida desde hace mucho tiempo, basta citar el mito griego de Prometeo para darse cuenta de ello. Esta respuesta es vital, ya que la sobrevida posterior a una lesión hepática significativa depende de una actividad regenerativa exitosa; mientras que una regeneración alterada contribuye al desarrollo de varias enfermedades hepáticas a corto o a largo plazo. (2)

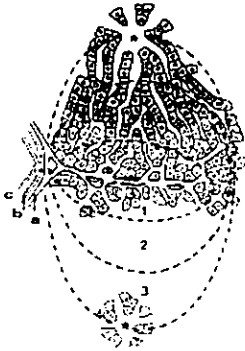
Así entonces, frente a un estímulo dañino el hígado puede responder de distintas formas: mediante la regeneración controlada de la zona afectada; ó formando una cicatriz con distorsión de la arquitectura tisular, o una combinación de ambas. La primera respuesta resultará en la restauración adecuada del tejido hepático, mientras que las otras conducen a la fibrosis ó cirrosis observables en el hígado enfermo; pero los factores que determinan dichas respuestas no están bien esclarecidos hasta el momento actual. No obstante, se conoce que juegan un papel importante la naturaleza, intensidad y duración del daño; así como las características genotípicas y fenotípicas del individuo. (3)

EL TEJIDO HEPÁTICO NORMAL

El hígado es la glándula más grande con la que cuenta el organismo, su peso promedio en el adulto es de 1800 gramos (gr.) en el hombre, y 1400 gr. en la mujer; constituyendo de 1.8% a 3.1% del peso corporal en la mayoría de los individuos. (4)

Entre las poblaciones celulares que proveen las características morfológicas y funcionales únicas del hígado, se cuentan los hepatocitos que constituyen un 70%-80% de todo el parénquima hepático (5); las células endoteliales; células epiteliales; células ovales; células de Kupffer y de Pit, ambas relacionadas con el sistema inmune; y los fibroblastos también llamados células estelares hepáticas (HSC), miofibroblastos, lipocitos ó células de Ito, encargados del almacenamiento de lípidos, y considerados factores clave en la regulación del metabolismo de la matriz extracelular (MEC). (6)

La distribución celular en el hígado es muy característica, estando organizada en zonas de tamaño y forma irregular denominadas acinos. Los hepatocitos se disponen en cordones o hileras, que conectan a distintas zonas de confluencia estructural y metabólica; el espacio entre hilera e hilera se denomina sinusoides hepático, mientras que el espacio entre hilera y endotelio se conoce como espacio de Disse. Por otro lado, estos complejos conectados por los hepatocitos, están formados de un capilar de la arteria hepática, un capilar porta, un conductillo biliar o colangiolo, vasos linfáticos y nervios, que en conjunto son conocidos como triada ó espacio porta; en cuyo radio se encuentran dos o más vénulas hepáticas, con quienes mantienen relaciones vasculares y biliares comunes. La conjunción de espacios porta con la vénula hepática constituye el acino; y de acuerdo a esta disposición, se puede apreciar un arreglo tisular constante de seis espacios porta periféricos y una vénula hepática central, adquiriendo una morfología hexagonal. (4)



Acino de Rappaport mostrando:

- 1 Zona periportal
- 2 Zona mediolobular
- 3 Zona centrolobular
- a Vena portal
- b Arteria hepática
- c Colangiolo



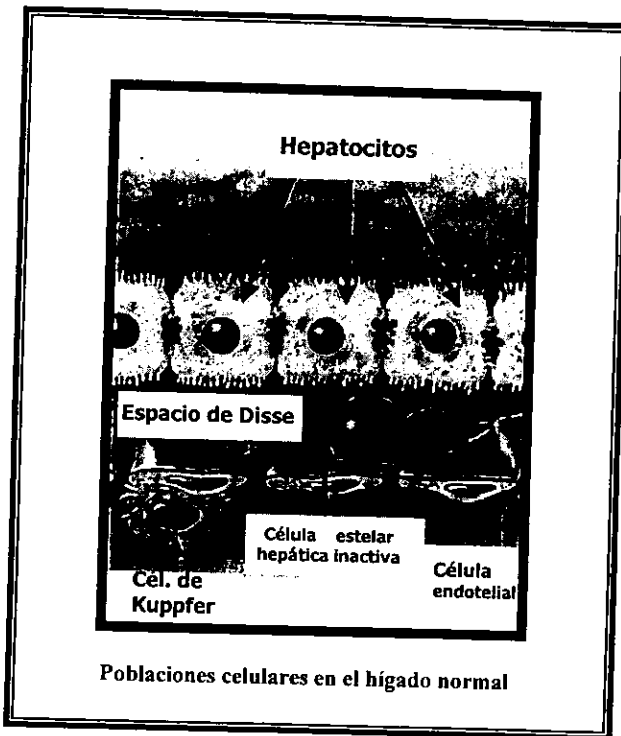
Micrografía electrónica mostrando

- 1 Vena centrolobular
- 2 Espacio porta

El resto del tejido libre de células, constituye aproximadamente el 20% del volumen hepático y está constituido por la MEC; formada en su mayoría por colágena, cuya densidad en el hígado de la rata y humano es a razón de 0.91 ± 0.15 mg/gr, y 5.5 ± 1.6 mg/gr de tejido fresco, respectivamente. En el hígado normal se identifican variantes genéticas de colágenas, los tipos I, III, V, y las colágenas no fibrilares (tipo membrana basal) IV, VI y XIV (7,8); en orden de importancia. Además, en la MEC también podemos encontrar componentes no colagénicos como fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanos y glucosaminoglucanos. (9,10)

HIPÓTESIS DEL ECOSISTEMA HEPÁTICO

Para entender mejor los mecanismos fisiológicos que mantienen la estructura y función del hígado, se puede considerar a este órgano como un pequeño sistema ecológico, en el que cada población celular o componente de la MEC, son elementos importantes que se mantienen constantes e interactúan para alcanzar la homeostasis; logrando la conservación morfológica y funcional del tejido hepático.



Además los metabolitos, citocinas, y factores de crecimiento producidos en el hígado y fuera de él, regulan la expresión de genes, controlan la proliferación celular y el metabolismo de la MEC, siendo eventos locales los responsables de la regulación fina del ecosistema, y en menor medida los eventos sistémicos. (11)

De esta forma, todos los componentes mencionados mantienen el estado fisiológico del hígado; sin embargo, el sistema debe contar con mecanismos específicos para restaurar su normalidad cuando el ecosistema se vea alterado. (3) Es decir, la alteración podría manifestarse como cambios en la función celular, independientemente de la presencia o ausencia de una lesión hepática evidente, que ocasionen el desequilibrio de metabolitos, citocinas y factores de crecimiento presentes en el ecosistema; desordenando también los mecanismos normales de comunicación célula-célula o célula-matriz, y resultando en modificaciones posteriores en la homeostasis del órgano. (11)

LA CIRROSIS

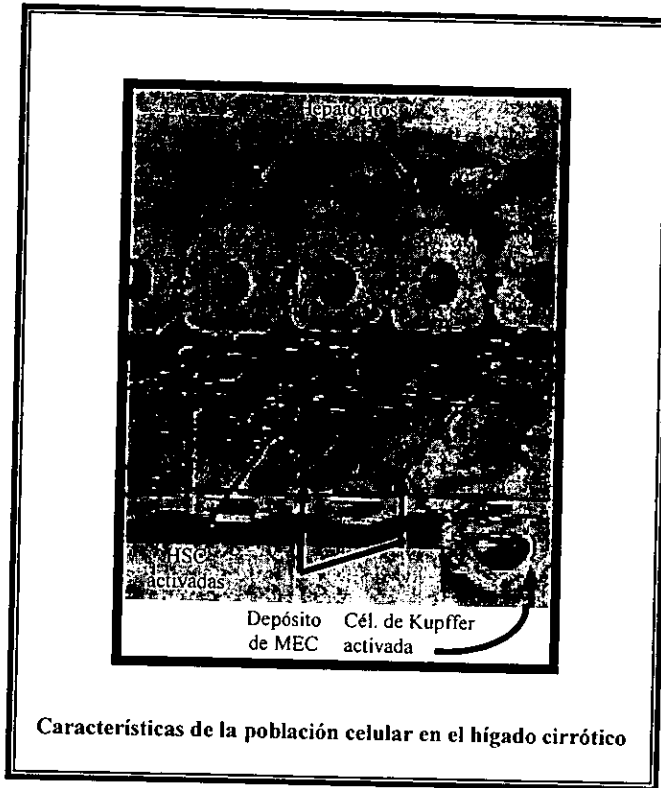
La visión del hígado como sistema bioecológico, también predice que alteraciones en el delicado equilibrio que mantiene la homeostasis de las células y los componentes de la MEC, pueden conducir tanto a la regeneración, y por ende restauración del órgano; como a cambios mórbidos en el hígado.

Así entonces, después de una lesión aguda, intensa o que destruya muchas células, la disminución de la capacidad funcional del hígado, las citocinas y factores de crecimiento inducirán la regeneración hepática. Esto implica la proliferación inicial de los hepatocitos, seguido por un incremento de las células no parenquimatosias; la producción de los componentes normales de la MEC en proporciones y distribución adecuadas. Al final del proceso regenerativo, el

depósito de componentes de la MEC volverá a niveles basales, así como también las interacciones y funciones celulares quedarán reestablecidas. (9,12)

Pero, si por el contrario el daño es pequeño, repetitivo y crónico, los intentos por restaurar la homeostasis serán insuficientes, conduciendo al órgano hacia la enfermedad (11). Explicado más ampliamente, la limitación de un daño tisular constante mediante su encapsulación, representa una respuesta altamente evolucionada de los tejidos adultos; y en esta reacción se activan procesos tales como la fibrogénesis y la remodelación tisular. Además del hígado, otros órganos como la piel, el pulmón, el corazón y el riñón (13) comparten esta capacidad. Particularmente en el hígado, la homeostasis no se mantiene durante el estímulo dañino sostenido, y cualquiera que sea la causa específica de la lesión hepática, la consecuencia final es una mayor cantidad en el contenido de componentes de la MEC.

Durante esta respuesta fibrogénica, en el tejido hepático se observa un aumento de tres a cinco veces en los componentes colagénicos y no colagénicos de la MEC, llegando a contener hasta seis veces más colágena y proteoglicanos que en el órgano sano. (14,15) Además, ocurre un desequilibrio en el tipo colágena depositada, cambiando la de tipo membrana basal (no fibrilar), por una de tipo intersticial (fibrilar), enriquecida en colágena I y III, y que adquiere una distribución distinta. (16-19) Dentro de los componentes no colagénicos, los incrementos involucran principalmente a proteoglicanos (20,21) y glucoproteínas como fibronectina, laminina y tenascina (22-24); conduciendo como resultado final a la alteración de la arquitectura normal y función del hígado, transformándole en un tejido fibrótico que rodea a nódulos de regeneración del perénquima que estructuralmente son anormales, asociándose a necrosis celular; y dando lugar a la condición patológica conocida como cirrosis. (3,25,26)



Características de la población celular en el hígado cirrótico

Básicamente, la respuesta fibrótica dentro del hígado es la misma independientemente del tipo de estímulo subyacente; que puede ser genético, metabólico, infeccioso, inmunológico, colestásico, inducido por alcohol u otros tóxicos. Por lo general, el daño tisular está presente durante meses o años antes de que se forme una fibrosis significativa, a excepción de las enfermedades hepáticas neonatales, en las se requieren pocas semanas de daño o colestásis para conducir a una fibrosis marcada. (13,27)

Los mecanismos que originan la cirrosis son variados, encontrando como características más o menos constantes las siguientes:

- a) Daño tisular que frecuentemente se debe a estrés oxidativo. (12)
- b) Movilización de células inflamatorias que liberan citocinas reguladoras de la respuesta, y que contribuyen a la activación y proliferación de las células efectoras (HSC). (28,29)
- c) Una vez activadas, las HSC incrementan la biosíntesis de colágena y también producen citocinas que amplifican la respuesta. (30) Además, es posible que las HSC nuevas reclutadas sean clones que difieren de las células en su tiempo de replicación, capacidad de síntesis de colágena, y respuesta a la estimulación por citocinas o factores de crecimiento. Es por ello que estas células pueden permanecer en el tejido, temporal o permanentemente, aún cuando el estímulo dañino haya desaparecido. (31)
- d) Un elemento importante es la liberación de colagenasas (MMP-2, MT₁-MMP, MMP-13) y su regulación por inhibidores específicos (TIMP-1 y TIMP-2), cuya interacción contribuye a los procesos de progresión y regresión de la fibrosis hepática, al inducir la remodelación de la MEC. (12,32)

Cabe señalar que aunque la inflamación asociada al daño tisular juega un papel importante en el desarrollo de la cirrosis; el proceso fibrogénico también puede activarse en ausencia de inflamación evidente. Esto es, mediante la alteración de la homeostasis, ya que varias poblaciones celulares hepáticas se ven dañadas, lo cual provoca un desequilibrio en las citocinas, factores de crecimiento, y metabolitos. De forma similar, la acumulación de metales como el hierro o el cobre pueden alterar el equilibrio ecológico, explicando así que enfermedades como la hemocromatosis y la enfermedad de Wilson puedan conducir a cirrosis en ausencia de daño hepatocelular evidente. (3)

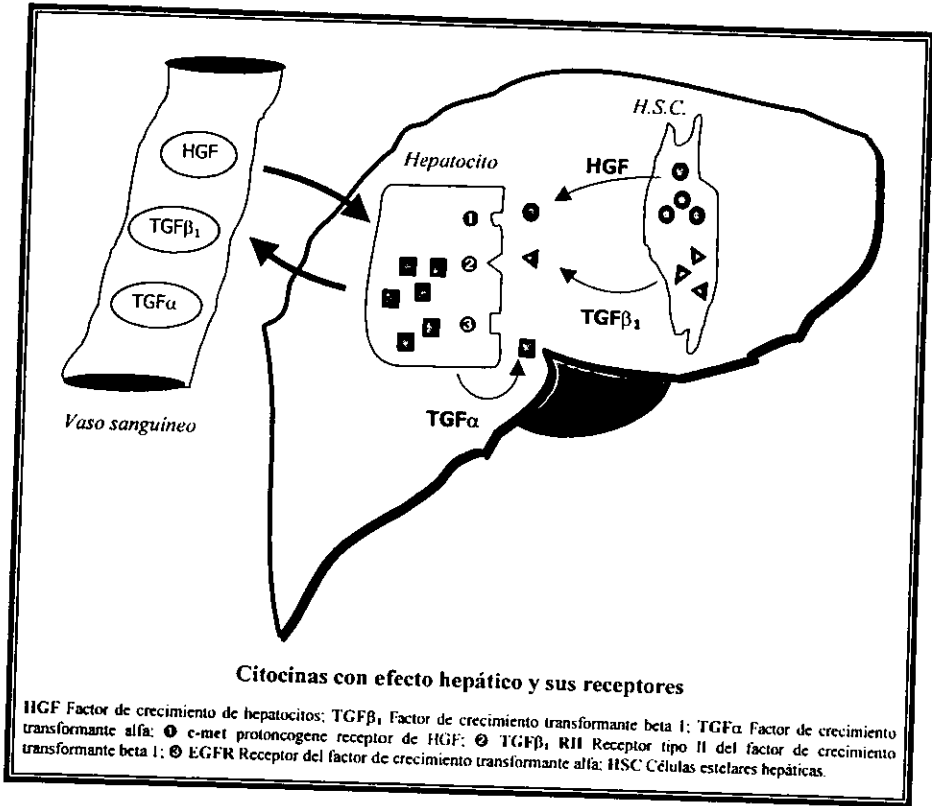
LAS CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

De acuerdo a lo anterior, cabe resaltar que las citocinas y los factores de crecimiento son elementos esenciales para los mecanismos de activación y modulación celular en la fibrogénesis del tejido hepático, y probablemente también en su reversión (19,27,33); por lo cual merecen especial atención. Pero antes es necesario hacer algunas consideraciones importantes respecto a estos mediadores. Primero, sus efectos son diversos y algunas veces complejos. Segundo, los efectos de ciertas citocinas están bien caracterizados en estudios *in vitro*; sin embargo, sus efectos *in vivo* que incluyen la interacción con otras citocinas y con la MEC, pueden ser difíciles de predecir. Y finalmente, tanto las fuentes celulares como los sitios blanco de las citocinas varían en la respuesta fibrogénica del hígado. (12)

Si bien son diversas las citocinas y factores de crecimiento hasta ahora conocidos, que mantienen la homeostasis en el sistema bioecológico hepático, participan en la fibrogénesis y su posible reversibilidad; solamente abordaremos las de mayor importancia en particular para este trabajo.

Como ya se ha mencionado, una parte importante del mecanismo fibrogénico incluye la activación de las HSC. En este marco, existen diversas citocinas que contribuyen a tal transformación. De forma parácrina, las plaquetas en el sitio de daño generan diversos mediadores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta 1 ($TGF\beta_1$), también producido por células de Kupffer (34); y el factor de crecimiento epidermoide (EGF). (35) Además, las HSC ya activadas actúan de forma parácrina y autócrina produciendo $TGF\beta_1$, PDGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$), factor activador de plaquetas, y endotelina 1 (ET-1) (33,36); así como factores quimiotácticos de células inflamatorias capaces de amplificar la

respuesta. (37-39) También se han identificado citocinas inmunomoduladoras producidas por las HSC, linfocitos y macrófagos, como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), interferón gama e IL-2 con funciones proinflamatorias; e interferón gama, IL-10 como citocinas antifibrogénicas. (40,41)



En detalle, $TGF\alpha$ pertenece a una familia de factores de crecimiento que activan al receptor de EGF (EGF-R). Entre sus actividades biológicas se cuentan la regulación de mecanismos de proliferación, migración y diferenciación de células

en cultivo; también ha sido implicado en procesos tales como cicatrización, regeneración hepática, angiogénesis, remodelación ósea, desarrollo y carcinogénesis. (42) En el hígado se comporta como un factor autócrino producido por hepatocitos (43), que regula la proliferación de estas células después de una lesión hepática. Aunque principalmente se ha descrito al inicio de la regeneración en el hígado, se ha sugerido que podría estar involucrado en la reparación de una lesión más crónica (44); y además, se han encontrado niveles elevados de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de $TGF\alpha$ en pacientes con cirrosis. (45)

Por otro lado, el $TGF\beta_1$ pertenece a una gran superfamilia de polipéptidos diméricos que actúan como factores de crecimiento y diferenciación. Hasta ahora se han logrado aislar cinco isoformas distintas de $TGF\beta$, de las cuales solo la I, II y III han sido encontradas en mamíferos. Además, se sabe que las isoformas I y III tienen un espectro de actividades biológicas muy similares, mientras que $TGF\beta_{II}$ muestra efectos más limitados y de menor potencia. (46) Esto puede asociarse al hecho de que las isoformas I y III se unen fuertemente al receptor de $TGF\beta$ tipo II ($TGF\beta_{RII}$), esencial para sus efectos celulares; y $TGF\beta_{III}$ lo hace con poca afinidad. (47) Entre sus actividades biológicas *in vitro* se encuentran la regulación de la proliferación predominantemente como inhibidor; la regulación bifuncional de la diferenciación celular, modulación del sistema inmune y la respuesta inflamatoria y la inducción de la apoptosis en algunos tipos celulares. (48,49) *In vivo*, pocas respuestas replican fielmente los efectos *in vitro*; sin embargo, se ha confirmado su importancia en procesos biológicos como la embriogénesis; angiogénesis, supresión de la inflamación; reparación tisular, cicatrización y comportamiento bimodal durante la carcinogénesis. (50)

Dentro del hígado es producido principalmente por las HSC, y secundariamente por las células de Kupffer, células endoteliales y hepatocitos. (12) Aquí, sus actividades incluyen la inhibición de la fase inicial de regeneración hepática (51) y la formación en general de MEC. Puede considerársele como un factor

remodelador profibrogénico que aumenta la producción de elementos de la MEC a través de varios mecanismos: estimulación de HSC y células endoteliales; disminución en la expresión de proteasas de MEC como el activador tisular del plasminógeno, el activador del plasminógeno tipo urocinasa y las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs); incremento de inhibidores de proteasas (inhibidores tisulares de MMPs [TIMPs], inhibidor del activador del plasminógeno y urocinasa); y finalmente la regulación de las interacciones de las células con la MEC. (33,52-54) Por todo lo anterior, existen varios estudios que resaltan la participación de este factor en el proceso de fibrosis/reversión del hígado cirrótico. (55)

Finalmente, HGF es un factor polipeptídico heterodimérico miembro de la familia reciente de factores de crecimiento relacionados con el plasminógeno, y se le considera un factor pleiotrópico capaz de evocar respuestas biológicas complejas como la mitogénesis, motogénesis y morfogénesis. (56) Ejerce sus actividades biológicas gracias a la interacción con su receptor membranal de alta afinidad, el proto-oncogen c-met; (57) y dentro de ellas se incluyen la estimulación de síntesis de DNA en varios tipos celulares, (58) y el gobierno de muchas interacciones epitelio-mesénquima, ya que es capaz de disociar las células epiteliales, aumentando su motilidad e invasividad dentro de la matriz extracelular. *In vitro*, induce la diseminación de células de carcinoma y promueve la progresión hacia un fenotipo maligno; e *in vivo*, promueve diferenciación celular y la formación de estructuras epiteliales, como los primordios de conductos biliares a partir de células embrionarias del hígado crecidas en matrices colagénicas. (59)

HGF es un factor paracrino producido principalmente por células no parenquimatosas del hígado, riñón y pulmón; mientras que las células blanco son parenquimatosas puesto que expresan altos niveles de receptor c-met. (60) Dentro de las actividades de HGF particularmente en el hígado lesionado (61), están la estimulación temprana de la regeneración hepática, la modulación de la respuesta durante la recuperación posterior a un daño crónico (44), disminución

del proceso fibrogénico, disminución de la apoptosis de hepatocitos, y la mejoría en general de la función del hígado cirrótico. (19,62,63)

EL MODELO

El estudio de los mecanismos que conducen a la fibrogenesis del tejido hepático y su reversión, se ha llevado a cabo utilizando varios modelos animales e *in vitro*. La fisiopatogenia es distinta en cada modelo; sin embargo, su utilidad radica en que todos ellos brindan información valiosa acerca de mecanismos específicos de dichos procesos.

El modelo de cirrosis inducida mediante la administración crónica de la hepatoxina tetracloruro de carbono (CCl₄) es quizá el mejor estudiado. Cuando se administra el tóxico intraperitonealmente durante 7 a 8 semanas (tres veces por semana), se observa una mortalidad de 20-30%, y la lesión es reversible en los 3 meses posteriores a la discontinuación; pero cuando se mantiene administrando de 8 a 10 semanas, la fibrosis del hígado es muy lentamente reversible y el animal muere con cirrosis. El daño hepático incluye lesiones que histológicamente semejan ampliamente los cambios en el hígado cirrótico del humano, (64,65) siendo notables aquellos cambios regenerativos que compiten con los fibrogénicos; la síntesis y el depósito de todas las colágenas se encuentra incrementada, predominando la colágena tipo I y secundariamente las de tipo III, IV y V. La actividad de colagenasa está incrementada en forma temprana; sin embargo, también lo está la producción de TIMPS. (32) Además se observa proliferación de células de Kupffer y HSC, las cuales muestran el fenotipo de "activadas". También se observan esteatosis, inflamación, necrosis hepática centrilobular, disfunción mitocondrial y cambios en el estado energético celular. (66)

El modelo de CCl₄ resulta útil, porque además las poblaciones celulares hepáticas producen varios factores que tienen propiedades quimiotácticas, son citocinas, factores de crecimiento, o modifican la expresión de varios genes que codifican para los componentes de la MEC. (11)

EFFECTO DE REVERSIÓN CON ADENOSINA

Por otro lado, se ha explorado el papel de la administración del nucleósido adenosina, como agente protector del hígado frente a varios tipos de lesiones; que incluyen el daño agudo inducido por estrés oxidativo, necrosis (67,68), etanol (69) y CCl₄ (70) Además se le reconocen diversos efectos benéficos sobre el hígado cirrótico, tales como la reducción del contenido de colágena recuperando los niveles normales. Dicho efecto es llevado a cabo mediante la disminución de la síntesis de colágena aunado al incremento de la actividad colagenolítica, cuyo equilibrio provoca una tendencia anti-fibrogénica. (92) Por otro lado, también se le reconocen efectos como el incremento en la respuesta regenerativa hepática, la disminución del estrés oxidativo, la preservación de la función mitocondrial, el metabolismo energético, y el aumento del flujo sanguíneo hepático; (65-67,71) lo cual se refleja en una mejoría morfológica-funcional del hígado y de la sobrevida en general. (67)

De acuerdo a lo anterior, es evidente que tanto la adenosina como ciertas citocinas comparten efectos biológicos comunes, que pueden participar en el mecanismo de reversión de la cirrosis; lo cual podría sugerir una posible relación entre el hepatoprotector y dichos mediadores celulares. Además, el mecanismo de la adenosina responsable de tal efecto en el hígado cirrótico todavía no es muy claro, por lo que resulta interesante investigar la influencia que pueda tener el

nucleósido sobre la expresión de estos mediadores, y su probable relación con la regresión de la cirrosis.

II. HIPÓTESIS

El mecanismo de reversión del hígado cirrótico mediante la administración de adenosina, incluye cambios en la expresión de citocinas como HGF, $TGF\alpha$ y $TGF\beta_1$; en el modelo de reversión con adenosina de la cirrosis inducida por CCl_4 en ratas.

III. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer el patrón de expresión de los genes HGF, $TGF\alpha$, $TGF\beta_1$, y sus respectivos receptores durante el efecto de la adenosina en la reversión de cirrosis, en el modelo animal de cirrosis inducida por CCl_4 .

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar el efecto de la reversión mediada por adenosina, sobre las alteraciones morfológicas y funcionales del hígado cirrótico.

nucleósido sobre la expresión de estos mediadores, y su probable relación con la regresión de la cirrosis.

II. HIPÓTESIS

El mecanismo de reversión del hígado cirrótico mediante la administración de adenosina, incluye cambios en la expresión de citocinas como HGF, TGF α y TGF β 1; en el modelo de reversión con adenosina de la cirrosis inducida por CCl₄ en ratas.

III. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer el patrón de expresión de los genes HGF, TGF α , TGF β 1, y sus respectivos receptores durante el efecto de la adenosina en la reversión de cirrosis, en el modelo animal de cirrosis inducida por CCl₄.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar el efecto de la reversión mediada por adenosina, sobre las alteraciones morfológicas y funcionales del hígado cirrótico.

- b) Conocer el patrón de expresión de las proteínas HGF, TGF α , y TGF β 1 en suero, y de sus respectivos receptores en hígado; tanto en condiciones de cirrosis en recuperación libre, como en el hígado cirrótico tratado con adenosina.
- c) Un objetivo adicional que fue planteado durante el desarrollo del presente trabajo, fué conocer el grado de expresión hepática de algunas enzimas encargadas de la degradación de matriz extracelular, así como la de sus inhibidores tisulares en el hígado cirrótico, con y sin tratamiento de adenosina.
- d) Determinar la posible relación entre el patrón de expresión de los genes HGF, TGF α , TGF β 1, y/o las enzimas que degradan matriz extracelular, con los efectos de la adenosina sobre el hígado cirrótico.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas del hígado incluyendo a la cirrosis, se ubican dentro de las cinco primeras causas de muerte en México; y hasta la fecha, se les considera en general como condiciones mórbidas irreversibles, ya que la mayoría de los abordajes terapéuticos utilizados han sido solo parcialmente suficientes.

Debido a ello, cobra gran importancia un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan el proceso dinámico de progresión - reversión de la cirrosis, tanto para el área de la salud, como para el terreno de la investigación biomédica. Para la primera, porque cualquier conocimiento nuevo representa un peldaño más en la escalera que conduce al diseño de estrategias terapéuticas más eficientes; ó

- b) Conocer el patrón de expresión de las proteínas HGF, TGF α , y TGF β 1 en suero, y de sus respectivos receptores en hígado; tanto en condiciones de cirrosis en recuperación libre, como en el hígado cirrótico tratado con adenosina.
- c) Un objetivo adicional que fue planteado durante el desarrollo del presente trabajo, fué conocer el grado de expresión hepática de algunas enzimas encargadas de la degradación de matriz extracelular; así como la de sus inhibidores tisulares en el hígado cirrótico, con y sin tratamiento de adenosina.
- d) Determinar la posible relación entre el patrón de expresión de los genes HGF, TGF α , TGF β 1, y/o las enzimas que degradan matriz extracelular, con los efectos de la adenosina sobre el hígado cirrótico.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas del hígado incluyendo a la cirrosis, se ubican dentro de las cinco primeras causas de muerte en México; y hasta la fecha, se les considera en general como condiciones mórbidas irreversibles, ya que la mayoría de los abordajes terapéuticos utilizados han sido solo parcialmente suficientes.

Debido a ello, cobra gran importancia un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan el proceso dinámico de progresión - reversión de la cirrosis, tanto para el área de la salud, como para el terreno de la investigación biomédica. Para la primera, porque cualquier conocimiento nuevo representa un peldaño más en la escalera que conduce al diseño de estrategias terapéuticas más eficientes; ó

manejos alternativos al trasplante hepático que tan solo en los Estados Unidos tiene un costo alrededor de \$500,000 dólares. (72)

Y para la investigación básica; estudiar la cirrosis y su reversión, entendidas como la respuesta de un sistema bioecológico ante diversos estímulos, reviste un profundo interés dada la amplia gama de mecanismos biológicos implicados, tales como regeneración, fibrogénesis, producción de factores de crecimiento y comunicación celular.

V. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Animales y Tratamiento

Se utilizaron ratas wistar macho de 90 a 100 gramos de peso con libre acceso a agua y alimento. El manejo de los animales se llevó a cabo bajo las recomendaciones del Manual de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los animales fueron divididos en 6 grupos de forma aleatoria, en base a las sustancias y tiempo de administración, como se muestra a continuación:

1. **Grupo control ó Solución Salina:** tratado con solución salina y aceite vegetal durante 10-20 semanas.
2. **Grupo control de Tetracloruro de Carbono (CCl₄ 0 sem) ó Tiempo Cero:** Tratado con CCl₄ durante 10 semanas (PERÍODO DE INDUCCIÓN DE LESIÓN HEPÁTICA TIPO CIRROSIS).

manejos alternativos al trasplante hepático que tan solo en los Estados Unidos tiene un costo alrededor de \$500,000 dólares. (72)

Y para la investigación básica; estudiar la cirrosis y su reversión, entendidas como la respuesta de un sistema bioecológico ante diversos estímulos, reviste un profundo interés dada la amplia gama de mecanismos biológicos implicados, tales como regeneración, fibrogénesis, producción de factores de crecimiento y comunicación celular.

V. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Animales y Tratamiento

Se utilizaron ratas wistar macho de 90 a 100 gramos de peso con libre acceso a agua y alimento. El manejo de los animales se llevó a cabo bajo las recomendaciones del Manual de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los animales fueron divididos en 6 grupos de forma aleatoria, en base a las sustancias y tiempo de administración, como se muestra a continuación:

1. **Grupo control ó Solución Salina:** tratado con solución salina y aceite vegetal durante 10-20 semanas.
2. **Grupo control de Tetracloruro de Carbono (CCl₄, 0 sem) ó Tiempo Cero:** Tratado con CCl₄ durante 10 semanas (PERÍODO DE INDUCCIÓN DE LESIÓN HEPÁTICA TIPO CIRROSIS).

3. **Grupo cirrosis + Solución Salina 5 semanas (Control 5 semanas):** Tratamiento de inducción de cirrosis y posteriormente se administró solución salina durante 5 semanas.
4. **Grupo cirrosis + Solución Salina 10 semanas (Control 10 semanas):** Inducción de cirrosis y después se administró solución salina durante 10 semanas.
5. **Grupo cirrosis + Adenosina 5 semanas (Tratamiento 5 semanas):** Una vez instalada la cirrosis, se administró adenosina durante 5 semanas.
TRATAMIENTO DE REVERSIÓN CORTO.
6. **Grupo cirrosis + Adenosina 10 semanas (Tratamiento 10 semanas):** Instalación de cirrosis y posteriormente se administró adenosina durante 10 semanas. **TRATAMIENTO DE REVERSIÓN LARGO.**

El CCl_4 fue inyectado por vía intraperitoneal (25 μl , diluido 1:6 en aceite vegetal) 3 veces por semana. También la adenosina (200 mg/kg de peso, pH 7.4) y la solución salina (Cloruro de Sodio 0.8%) fueron administradas por la misma vía y con la misma frecuencia.

Dos días después de la última inyección de cada tratamiento, los animales se dejaron en ayuno toda la noche, se pesaron y se anestesiaron con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (40 mg/kg). Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación para recolectar la sangre de los vasos sanguíneos del cuello; posteriormente se obtuvo el hígado y el bazo mediante procedimiento quirúrgico. El calendario de sacrificio fué a las diez, quince y veinte semanas dependiendo de cada grupo.

5.2 Manejo y Preparación de las Muestras Biológicas.

La sangre fue centrifugada a 800 g por 5 minutos para obtener el suero sanguíneo. El hígado y el bazo fueron pesados, y una pequeña porción del tejido hepático se fijó en solución amortiguadora (PBS pH 7.2) con formaldehído al 10%, incluidas en parafina y cortadas en secciones de 3 a 4 μm de grosor para su análisis histológico. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina & eosina, y tinción tricrómica de Masson. El resto del hígado se homogenizó en solución de lisis con inhibidores de proteasas, o bien fue conservado junto con el suero a -80°C para su análisis posterior.

5.3 Procedimientos Analíticos

5.3.1 Evaluación Histológica. Las preparaciones ya teñidas fueron analizadas mediante microscopía de luz.

5.3.2 Pruebas de Función Hepática. Se utilizó el suero de los animales para la determinación de las siguientes variables: albúmina, bilirrubina total, actividad de ALT (Alanino aminotransferasa), AST (Aspartato aminotransferasa) y GDH (Glutámico deshidrogenasa). La albúmina sérica y la bilirrubina total se determinaron mediante kits específicos para cada uno (Sigma Co.), y la actividad de las enzimas ALT, AST y deshidrogenasa glutámica se determinaron por medio de ensayos colorimétricos. (73-75)

5.3.3 Determinación de la expresión de proteínas. El análisis de la expresión de citocinas se realizó mediante la técnica de Western Blot. Brevemente, las proteínas fueron extraídas de los tejidos homogenizados y del suero. Se determinó la cantidad total de proteína en cada grupo mediante el método modificado de Lowry. (76) Algunas proteínas (TGF- α , TGF β_1 en suero; y TGF α , HGF en tejido hepático) fueron concentradas mediante inmunoprecipitación, la

cual se llevó a cabo mediante la incubación toda la noche a 4°C de 1 mg de proteína, con 15 µL de anticuerpo y ajustando a un volumen final de 1mL con TBS; posteriormente se incubó junto con 50 µL de proteína A agarosa, y después se realizaron centrifugaciones y lavados para obtener el botón de inmunoprecipitado.

Tanto las proteínas sin inmunoprecipitar como las inmunoprecipitadas, fueron normalizadas para la misma concentración, y sometidas a electroforesis en geles de acrilamida al 8%, 10% o 12% dependiendo del peso de la proteína a determinar. Las proteínas así separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y bloqueadas con solución TBS / leche baja en grasas 5%; y posteriormente fueron incubadas a 4°C toda la noche con sus respectivos anticuerpos primarios: anti-HGF, anti-c-met, anti-TGFβ₁, anti-TGFβ₁RII, anti-TGFα, anti-EGFR, anti-MMP2, anti-MT₁-MMP, anti-MMP-13, anti-TIMP-1, y anti-TIMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California). Posteriormente se lavaron abundantemente con TBS/Tween 0.1% para eliminar el exceso de anticuerpo; y se incubaron de 2 a 3 horas con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina o peroxidasa. Después de lavar la membrana de nuevo, se revelaron con los sustratos respectivos. La intensidad de la banda fue cuantificada mediante densitometría de imagen.

5.4 MANEJO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como promedio (de cinco animales por grupo) ± error estándar. Se realizó prueba T de student para determinar diferencias de promedios entre grupos. Un resultado se consideró como estadísticamente significativo cuando $p < 0.01$ y para algunas variables $p \leq 0.01$ ó $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1 PESO DEL HÍGADO Y EL BAZO.

Al término del periodo de inducción de cirrosis, el peso del hígado (determinado por el índice peso del órgano / peso corporal) fué 50% mayor en las ratas tratadas con CCl_4 comparado con el de los animales control. Durante las 5 y 10 semanas posteriores, se observó una disminución de la masa hepática de las ratas tratadas con solución salina y adenosina; sin embargo, este decremento fue más notable en los grupos tratados con adenosina (disminución a las 5 y 10 semanas de 23% y 17% en los grupos de solución salina; y 32% en los grupos tratados con adenosina). TABLA 1.

Así mismo, el bazo mostró un aumento de tamaño (21%) en el grupo de cirrosis tiempo cero. Y después de 5 y 10 semanas se observó una disminución en el tamaño del bazo en ambos grupos (disminución 5 / 10 semanas: grupos solución salina 19.7% / 32.5%; grupos adenosina 32% / 20.8%). TABLA 2.

6.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Después de 10 semanas de la administración de CCl_4 , se observaron cambios tisulares caracterizados por la aparición de septos fibrosos, necrosis e inflamación (cambios cirróticos). Los grupos control de reversión (administración de solución salina durante 5 ó 10 semanas posteriores a la instalación de cirrosis) mostraron estas mismas lesiones histológicas con una regresión espontánea muy

limitada; mientras que los grupos tratados con adenosina presentaron una mayor reversión, principalmente a las 10 semanas. (FIGURA 1)

6.3 PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA

Las pruebas de función hepática demostraron el daño tisular producido por el tóxico, así como la mejoría funcional lograda mediante la administración de adenosina.

ALBÚMINA

En los animales cirróticos tiempo cero, la albúmina plasmática disminuyó 37%. Los niveles de albúmina fueron recuperados en las semanas posteriores en ambos grupos; sin embargo, los grupos tratados con adenosina presentaron una recuperación más rápida. (incremento a las 5 y 10 semanas de 29% y 12.3% en los grupos de solución salina; 39% y 28.3% en los grupo de adenosina). TABLA 2A

BILIRRUBINA

Durante la inducción cirrótica, los niveles de bilirrubina sérica aumentaron 63%. La bilirrubina disminuyó durante las semanas posteriores en ambos grupos; pero los grupos tratados con adenosina presentaron disminuciones a niveles basales, mientras que los grupos tratados con solución salina permanecieron elevados a pesar de haber disminuido (disminución a las 5 y 10 semanas de 10.4% y 38.2% en los grupos de solución salina; 58% y 53.9% en los grupo de adenosina). TABLA 2A

ENZIMAS SÉRICAS.

Al finalizar el periodo de inducción de cirrosis, se incrementaron las actividades séricas de las enzimas amino-transferasa de aspartato (ALT), amino-transferasa de alanina (AST) y glutámico deshidrogenasa (GDH); reflejando la necrosis tisular subyacente (aumentos de 121%, 662%, 280%, respectivamente). Después de cinco semanas, esta actividad permaneció elevada o ligeramente disminuida en los grupos en que se administró solución salina (disminuciones de 1.8%, 7.4%, 44.8%, respectivamente) mientras que en los grupos tratados con adenosina se observó una clara disminución confirmando su efecto hepatoprotector (45.8%, 74.9%, 73%, respectivamente). Después de diez semanas se volvió a observar una disminución, que nuevamente favorecía (en menor grado) a los grupos tratados con adenosina. (grupos de solución salina: 42%, 55%, 48.9%; y grupos tratados con adenosina: 40%, 63.2%, 65.4%, respectivamente). TABLA 2B

EXPRESIÓN DE GENES

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Y SUS RECEPTORES.

Expresión de HGF en suero

Al finalizar el proceso cirrótico, el nivel de HGF se elevó discretamente en el suero de los animales cirróticos (28%). Después de cinco y diez semanas, continuó este ascenso tanto en los grupos cirróticos control como en los animales tratados con adenosina, observándose elevaciones mayores en este último grupo. (incrementos a las 5 y 10 semanas de recuperación: 38% y 91% en los grupos mantenidos con solución salina; 219% y 168% en los grupo de adenosina). TABLA 3; FIGURA 2

Expresión de HGF en homogenado de hígado

Los niveles hepáticos de HGF también aumentaron en los animales cirróticos. Sin embargo, después de la discontinuación de CCl_4 disminuyeron estos niveles; mientras que el tratamiento con adenosina produjo su elevación por arriba del control con cirrosis (incrementos de 13% y 24% a las 5 y 10 semanas de tratamiento con adenosina). TABLA 3; FIGURA 2

Expresión de c-met en homogenado de hígado

c-met aumentó en el hígado de los animales cirróticos. Posteriormente se observó otro aumento tras diez semanas de libre recuperación (25%). Mientras que los animales tratados con adenosina regresaron a niveles similares a aquellos del control sano. TABLA 3; FIGURA 2

Expresión de $\text{TGF}\beta_1$ en suero

Los animales cirróticos presentaron elevaciones importantes de $\text{TGF}\beta_1$ en suero (157% más que el control sano). No obstante, después de cinco y diez semanas de libre evolución se normalizaron, hasta alcanzar los niveles basales. Por otro lado, los animales tratados con adenosina mantuvieron las altas concentraciones de $\text{TGF}\beta_1$ en suero, encontrando niveles similares al control cirrótico. TABLA 4, FIGURA 3

Expresión de $\text{TGF}\beta_1$ en homogenado de hígado

En los hígados con cirrosis se observó un incremento de $\text{TGF}\beta_1$. Posteriormente, estos niveles continuaron elevándose durante la recuperación espontánea (incrementos de 15% y 18% a las 5 y 10 semanas respectivamente); mientras que la administración de adenosina indujo niveles semejantes al control sano a las 5 semanas. TABLA 4; FIGURA 3

Expresión de TGF β ₁ RII en homogenado de hígado

El receptor de TGF β ₁ aumentó su expresión hepática en los animales cirróticos (47%). Y continuó elevándose después de cinco semanas de libre recuperación, mientras que a las diez semanas presentó una disminución (11% menor que el control cirrótico). Durante el tratamiento con adenosina, la expresión del receptor de TGF β ₁ disminuyó a niveles parecidos a los del control sano. TABLA 4; FIGURA 3

Expresión de TGF α en suero

En los animales cirróticos TGF α se elevó en el suero más de dos veces. Después de cinco semanas de discontinuación del tóxico, los niveles permanecieron elevados, y a las diez semanas se volvieron a incrementar (41% más). Mientras que durante el tratamiento con adenosina, TGF α disminuyó en suero en ambos periodos de tratamiento, siendo mucho más notorio este decremento a las diez semanas (disminución a las 5 y 10 semanas de 46% y 89%, respectivamente). TABLA 5; FIGURA 4

Expresión de TGF α en homogenado de hígado

La presencia de esta citocina no pudo ser demostrada a través de la metodología empleada en el presente trabajo.

Expresión de EGFR en homogenado de hígado

Los niveles hepáticos del receptor de TGF α disminuyeron en los animales cirróticos (44%). Pero después de cinco semanas aumentaron, tanto en los hígados cirróticos controles como en los tratados con adenosina. Sin embargo, después de diez semanas disminuyeron drásticamente en ambos grupos de

estudio (solución salina y adenosina), retomando las concentraciones basales iniciales. TABLA 5; FIGURA 4

EXPRESIÓN DE ENZIMAS QUE DEGRADAN MATRIZ EXTRACELULAR.

Parte de la capacidad remodelativa de matriz extracelular se evaluó mediante la expresión hepática de enzimas encargadas de la degradación de matriz extracelular, así como la expresión de sus inhibidores tisulares.

MMP-2

La gelatinasa A ó MMP-2 se encontró disminuída (28.4% menos) en el grupo de cirrosis tiempo cero. Y después de suspender la administración de CCl₄, se observó una recuperación en los grupos de solución salina y adenosina. TABLA 6

MT₁-MMP

La expresión de colágenasa intersticial con dominio parecido a secuencia membranal no se modificó en los hígados cirróticos tiempo cero. Cinco semanas después de la discontinuación del hepatotóxico aumentó, y a las 10 semanas disminuyó aún por debajo del control no cirrótico. Mientras que en el grupo tratado con adenosina también aumentó a las 5 semanas, pero mantuvo su expresión similar a la del control no cirrótico al final de 10 semanas de administración de adenosina. TABLA 6

MMP-13

La colágenasa intersticial MMP-13 se elevó al final de la inducción de cirrosis. Después de cinco semanas no se observaron variaciones importantes en los grupos control ni de adenosina; sin embargo, a las diez semanas se observó un

aumento en el grupo de solución salina, que fue prevenido por la administración de adenosina. TABLA 6

TIMP-1

La expresión del inhibidor tisular de MMPs tipo 1 se encontró elevada (35%) en los hígados cirróticos tiempo cero. Cinco semanas después de suspender el CCl₄, TIMP-1 se elevó aún más (75%), y a las 10 semanas disminuyó hasta niveles semejantes al cirrótico tiempo cero. Mientras que la adenosina previno las elevaciones de TIMP-1 tanto a las cinco como a las diez semanas, manteniendo niveles similares al control sano. TABLA 6

TIMP-2

El inhibidor tisular de MMPs tipo 2 también se elevó (más del doble) en los hígados cirróticos de tiempo cero. Después de cinco semanas continuó su ascenso y a las 10 semanas disminuyó hasta niveles semejantes al cirrótico tiempo cero. La administración de adenosina durante 5 semanas no afectó el incremento de TIMP-2, pero a las diez semanas sí disminuyó estos niveles, observándose niveles similares al control sano. TABLA 6

VII. DISCUSIÓN

El entendimiento de la cirrosis ha progresado de forma sorprendente durante los últimos años, ubicando a quienes la estudian frente a un proceso dinámico que involucra varios niveles de organización biológica altamente regulados; que rebasan por mucho el viejo concepto del depósito aumentado de matriz extracelular en el hígado.

Dentro de los mecanismos que regulan el recambio de la matriz extracelular en este órgano, se cuentan la comunicación y coordinación entre las distintas células hepáticas, y los procesos de síntesis/degradación de proteínas de la matriz extracelular, de las cuales la colágena figura como elemento central. Todos ellos se hallan orquestados por un grupo de citocinas, factores de crecimiento y productos del metabolismo que representan verdaderos elementos de comunicación y activación entre células. (77)

Dada la importancia que tiene el conocer y descifrar esta forma de interacción celular, decidimos estudiar algunas citocinas clave en el desarrollo de la cirrosis. Para tal efecto, utilizamos un modelo animal que nos permitiera estudiar el comportamiento de estas proteínas en una cirrosis instalada que es incapaz de revertir o lo hace muy lentamente, debido a sus características intrínsecas (grupo de recuperación espontánea: administración de solución salina), y otro estado en el cual sí puede revertir (a través del tratamiento con adenosina). En el presente trabajo, exploramos la cirrosis y su reversión debido al interés del grupo en este terreno de la investigación, y decidimos escoger a las citocinas HGF, TGF α y TGF β_1 , ya que según la literatura, sus efectos hepáticos se asociaban de alguna manera a los observados al administrar adenosina, nucleósido que ha sido usado como inductor de prevención y reversión de cirrosis experimental en estudios previos por nuestro grupo. (66,67,70)

Así pues se sabe que la adenosina tiene varios efectos sobre el hígado cirrótico, que en su conjunto promueven la mejoría morfológica y funcional de este órgano. Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirmaron dichos efectos, de acuerdo a la evaluación de las siguientes variables:

Crecimiento del hígado y bazo post-intoxicación. Tradicionalmente se reconoce que el aumento de tamaño de estos órganos en el modelo, sugiere daño por intoxicación que puede acompañarse de hipertensión portal. Al final del periodo de inducción cirrótica con CCl_4 , el hígado y bazo aumentaron de tamaño, confirmando esta premisa. En los animales tratados con adenosina, el crecimiento hepático revirtió eficazmente retomando su peso normal; mientras que en los animales no tratados disminuyó discretamente el peso de dichos órganos, siendo esperable esta recuperación espontánea de acuerdo a las características del modelo. (64)

Características histológicas. La fibrosis, necrosis, inflamación y depósitos lipídicos observados en la cirrosis instalada (tiempo cero), fueron revertidos de forma significativa y en mayor proporción en los hígados cirróticos tratados con adenosina, principalmente a las diez semanas.

Funcionalidad Hepática: La función sintética del hígado (estudiada a través de la concentración plasmática de albúmina), y la función de metabolismo y eliminación hepática (evaluada por la concentración plasmática de bilirrubina) se vieron deterioradas en los hígados con cirrosis, mejorando al administrar adenosina; sin embargo, también fue evidente una recuperación importante en la función sintética del hígado cirrótico tras cinco semanas de libre evolución. Por otro lado, parte de la integridad tisular y de vías metabólicas (determinada por la liberación al plasma de enzimas citosólicas como ALT y AST, así como enzimas de localización mitocondrial como GDH), reflejan que la adenosina indujo una rápida recuperación ante el daño necrosante del CCl_4 .

Una vez confirmada la obtención del modelo experimental, los siguientes experimentos se planearon en relación a la expresión de citocinas o factores de crecimiento. Algunos resultados iniciales se habían obtenido en citocinas hepáticas, posteriormente se encontró una correlación con sus niveles de expresión en suero, por lo que se decidió explorar ambos ambientes. Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos, se formulan las siguientes consideraciones.

En un panorama general al término de la instalación de cirrosis, la producción del estímulo cirrogénico indujo el incremento de $TGF\beta_1$ en hígado y en suero, así como la sobreexpresión de su receptor hepático. Esta elevación simultánea, es muy probable que potencie el efecto de esta citocina implicada ampliamente en el desarrollo de un fenotipo cirrótico; lo cual explica las alteraciones morfológicas observadas en esta etapa, y también está de acuerdo con la mayoría de las publicaciones que abordan el tema de la cirrosis. (50,78-81) También en esta fase, se hizo evidente un incremento de $TGF\alpha$ en suero, lo cual está de acuerdo con las observaciones de que $TGF\alpha$ se encuentra elevado en el hígado y suero de animales cirróticos con procesos malignos (82-85); sin embargo, en nuestras muestras no hubo evidencia de carcinogénesis, aún en presencia de niveles elevados de $TGF\alpha$ en suero. Por otro lado, en términos de su efecto cirrogénico ó proliferativo el significado de esta elevación en suero es incierto, ya que la expresión hepática es baja, o por lo menos inferior al umbral de detección por inmunoblot en hígado (alrededor de 1 ng/gr), ya que no pudo ser observada incluso después de inmunoprecipitarla. Mientras que sí fue posible su detección en suero y en un control positivo de hígado (hígado en regeneración); descartando así una falla en la técnica utilizada. FIGURA 4 recuadro superior.

El siguiente estadio analizado, fue el periodo posterior a la discontinuación del CCl_4 , o periodo de libre recuperación. Aquí se observó un efecto bastante interesante en las citocinas, ya que HGF mostró una elevación paulatina en suero al mismo tiempo que redujo su concentración hepática. Mientras que $TGF\beta_1$ tuvo un comportamiento totalmente opuesto, disminuyendo en suero y manteniendo

niveles elevados en hígado. Esta expresión mutuamente coordinada, ya ha sido observada previamente en varios modelos de fibrosis *in vivo*. (19,86-88) Y existe evidencia de que este efecto de equilibrio recíproco está mediado por represión genética a nivel transcripcional. (88)

Al comparar estos datos con la expresión de receptores a las cinco semanas de recuperación, prevalece un efecto profibrogénico gracias a la elevación sostenida de $TGF\beta_1$ y su receptor en el hígado, lo cual concuerda con la morfología encontrada en esta etapa temprana. Mientras que a las diez semanas, el receptor $TGF\beta_1RII$ disminuye paralelamente al incremento de c-met, sugiriendo un estadio menos fibrogénico, que puede asociarse a la leve reversión espontánea que presentan los animales en esta etapa tardía de recuperación.

Cabe mencionar también que $TGF\alpha$ en suero y su receptor se encontraron elevados a las cinco semanas, disminuyendo a las diez semanas lo cual sugiere nuevamente su probable participación en el proceso.

No obstante que las citocinas hepáticas se consideran factores implicados directamente en la fisiopatología de la cirrosis, los resultados muestran que las citocinas plasmáticas también podrían participar indirectamente en dicho proceso. Esta noción se apoya en los siguientes hechos: (a) El comportamiento coordinado entre HGF y $TGF\beta_1$ también se observa en el suero, pero es inverso a su expresión hepática; esto es interesante, debido a que podría existir un tipo de regulación de tipo retroalimentación entre los niveles hepáticos y los sistémicos. Además, la concentración plasmática de estas citocinas depende parcialmente de la producción extrahepática de citocinas en órganos como pulmón y riñón, cuya participación no se puede excluir en el presente trabajo; (b) Diversos estudios sugieren que el comportamiento de las citocinas en suero refleja lo que ocurre en el hígado cirrótico (19,89); (c) Finalmente, la concentración de citocinas hepáticas depende tanto de las que son sintetizadas y secretadas por el hígado, como de las provenientes de la circulación; en cuyo caso la cantidad y composición de proteínas de la MEC podría jugar un papel importante, regulando la unión al tejido

hepático de estas citocinas, afectando de esta forma su biodisponibilidad. (56)

En general los datos de la etapa de libre recuperación, sugieren que el hígado cirrótico es incapaz de revertir como resultado de la suma de efectos de citocinas. En el hígado la tendencia es hacia la fibrogénesis (TGF β_1 y su receptor elevados lo cual inhibe la expresión de HGF); y en el suero la tendencia es hacia la proliferación, (HGF y TGF α elevados, TGF β_1 disminuido), lo cual podría relacionarse con los nódulos de regeneración observados en el hígado cirrótico.

El último estadio analizado correspondió al periodo de tratamiento con adenosina como inductor de reversión en animales cirróticos. La adenosina indujo la elevación de HGF en hígado junto con la disminución de TGF β_1 a las cinco semanas, mostrando de nuevo la regulación recíproca anteriormente descrita, pero en este caso a favor de HGF. En el suero, la adenosina incrementó en forma simultánea los niveles de HGF y mantuvo elevado a TGF β_1 . Los niveles elevados de ambas citocinas se asociaron con la disminución de sus receptores en el hígado, lo cual sugiere un tipo de regulación por disminución (down regulation) cuando aumenta el ligando en suero. (90) Sin embargo, esta regulación a la baja fue más notable para el receptor TGF β_1 RII.

La adenosina no modifica de forma importante las citocinas en animales sanos, al menos no se observaron cambios en HGF plasmático al tratar un grupo de animales control sanos con adenosina. Esto sugiere que su efecto se presenta sólo bajo condiciones de cirrosis. Probablemente, las condiciones que subyacen a la afección del hígado cirrótico, promuevan que tejidos hepáticos y extrahepáticos sean estimulados por adenosina aumentando la producción de HGF plasmático. Esto está apoyado por el hecho de que en estudios *in vivo*, se ha observado una mayor expresión de HGF durante el manejo terapéutico del hígado cirrótico. (44)

En el presente trabajo, la adenosina también disminuyó los niveles plasmáticos de TGF α , reforzando un posible papel fibrogénico. Por otra parte, el receptor de EGF

no se vio afectado por la adenosina. No obstante, cabe mencionar que mantuvo un comportamiento singular, caracterizado por su disminución en la cirrosis tiempo cero y aumentos durante la recuperación, observando los principales aumentos en fases tempranas de recuperación. Esto sugiere que $TGF\alpha$ en suero si varía de forma dependiente de adenosina pero su receptor muestra un comportamiento que puede participar en la recuperación pero de forma independientemente a la acción de la adenosina en este modelo.

Así entonces durante la administración de adenosina, la tendencia general es hacia la disminución de la fibrogénesis y regeneración (92) que correlaciona el patrón de citocinas: HGF elevada en hígado y suero, junto con la disminución de $TGF\beta_1$ y su receptor, probablemente también $TGF\alpha$. Los niveles elevados de HGF y $TGF\beta_1$ en el suero también es interesante, ya que es un comportamiento que también se ha descrito en regeneración hepática post-hepatectomía, y ha sido interpretado como un equilibrio de efectos en donde el aumento de factores proliferativos (como HGF y/o $TGF\alpha$) es seguido por niveles elevados de factores anti-proliferativos (como $TGF\beta_1$). (91)

Una vez caracterizadas estas citocinas, se consideró que ellas formaban parte de un conjunto de factores reguladores en el modelo. No obstante, pensamos que hacía falta una correlación más directa del modelo con factores efectores, que fueran responsables inmediatos de la morfología observada. De acuerdo a esta premisa, y con el objetivo de caracterizar más ampliamente la información respecto a la actividad colagenolítica, decidimos estudiar la presencia de proteínas encargadas de la degradación de matriz extracelular (MMPs), así como sus inhibidores tisulares (TIMPs) en el modelo.

Se encontró que al final de la inducción cirrótica, había niveles incrementados de MMP-13 y TIMPs junto con niveles bajos de MMP-2. Este patrón correlaciona con la actividad colagenolítica insuficiente del hígado cirrótico. Tras cinco semanas de libre recuperación MT_1 -MMP aumentó, mientras que MMP-13 y MMP-2 regresaron

a niveles basales. También se observó un incremento paralelo en la expresión de ambos TIMPs, y TIMP-2 permaneció elevado a las 10 semanas. Este comportamiento correlaciona con la actividad colagenolítica menos afectada pero todavía insuficiente que se observa en la recuperación. Finalmente, el tratamiento con adenosina a animales cirróticos, no modificó significativamente la expresión de MMPs (excepto MT₁-MMP a las 10 semanas), pero mantuvo los la expresión de TIMP-1 en niveles similares al control sano, y además normalizó el nivel de TIMP-2 al final del tratamiento de 10 semanas. Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad colagenolítica inducido por adenosina en el hígado cirrótico (92) correlaciona con el patrón de expresión de MMPs/TIMPs, principalmente por el efecto de la adenosina al disminuir los TIMPs.

CONCLUSIONES

En el modelo utilizado, se confirmaron datos previamente obtenidos de acuerdo a variables como tamaño del hígado, características histológica y pruebas funcionales.

En cuanto al patrón de expresión de citocinas en el hígado se comportó de la siguiente forma: en primer lugar, el grupo de cirrosis instalada se caracterizó un estado altamente fibrogénico representado por el incremento del $TGF\beta_1$ y su receptor hepático. En el segundo periodo, de libre recuperación prevaleció un estado pro-fibrogénico difícilmente reversible, favorecido por una coordinación recíproca en la expresión del $TGF\beta_1$ y HGF, junto con la expresión de sus respectivos receptores. Finalmente, durante el periodo de recuperación con adenosina, se promovió un estado anti-fibrogénico y regenerativo mediado por la elevación del HGF en el hígado cirrótico, junto con la disminución del $TGF\beta_1$, mostrando de nuevo esta regulación recíproca, pero en sentido inverso.

Por otro lado, en el suero se observaron patrones de expresión del HGF y $TGF\beta_1$ que siguieron un comportamiento también regulado, que además se asociaba a los cambios hepáticos de estas citocinas y sus receptores. Por lo tanto, no se puede excluir una posible participación de fuentes extrahepáticas de producción de citocinas, que influyan de manera endocrina sobre el hígado cirrótico, sumándose a los efectos autocrinos y paracrinos de las citocinas producidas por el hígado. Adicionalmente, se sugiere la posible participación de $TGF\alpha$; sin embargo, su confirmación requiere una mayor caracterización en el modelo.

Respecto a la expresión de MMPs y TIMPs, en los animales sin tratamiento los patrones encontrados correlacionaron con la actividad colagenolítica insuficiente del hígado cirrótico. Sin embargo, el aumento de la actividad colagenolítica que se ha observado en los animales tratados, correlacionó principalmente con el efecto de la adenosina al disminuir los TIMPs.

IX. REFERENCIAS

1. Hesiodo, Theogony. En: Hesiodo. The Homeric Hymns and Homeric. Traducción de Hugh G. Evelyn-White. Cambridge, MA., Harvard University Press; London, William Heinemann Ltd. 1914. Mitología Griega.
2. Diehl AM, Steer C. Liver Regeneration. Progress American Liver Foundation. http://www.liverfoundation.org/html/liv...iml3dox.forl/progres.dir/_progregeen.html
3. Rojkind M. and Greenwel P. Pathophysiology of liver fibrosis. En: McIntyre N, Benhamou J-P, Bircher J, Rizzeto M and Rodes J. Oxford Textbook of Clinical Hepatology. New York, Oxford Medical Publication. 1991;375-380.
4. Rappaport AM and Wanless IR. Physioanatomic Considerations. In: Schiff L, Schiff ER. Diseases of the Liver, seventh ed. Lippincott Company, Philadelphia, 1993.
5. Rojkind M, Ponce-Noyola P. The extracellular matrix of the liver. Collagen Rel Res. 1982;2:152-175.
6. Bioulac-Sage P, Le Bail B and Balabaud C. Liver and Biliary tract histology. En: McIntyre N, Benhamou J-P, Bircher J, Rizzeto M and Rodes J. Oxford Textbook of Clinical Hepatology. New York, Oxford Medical Publication. 1991;12-28.
7. Rescan PY, Loreal O, Hassell JR, et al. Distribution and origin of the basement membran component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture. Am J Pathol 1993;142:199-208.
8. Roskams T, Rosenbaum J, De Vos R, et al. Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver disease. Hepatology 1992;24:524-532.
9. Rojkind M, Rojkind M.H., Cordero-Hernandez J. In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regeneration rat livers. Collagen Rel Res 1983;3:335-347.
10. Rojkind M and Mourelle M. The liver as a Bioecological System: Modifications during Regeneration and Repair. In: Nimni ME. Collagen Vol. II. Ed. CRC Press Inc. Florida, 1988.
11. Rojkind M and Greenwel Patricia. Animal Models of Liver Fibrosis. Adv Vet Sci Comp Med 1993;37:333-335.
12. Rockey DC. Pathophysiology of Liver Disease. Clinics in Liver Disease 2000;4:1-36.)
13. Albanis E. And Friedman SL. Hepatic Fibrosis. Pathogenesis and Principles of Therapy. Clinics in Liver Disease. 2001;5:1-17.
14. Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. Gastroenterology 1979;76:710-719.

15. Gressner AM, Bachem MG. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: Role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1990;10:30-46.
16. Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanism of fibrogenesis – a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 1995;56:335-346.
17. Milani S, Herbst H, Schuppan D, et al. Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1990;137:59-70.
18. Rojkind M, Martinez-Palomo A. Increase in type I and type III collagens in human alcoholic liver cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;73:539-543.
19. Ukei T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226-230.
20. Gallai M, Kovalsky I, Knittel T, et al. Expression of extracellular matrix proteoglycans perlecan and decorin in carbon-tetrachloride-injured rat liver and in isolated liver cells. *Am J Pathol* 1996;148:1463-1471.
21. Meyer DH, Krull N, Dreher KL, et al. Biglycan and decorin gene expression in normal and fibrotic rat liver: Cellular localization and regulatory factors. *Hepatology* 1992;16:204-216.
22. Jezequel AM, Ballardini G, Mancini R, et al. Modulation of extracellular matrix components during dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. *J Hepatol* 1990;11:206-214.
23. Maher JJ, McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 1990;86:1641-1648.
24. Van Eyken P, Geerts A, De Bleser P, et al. Localization and cellular source of the extracellular matrix protein tenascin in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 1992;15:909-916.
25. Friedman SL. Molecular Regulation of hepatic fibrosis, and integrated cellular response to tissue injury. Minireview. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
26. Erlinger S. And Benhamou J-P. Cirrhosis: clinical aspects. En: McIntyre N, Benhamou J-P, Bircher J, Rizzeto M and Rodes J. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. New York, Oxford Medical Publication. 1991;380-390.
27. Llorente L, Richaud Y, Alcocer N. Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *Journal of Hepatology* 1997;24:555-563.
28. Wyler DJ, Stadecker MJ, Dinarello ChA., et al. Fibroblast Stimulation in Schistosomiasis. Egg granuloma macrophages spontaneously secrete a fibroblast stimulating factor. *J Immunol* 1984;132:3142-3148.
29. Wyler DJ, Wahl SM and Wahl LM. Hepatic fibrosis in schistosomiasis: egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor in vitro. *Science* 1978;202:438-440.

30. Hatahara T and Seyer JM. Isolation and characterization of a fibrogenic factor from CCl(4)-damaged rat liver. *Biochem Biophys Acta*. 1982;716:377-382.
31. Rojkind M and Mourelle M. The liver as a Bioecological System: Modifications during Regeneration and Repair. In: Nimni ME. *Collagen Vol. II*. Ed. CRC Press Inc. Florida, 1988.
32. Arthur MJP. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Phys Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-G249.
33. Friedman SL. Stellate cell activation in alcoholic fibrosis - an overview. *Alcoholism: clinical and experimental research* 1999;23:904-910.
34. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: Implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990;11:599-605.
35. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:618-633.
36. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-140.
37. Marra F, DeFranco R, Grappone C, et al. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: Correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998;152:423-430.
38. Marra F, Valente AJ, Pinzani M, et al. Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemoattractant protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 92:1674-1680, 1993.
39. Maher JJ, Lozier JS, Scott MK: Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo. *Am J Physiol* 1998;275:G847-853.
40. Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, et al. Interferon alfa and gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. *Hepatology* 1995;21:1003-1010.
41. Nelson D, Lauwers G, Lau J, et al. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C. A pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000;118:655-660.
42. Lee David. TGFa: A Member of the EGF Receptor Ligand Family. En: Leroith D, Bondy C. *Growth Factors and cytokines in health and disease* Jai Press Inc. Eds. Vol 1B, Greenwich, Connecticut, Estados Unidos 1996;277-318.
43. Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;25:911-916.
44. Aldana P, Goerke M, Carr S. et al. The expression of regenerative growth factors in chronic liver injury and repair. *Journal of Surgical Research* 1994;57:711-717.

45. Masuhara M, Yasunaga M, Tanigawa K, et al. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor α , and transforming growth factor β 1 messenger RNA in various human liver disease and correlation with hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1996;24:323-329.
46. Graycar JL, Miller DA, Arrick BA, Lyons RM, Moses HL and Derynck R. Human transforming growth factor b3: Recombinant expression, purification, and biological activities in comparison with transforming growth factors b1 and b3. *Mol endocrinol* 1989;3:1977-1986.
47. Massague J. Receptors for the TGFb family. *Cell* 1992;69:1067-1070.
48. Cui W and Akhurst RJ. Transforming Growth Factor Bs: Biochemistry and Biological Activities in vitro and in vivo. En: Leroith D, Bondy C. Growth Factors and cytokines in health and disease. Jai Press Inc. Eds. Vol 1B, Greenwich, Connecticut, Estados Unidos 1996;319-356.
49. Nakamura T, Tomita Y, Yamaoka K, et al. Inhibitory effect of transforming growth factor- β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;133:1042-1050.
50. Blobel GA, Schiemann WP and Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor b in Human Disease. *N Eng J Med* 2000;342:1350-1358.
51. Russell WE, Coffey RJ, Oullette AJ, et al. Type β transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5126-5130.
52. Overall CM. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;732:51-64.
53. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'shea M, Ward R, Atkinson S, O'connell J, Docherty A. Regulation of matrix metalloproteinases activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;732:31-41.
54. Heino J. and Massague J. Transforming growth factor beta switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 1989;36:21806-21811.
55. Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: A progress report. *J Gastroenterol* 1998;33:295-302.
56. Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 1998;8:404-410.
57. Comoglio PM. The Hepatocyte Growth Factor Receptor (Met): An unconventional transducer of mitogenic and motogenic signals En: Leroith D, Bondy C. Growth Factors and cytokines in health and disease. Jai Press Inc. Eds. Vol 1B, Greenwich, Connecticut, Estados Unidos 1996;277-318.

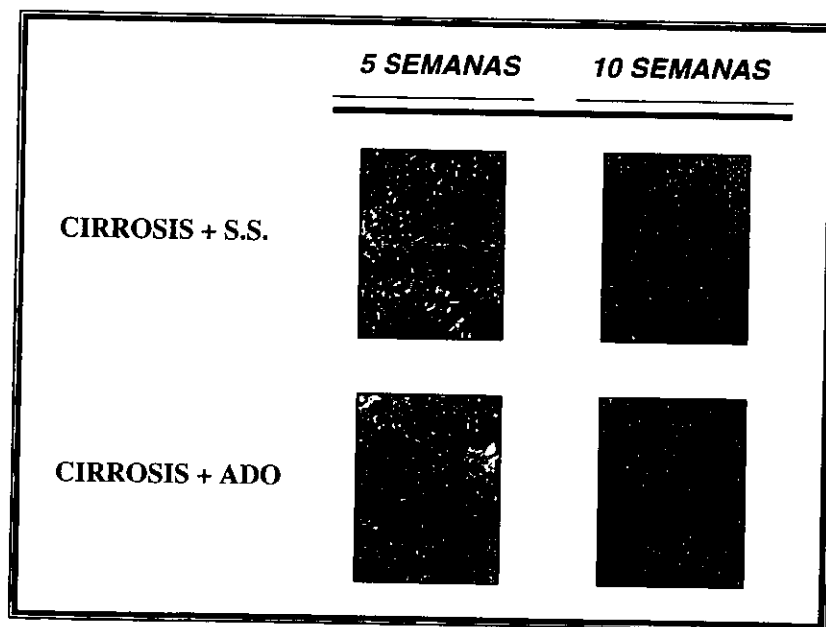
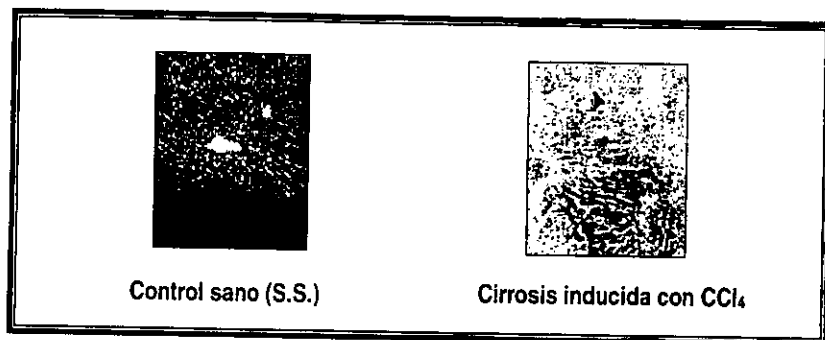
58. Rodríguez-Fragoso L. Papel fisiológico y fisiopatológico del factor de crecimiento del hepatocito. *Rev Invest Clin* 1998;50:355-367.
59. Medico E., Mongioni' AM, Huff J, Jelinex MA. The tyrosine kinase receptors Ron and Sea control "scattering" and morphogenesis of liver progenitor cells in vitro. *Mol Biol Cell* 1996;7:595-604.
60. Noji S, Tashiro K, Kojama E, Nohno T, Ohyama K, Taniguchi S and Nakamura T. Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers, as revealed by *in situ* hybridization. *Biochem Biophys Res Comm* 1990;173:42-47.
61. Shiota G, Jun-Ichi O, Hironaka K, Tomokazu K, Toshikazu N. Serum Hepatocyte Growth Factor Levels in Liver Diseases Clinical Implications. *Hepatology* 1995;21:106-112.
62. Yasuda Hisataka, Imai E, Shiota A., et al. Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1996;24:636-642.
63. Kaibori M, Kwon A, Nakagawa M. Stimulation of liver regeneration and function after partial hepatectomy in cirrhotic rats by continuous infusion of recombinant human HGF. *Journal of Hepatology* 1997;27:381-390.
64. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983;13:112-120.
65. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chagoya de Sánchez V. Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *BBA* 1994;1200:93-99.
66. Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, Yañez L, Vidrio S, Díaz-Muñoz M. Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. *J Biochem Toxicol* 1995;10:41-50.
67. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez J, and Chagoya de Sánchez V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 1990;12:242-248.
68. Hernandez MC, Walters W, et al. Effect of a 21-aminosteroid and/or adenosine in the ischemic rat liver. *Transplantation proceedings* 1991;23:2428-2429.
69. Hernández Muñoz, R., Santamaría A, García Sainz, JA, Piña E, and Chagoya de Sánchez. On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Arch Biochem Biophys* 1978;190:155-162.
70. Hernández Muñoz, R., Glender R, Díaz Muñoz, García Sainz, and Chagoya de Sánchez. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 1984;33:2599-2604.

71. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, and Chagoya de Sánchez V. Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Archives of Biochem Biophys* 1992;294:160-167.
72. <http://thriveonline.oxygen.com/medical/library/article/003006trt.html>
73. Rej Robert y Mogens Horder. Alanine Aminotransferase (Glutamate Pyruvate Transaminase) En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U. Ed.) Verlag Chemie, Deerfield Beach, Florida, Estados Unidos, p.p. 444-450, 1983.
74. Mogens Horder y Rej Robert. Aspartate Aminotransferase (Glutamate Oxaloacetate Transaminase) En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U. Ed.) Verlag Chemie, Deerfield Beach, Florida, Estados Unidos, p.p. 416-438, 1983
75. Werner Ellen y Friedrich. Glutamate Dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U. Ed.) Verlag Chemie, Deerfield Beach, Florida, Estados Unidos, p.p. 216, 1983.
76. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206-10).
77. Montgomery D. Hepatic fibrosis as wound repair: A progress report. *J Gastroenterol* 1998;33:295-302.
78. Sun MA, Wang BE, Annoni G, Degli Esposti S, Biempica L, Zern MA. Two rat models of hepatic fibrosis. A morphologic and molecular comparison. *Lab Invest* 1990;63:467-75.
79. De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997;26:886-893.
80. Luo R, Yang S, Xie J, Zhao Z, He Y, Yao J. Diagnostic value of five serum markers for liver fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2001;9:1481-50.
81. Saperstein LA, Jirtle RL, Farouk M, Thompson HJ, Chung KS, Meyers WC. Transforming growth factor-beta 1 and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression during intrahepatic bile duct hyperplasia and biliary fibrosis in the rat.
82. Harada K, Shiota G, Kawasaki H. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver* 1999;19:318-325.
83. Schmid RM, Kloppel G, Adler G, Wagner M. Acinar-ductal-carcinoma sequence in transforming growth factor-alpha transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* 1999;880:219-230.
84. Tomiya T, Fujiwara K. Serum transforming growth factor alpha level as a marker of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. *Cancer* 1996;77:1056-1060.

85. Tanaka S, Takenaka K, Matsumata T, Mori R, Sugimachi K. Hepatitis C virus replication is associated with expression of transforming growth factor-alpha and insulin-like growth factor-II in cirrhotic livers. *Dig Dis Sci* 1996;41:208-215.
86. Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000;57:937-948.
87. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2001;59:1304-1314.
88. Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwogler S, Meyer zum Buschenfelde KH. The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:739-742.
89. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N et al. Reduced plasma transforming growth factor-b1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-a therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 1999;30:1-7.
90. Alberts B. Transmisión de señales entre células. En Alberts B, Bray D, Lewis J et al. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición ed. Omega New York 1994. p. 826.
91. Fausto N, Laird AD and Webber EM. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:1527-1536.
92. Hernandez-Muñoz R, Diaz-Muñoz M, Suarez-Cuenca JA, Trejo-Solis C, Lopez V, Sanchez-Sevilla L, Yanez L, De Sanchez VC. Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001;34:677-687.

X. TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL HÍGADO



S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

TABLA 1. Peso del hígado y bazo.

GRUPO	HÍGADO		BAZO	
	Relación peso del órgano/peso corporal	Error estándar	Relación peso del órgano/peso corporal	Error estándar
<i>Solución Salina</i>	3.1	0.057	0.31	0.0124
<i>CCl₄ 0 semanas</i>	4.7*	0.088	0.37*	0.0098
<i>Cirrosis + S.S. 5 semanas</i>	3.6*	0.069	0.30	0.0103
<i>Cirrosis + S.S. 10 semanas</i>	3.9*	0.075	0.25*	0.0086
<i>Cirrosis + ADO 5 semanas</i>	3.2**	0.088	0.25* [§]	0.0114
<i>Cirrosis + ADO 10 semanas</i>	3.2	0.033	0.29 [§]	0.0150

S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

* p<0.01 contra el grupo control sano

** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.

§ p<0.05 contra el grupo de cirrosis + S.S.

TABLA 2A. Pruebas de función hepática.

GRUPO	ALBÚMINA [†]		BILIRRUBINA [†]	
	gr / dL	Error estándar	mg / dL	Error estándar
<i>Solución Salina</i>	3.5	0.098	0.8	0.063
<i>CCl₄ 0 semanas</i>	2.2*	0.039	2.3*	0.271
<i>Cirrosis + S.S. 5 semanas</i>	3.1	0.189	2.1*	0.210
<i>Cirrosis + S.S. 10 semanas</i>	2.5*	0.061	1.4*	0.144
<i>Cirrosis + ADO 5 semanas</i>	3.6**	0.119	1.0*	0.046
<i>Cirrosis + ADO 10 semanas</i>	3.1***	0.065	1.1***	0.127

gr/dL. gramos por decilitro; S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

[†] Concentración sérica.

* p<0.01 contra el grupo control sano

** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.

TABLA 2B. Pruebas de función hepática II.

GRUPO	TGP ¹		TGO ¹		GDH ¹	
	U / dL	Error estándar	U / dL	Error estándar	U / dL	Error estándar
<i>Solución Salina</i>	42	1.558	179	5.369	1.3	0.069
<i>CCl₄ 0 semanas</i>	324*	14.318	396*	33.544	4.8*	0.295
<i>Cirrosis + S.S. 5 semanas</i>	300*	13.045	389*	29.646	2.6	0.305
<i>Cirrosis + S.S. 10 semanas</i>	145*	11.316	229	15.707	2.0	0.178
<i>Cirrosis + ADO 5 semanas</i>	81**	9.295	215**	14.555	1.3**	0.242
<i>Cirrosis + ADO 10 semanas</i>	119***	8.717	237**	16.569	1.7*	0.092

U/dL unidades por decilitro; S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

¹ Actividad enzimática en suero.

* p<0.01 contra el grupo control sano

** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.

TABLA 3. Determinación de HGF/c-met en suero y homogenado hepático.

GRUPO	SUERO		HOMOGENADO HEPÁTICO			
	Promedio [‡]	Error estándar	Promedio [‡]	Error estándar	Promedio [‡]	Error estándar
<i>Solución Salina</i>	1.0	0.088	1.0	0.041	1.0	0.050
<i>CCl₄ 0 semanas</i>	1.3	0.152	1.1	0.044	1.3	0.088
<i>Cirrosis + S.S. 5 semanas</i>	1.8*	0.145	0.9	0.033	1.3	0.085
<i>Cirrosis + S.S. 10 semanas</i>	2.5	0.240	0.9	0.033	1.6*	0.115
<i>Cirrosis + ADO 5 semanas</i>	4.1***	0.233	1.2**	0.060	1.1**	0.072
<i>Cirrosis + ADO 10 semanas</i>	3.4***	0.266	1.4***	0.033	1.1**	0.095

HGF Factor de crecimiento de hepatocitos; S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

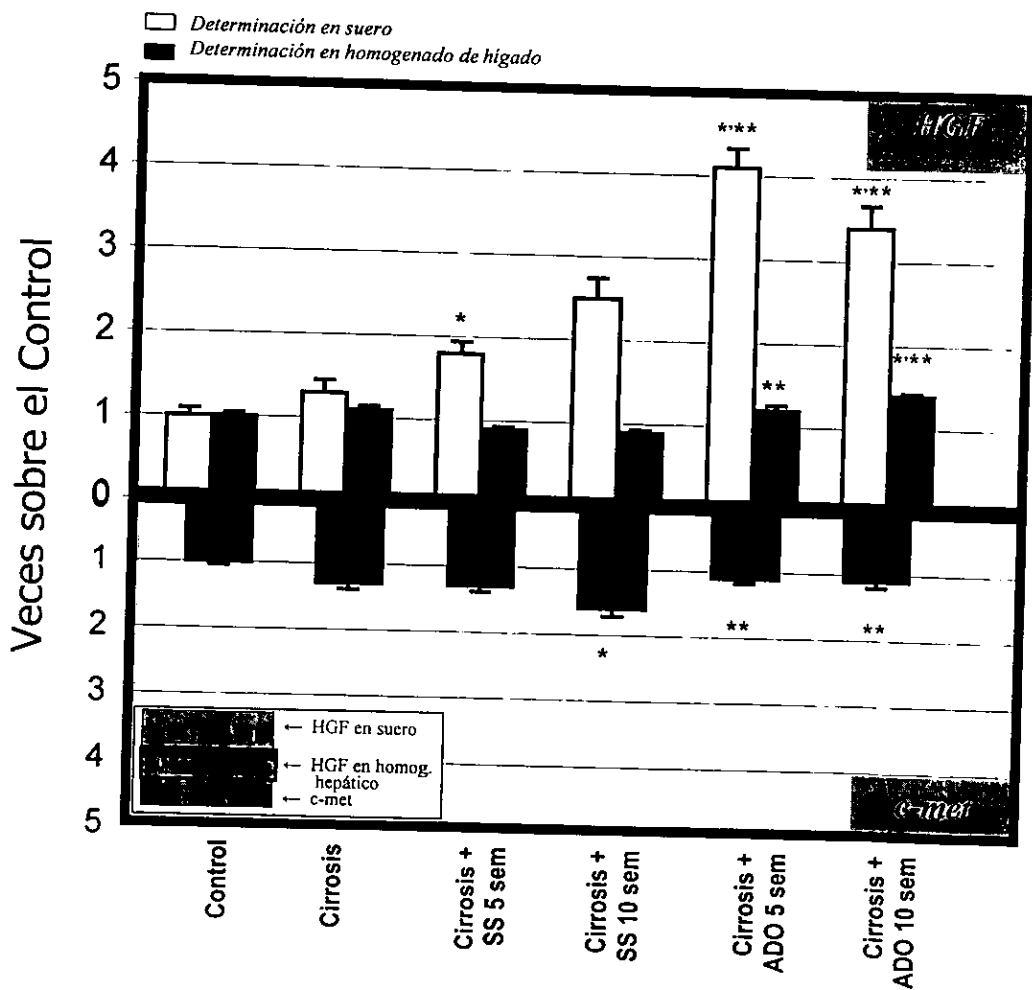
[‡]El promedio fue determinado a partir de unidades arbitrarias de densitometría, y se expresó como veces sobre el control, asignando al control el valor de 1.

* p<0.01 contra el grupo control sano

** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.

Figura 2. Determinación de HGF / c-met

Western blot de HGF/c-met en suero y homogenado hepático



HGF Factor de crecimiento de hepatocitos; S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina. El promedio fue determinado a partir de unidades arbitrarias de densitometría, y se expresó como veces sobre el control, asignando al control el valor de 1.

* p<0.01 contra el grupo control sano
 ** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.

TABLA 4. Determinación de TGF β_1 / TGF β_1 RII en suero y homogenado hepático.

GRUPO	SUERO		HOMOGENADO HEPÁTICO			
	Promedio [‡]	Error estándar	Promedio [‡]	Error estándar	Promedio [‡]	Error estándar
<i>Solución Salina</i>	1.0	0.065	1.0	0.075	1.0	0.057
<i>CCl₄ 0 semanas</i>	2.6*	0.145	1.3*	0.057	1.5*	0.088
<i>Cirrosis + S.S. 5 semanas</i>	0.8	0.044	1.5*	0.088	1.7*	0.115
<i>Cirrosis + S.S. 10 semanas</i>	0.8	0.083	1.6*	0.057	1.3*	0.060
<i>Cirrosis + ADO 5 semanas</i>	2.1***	0.098	0.9**	0.054	1.0**	0.088
<i>Cirrosis + ADO 10 semanas</i>	2.1***	0.115	1.5*	0.085	0.9**	0.076

TGF β_1 Factor de crecimiento transformante beta 1; TGF β_1 RII Receptor tipo II del factor de crecimiento transformante beta 1; S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

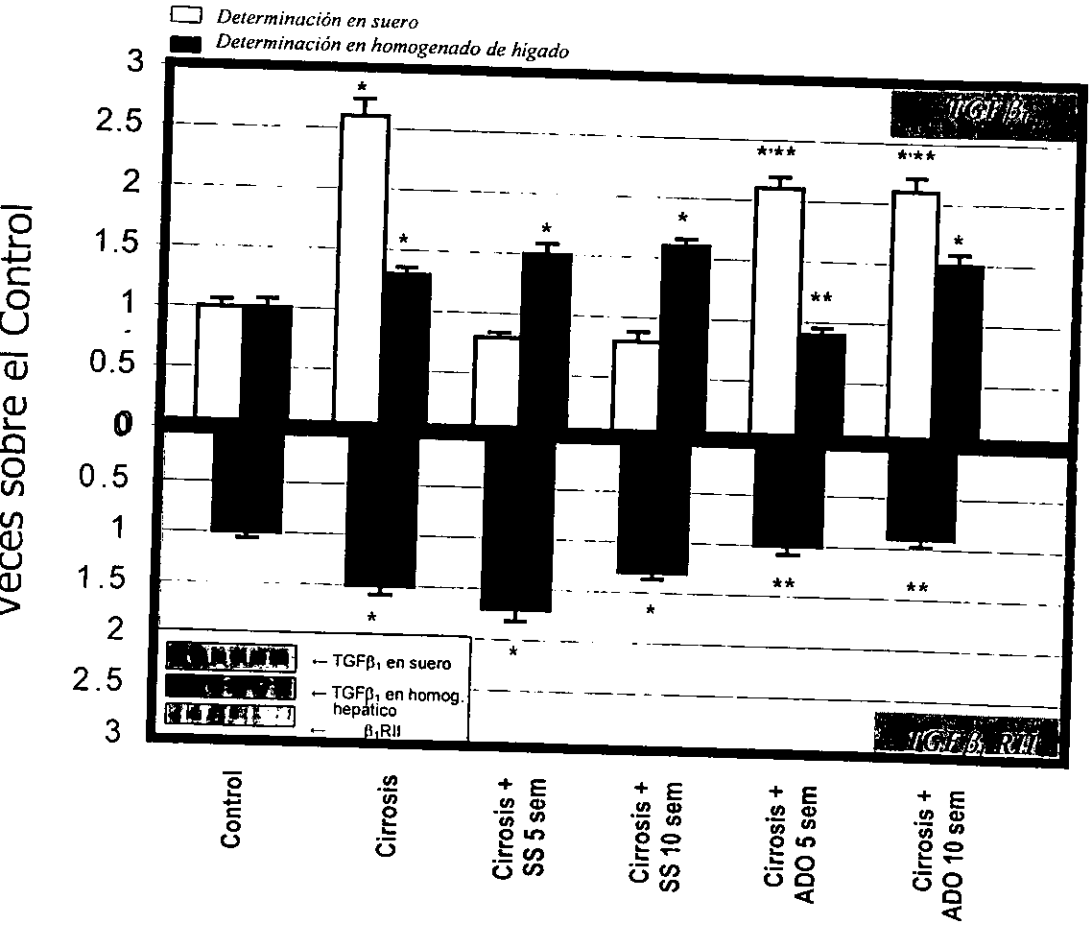
[‡] El promedio fue determinado a partir de unidades arbitrarias de densitometría, y se expresó como veces sobre el control, asignando al control el valor de 1.

* p<0.01 contra el grupo control sano

** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.

Figura 3. Determinación de $TGF\beta_1$ / $TGF\beta_1$ RII

Western blot de $TGF\beta_1$ / $TGF\beta_1$ RII en suero y homogenado hepático



$TGF\beta_1$, Factor de crecimiento transformante beta 1; $TGF\beta_1$ RII Receptor tipo II del factor de crecimiento transformante beta 1; S.S. Solución salina; CCI, Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.
 *El promedio fue determinado a partir de unidades arbitrarias de densitometría, y se expresó como veces sobre el control, asignando al control el valor de 1.

* $p < 0.01$ contra el grupo control sano
 ** $p < 0.01$ contra el grupo de cirrosis + S.S.

TABLA 5. Determinación de TGF α /EGFR en suero y homogenado hepático.

GRUPO	SUERO		HOMOGENADO HEPÁTICO	
	Promedio [†]	Error estándar	Promedio [†]	Error estándar
<i>Solución Salina</i>	1.0	0.060	1.0	0.111
<i>CCl₄ 0 semanas</i>	3.2*	0.202	0.5*	0.064
<i>Cirrosis + S.S. 5 semanas</i>	3.1*	0.230	1.8*	0.115
<i>Cirrosis + S.S. 10 semanas</i>	4.5*	0.317	1.0	0.058
<i>Cirrosis + ADO 5 semanas</i>	1.7**	0.173	1.6*	0.159
<i>Cirrosis + ADO 10 semanas</i>	0.3**	0.325	1.0	0.081

TGF α Factor de crecimiento transformante alfa; EGFR Receptor del factor de crecimiento transformante alfa; S.S. Solución salina; CCl₄ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

[†]El promedio fue determinado a partir de unidades arbitrarias de densitometría, y se expresó como veces sobre el control, asignando al control el valor de 1.

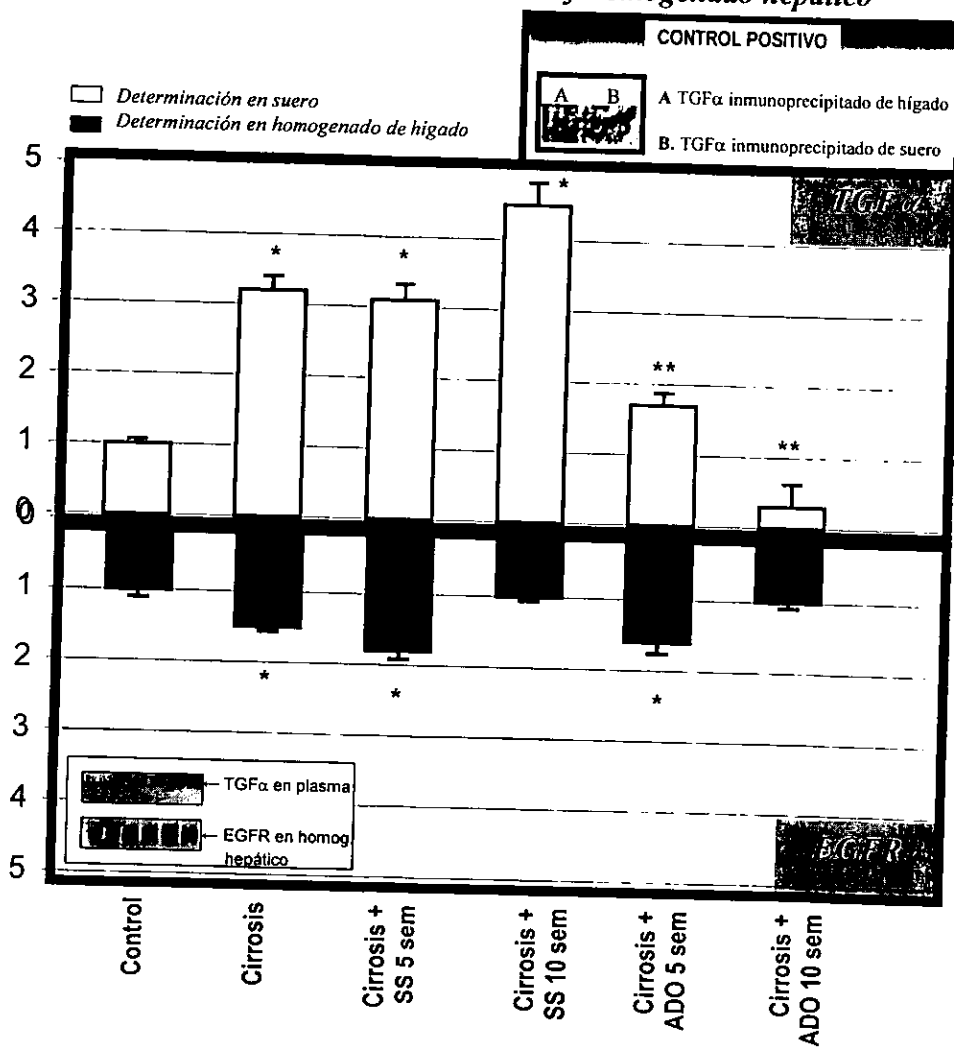
* p<0.01 contra el grupo control sano

** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.

Figura 4. Determinación de TGF α / EGFR

Western blot de TGF α /EGFR en suero y homogenado hepático

Veces sobre el Control



TGF α : Factor de crecimiento transformante alfa; EGFR Receptor del factor de crecimiento transformante alfa; S.S. Solución salina; CCl $_4$ Tetracloruro de carbono; ADO Adenosina.

*El promedio fue determinado a partir de unidades arbitrarias de densitometría, y se expresó como veces sobre el control, asignando al control el valor de 1.

* p<0.01 contra el grupo control sano

** p<0.01 contra el grupo de cirrosis + S.S.