



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M POSGRADO 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

EFEECTO DEL HEPATOPROTECTOR IFC-305 EN
LAS CÉLULAS DE KUPFFER EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE CIRROSIS
INDUCIDA POR CCl_4

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA

Tutor: DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS

MÉXICO, D. F.

FEBRERO/2012



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SAINZ

VOCAL: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

VOCAL: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

VOCAL: DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ

SECRETARIO: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, LABORATORIO 305-SUR

ASESOR DEL TEMA:

DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS

SUSTENTANTE:

QFB. REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA

Agradecimientos

Al ICyTDF por el apoyo económico brindado a través del proyecto 312/2009.

A la UNAM, Ciudad Universitaria, su capital humano y todos sus espacios.

Al Instituto de Fisiología Celular y todos los que han formado parte del laboratorio 305-Sur.

Gracias a Dios
Santiago 1:2-6

ÍNDICE

	Pág
RESUMEN	2
Abreviaturas	3
A. INTRODUCCIÓN	5
B. ANTECEDENTES GENERALES	7
C. Células de Kupffer	10
I. Características morfológicas e identificación	12
II. Características funcionales	17
III. Origen y cinética de las células Kupffer. El modelo de CCl ₄	23
IV. La respuesta inmune, la fibrogenia y la inflamación	26
V. Estrés oxidante y respuesta antioxidante y su asociación con las células de Kupffer	33
D. JUSTIFICACIÓN	40
E. HIPÓTESIS	43
F. OBJETIVO GENERAL	44
G. OBJETIVOS PARTICULARES	44
H. MATERIALES Y MÉTODOS	45
I. RESULTADOS	54
1. Histología	54
2. Citometría de flujo	58
3. Hígado. Actividades enzimáticas	64
4. Suero. Actividades enzimáticas	71
5. Suero. Citocinas	76
6. Suero. Adiponectina	80
J. RESUMEN DE RESULTADOS	82
K. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	83
L. PERSPECTIVAS	96
M. CONCLUSIONES	97
Referencias	99

RESUMEN

El fármaco IFC-305, una sal derivada de adenosina, ha mostrado ser eficaz en la reversión de la cirrosis inducida por CCl₄. Sin embargo es necesario profundizar en el mecanismo de acción de esta molécula. Los resultados del efecto de IFC-305 sobre diferentes células aisladas en cultivos primarios demuestran que en los hepatocitos inhibe la apoptosis¹, asimismo se ha observado la inhibición de la activación de las células estelares.²¹Dado que estos fenómenos están directamente relacionados con la activación de las células de Kupffer, el objetivo del presente trabajo es conocer si durante el proceso de reversión de la cirrosis con el fármaco IFC-305 existen cambios en la población de estas células y de que manera éstos se asocian a otros procesos de inmunomodulación y metabólicos. Se empleó un modelo ya caracterizado de cirrosis experimental inducida con CCl₄ en ratas Wistar y mediante la administración de dosis intraperitoneales de solución salina y del fármaco IFC-305 se compararon los efectos producidos a nivel de celularidad inmune y respuesta antioxidante durante el proceso de reversión. Como resultados el IFC-305 disminuye histológicamente los niveles de fibrosis y el infiltrado inflamatorio en comparación con el grupo de cirrosis denominado T0 y los tratados con solución salina. El tratamiento con IFC-305 disminuye la población CD11b+/CD163+ de células de Kupffer M1 proinflamatorias así como las concentraciones de citocinas séricas de IL-4, IL-12 e IL-6; promueve respuestas de las enzimas antioxidantes como GHSP y la SOD. El aumento en los niveles de adiponectina sérica y de la arginasa en homogenados de hígado tanto en la actividad enzimática como en los niveles de proteína a las 5 y 10 semanas de tratamiento, demuestran que el fármaco IFC-305 es capaz de promover la reversión de la cirrosis potencialmente a través de un cambio en el estado de activación de las células de Kupffer a un fenotipo antiinflamatorio o también denominado M2.

ABREVIATURAS

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 a de Mac-1) por macrófagos y monocitos y en menor proporción por granulocitos, NK, así como algunas estirpes de células dendríticas.

CD14: Receptor de naturaleza proteica-glicofosfatidilinositol anclado a la superficie de los monocitos y leucocitos polimorfonucleares. Funge como co-receptor al LPS (lipopolisacárido) 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 túbulo renales y glomérulo. También presente en el superficie de monocitos, neutrófilos, basófilos y linfocitos mayores.

COX-2: Ciclooxigenasa-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. De la familia de los receptores *scavenger*, involucrado en la endocitosis del complejo hemoglobina-haptoglobina y está disponible para determinar daño oxidativo en tejido inducido por hemólisis. Recientemente se ha involucrado como efector de las vías anti-inflamatorias y citoprotectoras en monocitos y macrófagos durante el metabolismo de hemoglobina, trascendentales en la cicatrización.

ERO: Especies reactivas de oxígeno

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

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, conjugado con FITC para citometría, 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 protéica involucradas en la cascada de señalización en la respuesta inmune innata.

IMH: 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 de macrófagos.

MTT: Ensayo de 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

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

SEC: Sinusoidal epithelial cells; células epiteliales del sinusoide

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

TGF: Transforming grow factor; factor de crecimiento transformante

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases; inihidor de metalloproteinasas.

TNF: Tumoral Necrosis Factor; factor de necrosis tumoral

UFT-4: Empleado para la caracterización de células Kupffer de rata, las células positivas a este anticuerpo se considera que en su mayoría son parte del sistema reticuloendotelial.

A. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la cirrosis y el cáncer hepatocelular representan problemas de salud nacional ya que ambos padecimientos tienen una elevada prevalencia y van en aumento. La Secretaria de Salud, en su informe del *Programa Nacional de Salud 2007-2012*, reporta datos de mortalidad para el año 2005; donde la cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado son la 3a. causa de muerte para los hombres, y la 7a. para las mujeres, con una elevación del 3% total de casos del país.³

A la par, se ha visto que el cáncer hepatocelular precedido por cirrosis representa 3.6% de cáncer a nivel mundial y la mortalidad por tumores hepáticos se elevó de 3,928 casos en 1998 a 5,098 en 2006.

En base a este incremento en el número de decesos, podemos deducir que hasta el momento no existe un tratamiento eficaz para éstas patologías, aunado a los altos costos que implican y la falta de diagnósticos tempranos. Sin embargo para el desarrollo de una nueva opción terapéutica, es indispensable comprender los mecanismos que desencadenan la patología y principalmente las opciones existentes, profundizando en las necesidades y metas reales de la investigación básica y clínica.

Cirrosis

Históricamente, el término cirrosis se le adjudica a Laennec, quien en 1819 en su *'Traité de l'Auscultation'* introdujo a través de las observaciones de granulación y neoformaciones, una condición patológica del hígado a la que llamó "kirros" (del griego

κίτρινος, que significa color amarillo rojizo) porque señala el color anormal del órgano en esta condición.

Para 1978, un grupo de trabajo de la OMS definió la cirrosis como *un proceso difuso caracterizado por la fibrosis y la conversión de la estructura normal del hígado en nódulos anormales*⁴. Aunado a esto existe una multiplicidad de signos clínicos como son la ascitis, hipertensión portal, encefalopatía, esplenomegalia y/o la formación de várices esofágicas.

Adicionalmente se han identificado diversas etiologías para este padecimiento⁵ cómo las que se muestran en la **Figura 1** a continuación:

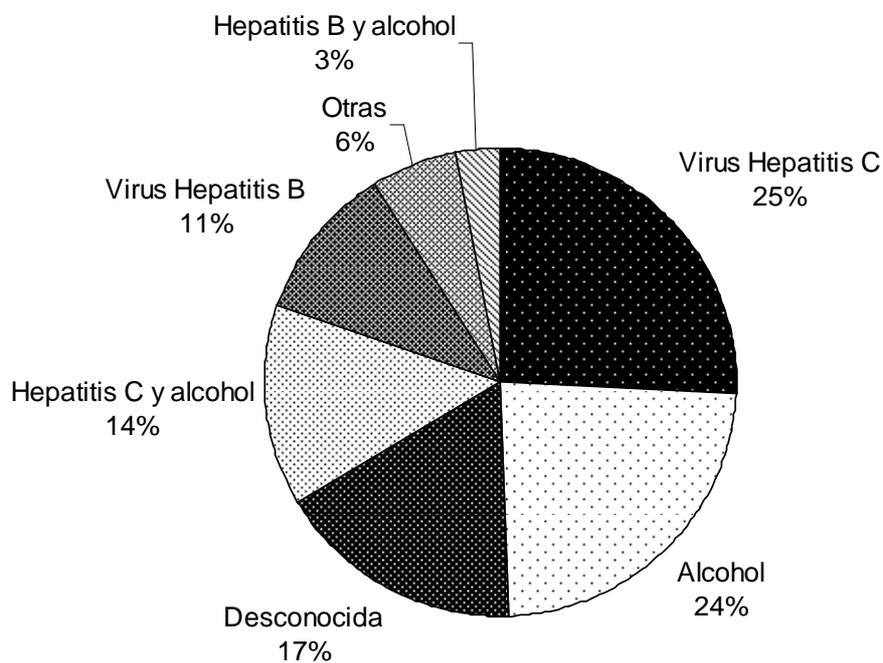


Figura 1. Causas primarias de enfermedad crónica hepática. (Modificado de la Fuente: Centers for Disease Control and Prevention, 2004)

Opciones terapéuticas actuales

Los pacientes con un estado avanzado de esta patología solamente tienen la opción del trasplante hepático, sin embargo la obtención de donadores es compleja y costosa y no es recomendable en todos los casos, además de que puede conllevar diversas complicaciones. En pocas palabras, esto muestra que las estrategias terapéuticas aún no son suficientes.

B. ANTECEDENTES GENERALES

El fármaco IFC-305 (PATENTE: MX 220780, **Figura 2**) es una molécula sintética que actualmente ha superado los protocolos de las fases clínicas I y II. Se propone que el núcleo activo de este compuesto corresponde a la fracción de nucleósido: adenosina. Esta molécula se encuentra presente en el humano de manera constitutiva en el organismo tanto en la región intra como extracelular a muy baja concentración en condiciones normales, debido a que su metabolismo es muy activo y su tiempo de vida media muy corto de tan sólo de 5 segundos. Sin embargo sus niveles se incrementan dramáticamente en condiciones de estrés metabólico.⁶

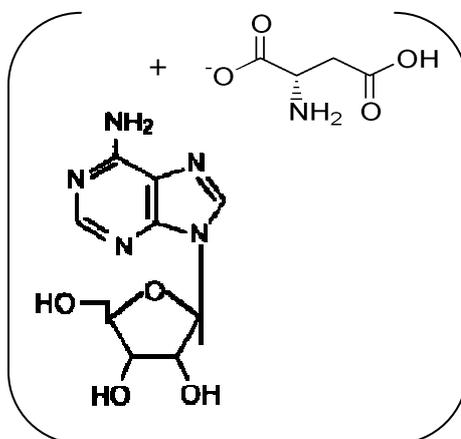


Figura 2. IFC-305. Aspartato de Adenosina.

El rol de la adenosina como molécula de señalización fue descrito por primera vez en 1929 por Drury y Szent-Györgyi⁷ tanto como un agente inotrópico negativo como vasodilatador coronario. Paulatinamente, el conocimiento de su papel como inmunomodulador⁸ está dando paso a nuevas perspectivas para esta molécula en el campo terapéutico.

Se ha propuesto que el aparato purinérgico podría representar el sensor ideal, proveyendo al sistema inmune información acerca del estado “de salud” del tejido.

Se conoce que la respuesta inmune tiene como finalidad conservar la homeostasis tisular aún después de una lesión, sin embargo las alteraciones en el control de la respuesta inflamatoria puede llevar a procesos crónicos tales como la pérdida de la arquitectura y la función hepática en la cirrosis.

En ese contexto, el efecto de la adenosina descrito para la mayor parte de las células del sistema inmune es dependiente de su receptor A2a con potente acción inmunosupresiva endógena, reportándose que las células endoteliales y neutrófilos son las principales responsables de liberar altas concentraciones de adenosina en el sitio de inflamación e infección⁹. 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 macrófagos, los cuales son responsables de la eliminación de células apoptóticas y detritos, así como, en conjunto con las células dendríticas son capaces de fagocitar y llevar a cabo la presentación de antígenos en el combate de microorganismos y otros agentes patógenos.

También se ha sugerido que la adenosina, en las etapas tardías de los procesos inflamatorios, contribuye a la resolución gracias a su efecto de inhibición de los macrófagos.¹⁰

Se conoce que la adenosina puede interaccionar con las células a través de 4 distintos receptores: A1, A2a, A2b y A3, que pueden activar la adenilato ciclasa o la fosfolipasa.

También puede ejercer su efecto por medio de transportadores o ser metabolizada exógenamente por nucleotidasas de membrana celular.

En los macrófagos existen 3 tipos de receptores para adenosina (A2a, A2b y A3). Estos receptores pertenecen a la familia de los 7TMR (Receptores de 7 pases transmembranales) acoplados a proteínas G. Estas proteínas G o GTPasas son las responsables de activar enzimas secundarias como la adenilato ciclasa incrementando el cAMP intracelular. Dicho cAMP señala para otros intermediarios como la enzima PKA (proteína cinasa A) que permiten la fosforilación de p38 y p42/44, los cuales a su vez se unen a regiones en determinados genes, dando como consecuencia una elevación en los niveles de IL-10 (citocina anti-inflamatoria) y VEGF así como la disminución en los niveles de TNF- α , NO y MIP-1alfa.¹¹

Tres de estas respuestas (aumento de IL-10, disminución de NO y TNF- α) se han observado a nivel de tejido hepático tras el tratamiento con IFC-305, dando paso a la propuesta del estudio a detalle del papel de las células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado) en este efecto.

C. CÉLULAS DE KUPFFER

El anatomista alemán Karl W. von Kupffer, fue pionero en la identificación de las células sinusoidales hepáticas. Las células Kupffer, que constituyen los macrófagos residentes en el hígado, fueron el primer tipo celular no parenquimal caracterizado del espacio sinusoide. En las siguientes páginas de este trabajo revisaremos más ampliamente cada uno de los aspectos más relevantes de estas células:

I. Características morfológicas e identificación:

Estas células representan el 15% de la población celular total del hígado, y constituyen entre el 80 y 90% de los macrófagos residentes. Como todos los macrófagos comparten propiedades particulares que permiten su diferenciación de otras estirpes celulares.

II. Características funcionales:

Constituyen uno de los tipos celulares hepáticos, en términos de metabolismo y función, más activos. Estos macrófagos son los principales productores en el hígado de citocinas, factores de crecimiento y mediadores biológicamente activos. Tienen la propiedad de ser células de alta plasticidad lo que les permite adquirir estadios diversos de activación.¹²

III. Origen y cinética de las células Kupffer. El modelo de CCl₄:

Existen 2 teorías respecto a su origen: una de ellas sugiere que proliferan de manera local; mientras que la segunda propone que son incapaces de dividirse y derivan de una célula madre de la médula ósea.¹³

Las células de Kupffer ejercen funciones vitales para el organismo tales como la eliminación de sustancias extrañas y la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria en el tejido hepático. Desempeñan también un papel fisiopatológico destacado en el daño hepático por endotoxinas o alcohol y en la patogénesis de la inflamación y fibrosis hepática, el cual se puede estudiar mediante el empleo del modelo de lesión hepática con CCl₄.

IV. La respuesta inmune, la fibrogenia y la inflamación:

La importancia de las células de Kupffer radica en que se ha demostrado que protegen el parénquima, controlan la regeneración de los hepatocitos, toman parte en la inmunidad antitumoral, participan en el metabolismo de lípidos, lipoproteínas, proteínas, aminas biogénicas y colágena.¹⁴ Así mismo, están asociadas a dos procesos que se encuentran relacionados con la cirrosis y que ya son objeto de estudio en nuestro grupo de investigación actualmente, uno de ellos es la activación del macrófago resultado de la apoptosis de los hepatocitos. El otro, es la consecuente activación de las células estelares (HSC), la deposición de matriz extracelular (MEC) y fibrosis.

V. Estrés oxidante y respuesta antioxidante y su asociación con las células de Kupffer:

Las células de Kupffer poseen 2 de las enzimas más trascendentales en procesos de estrés oxidante: la NADPH-oxidasa y la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS). La actividad de ambas está vinculada a un proceso de activación clásica del macrófago, que se ha observado durante el desarrollo de la cirrosis y se acompaña generalmente con el incremento en las ERO; esto lleva al desequilibrio del sistema oxidante/antioxidante del hígado.

Por otro lado la presencia de la arginasa y su asociación a la anti-inflamación adquiere relevancia ya que esta enzima es capaz de emplear el mismo sustrato de la iNOS, la arginina, y con ello inhibir su actividad, promoviendo una activación alternativa del macrófago.

Dado su papel tan relevante para la fisiopatología hepática, se desarrollan fármacos que tiene como célula diana a las células de Kupffer, como es el caso de inhibidores de la 5-LO (5-lipooxigenasa), los cuales tienen como propósito la inhibición de la ruta de biosíntesis de eicosanoides y por ende actuar como anti-inflamatorios y anti-fibróticos en el modelo de cirrosis inducida por CCl₄, esto fue observado por el grupo de investigación de la Dra. Titos.⁹ Además se ha posicionado recientemente a la regulación de los estados de activación de las células de Kupffer como uno de los blancos terapéuticos primordiales en un diseño racional de fármacos para el tratamiento de la cirrosis.¹⁵

I. Características morfológicas e identificación

Generalmente, las células de Kupffer se sitúan sobre las células endoteliales y emiten prolongaciones citoplasmáticas al espacio de Disse, subendotelial, lo que les permite estar en contacto directo con los hepatocitos y las HSC. La ultraestructura de las células de Kupffer en el hígado de la rata muestra un contorno irregular pero de forma básicamente estrellada.^{16, 17} Por su parte, la superficie celular presenta numerosos microvilli e invaginaciones en forma de líneas onduladas que parecen estar implicadas en la endocitosis.^{18, 19} El citoplasma es rico en diferentes vesículas intracitoplasmáticas, al tiempo que presenta mitocondrias, un aparato de Golgi extenso, abundante retículo

endoplasmático rugoso, y un conjunto de diferentes estructuras vacuolares y cuerpos densos que varían en forma, diámetro y densidad y que constituyen el desarrollado aparato lisosomal de la célula de Kupffer. Como parte de los componentes del citoesqueleto encontramos un sistema muy activo de microfilamentos y microtúbulos de actina y miosina, así como filamentos de vimentina, que permiten tanto el mantenimiento de la estructura celular y la migración celular.²⁰

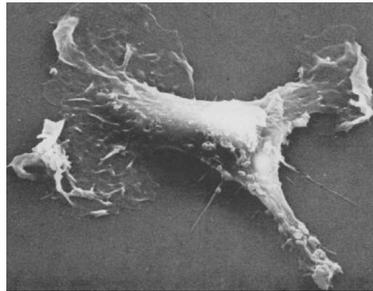


Figura 3. Microscopia electrónica de una célula Kupffer a las 24 horas in vitro (5400X).¹⁷

La identificación de las células de Kupffer se lleva a cabo habitualmente utilizando la combinación de diferentes métodos. Uno de los más sencillos es la tinción de Giemsa, ya que estas células presentan un citoplasma basofílico distintivo y el núcleo se encuentra localizado excéntricamente usualmente de forma oval o mellado.¹⁵ La siguiente Tabla (**Figura 4**), muestra una relación de características *in vitro* propias de los macrófagos y el comportamiento específico de las células Kupffer, tanto recién aisladas como a las 24 y 48 horas de cultivo.

	Kupffer		
	0 h	24 h	48 h
		%	
Esterase*	95.4	99.0	100.0
Peroxidase‡	0.0	0.0	0.0
Phagocytosis§	1.3	81.5	89.0
Pinocytosis	80.6	90.4	97.0
Fc Receptors¶	66.5	84.3	94.5
C Receptors	0.0	37.5	54.0
In vitro labeling**		0.8	0.8
Pulse labeling‡‡	1.0		

* Diffuse cytoplasmic staining; α -naphthyl butyrate as substrate.

‡ Located in granules; determined by the Kaplow method.

§ Ingestion of opsonized *Staphylococcus epidermidis* at 0 h determined in cell suspensions under slow rotation and at 24 and 48 h in macrophages attached to a glass surface.

|| Dextran sulphate.

¶ Cells with ingested erythrocytes and rosettes.

** Incubated in medium with 0.1 μ Ci/ml [³H]thymidine.

‡‡ 1 h after 1 μ Ci/g [³H]thymidine intravenously.

Figura 4. Tabla de características de los macrófagos Kupffer.¹³

En el hígado de rata, las técnicas más utilizadas para su identificación son la presencia de actividad peroxidasa endógena junto con la detección de la actividad fagocitaria mediante partículas de látex, oro coloidal o carbón.²⁰

La célula de Kupffer se distingue claramente de los monocitos circulantes por presentar la actividad peroxidasa localizada específicamente en el retículo endoplasmático y la membrana nuclear, mientras que en los monocitos su expresión sólo es a nivel lisosomal. Sin embargo, tanto la positividad para la peroxidasa como la actividad fagocitaria son criterios que deben utilizarse con precaución por varios motivos: en primer lugar, la técnica de la peroxidada es mucho más fiable y reproducible cuando se trata de preparaciones celulares. En segundo lugar, en el hígado de rata y según el método de fijación utilizado, las SEC también pueden presentar actividad peroxidasa. En humanos, hay discrepancia sobre la fiabilidad de la presencia de actividad de peroxidasa como marcador de las células de Kupffer.

La actividad de esterasa no específica, es una técnica muy utilizada en la identificación de estas células, pero necesariamente se ha de combinar con otros métodos para poder diferenciar a las células de Kupffer de macrófagos infiltrados en el hígado. Es por ello que también es posible diferenciar a las células Kupffer por medio de la actividad de G6PDH, ya que exhibe un incremento de 5-8 veces por encima de la de las células endoteliales.²¹²⁵

- Inmunohistoquímica

Quizá el método más fiable para su identificación es la inmunohistoquímica mediante el empleo de una batería de anticuerpos monoclonales para marcadores específicos. En el hígado de la rata, los anticuerpos más utilizados son el ED1 y el ED²²²⁶, los cuales reconocen, respectivamente, un antígeno de membrana lisosomal presente tanto en

macrófagos residentes como en circulantes y un antígeno de membrana específico de las células de Kupffer.²³²⁷ Alternativamente, existen otros anticuerpos capaces de detectar proteínas de expresión específica en células de Kupffer en el hígado de la rata, tales como el Ki-M2R²⁴²⁸, el UFT-4, el Ku-1 o el más recientemente caracterizado anti-KCA-3.²⁹²⁵ Para el estudio inmunohistoquímico de las células de Kupffer en humanos, se utilizan anticuerpos contra proteínas características de las células del sistema mononuclear fagocítico. Entre los diferentes anticuerpos policlonales y monoclonales, destacan aquellos que reconocen específicamente la lisozima y los anticuerpos contra KP1²⁶, Mac387, EBM11, CD68. Alternativamente, CD14 se ha empleado como marcador en la detección por inmunohistoquímica y se ha reportado su uso para la cuantificación por citometría de flujo o por el nivel de expresión del receptor con RT-PCR en muestras de origen humano.²⁷

- Citometría de flujo

Otra técnica de identificación es la citometría de flujo, la cual se basa en el reconocimiento de receptores específicos de membrana. Esta metodología no sólo permite su identificación, sino un análisis cuantitativo de cualquier población celular. En este sentido, CD11b es uno de los marcadores más comúnmente empleados en la identificación en general de macrófagos y HIS36 y/o CD163 (ED-2) fungen como marcadores específicos de células de Kupffer o macrófagos tisulares. Estos anticuerpos específicos generalmente están acoplados a un fluorocromo, el cual es excitado por láseres específicos y cuya fluorescencia es detectada y amplificada, de acuerdo a la longitud de onda de emisión (FITC para FL1, 510-520 nm, PE para FL2, 580 nm).

CD11b

Es el receptor proteínico de iC3 con un peso de 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 subunidad de MAC-1, medía las interacciones entre neutrófilos y monocitos con el endotelio estimulado, la fagocitosis de partículas cubiertas con iC3b, la diseminación o la quimiotaxis de leucocitos. Se le reconoce como la molécula de unión a ligando que se unen a C3b, ICAM-1, ICAM-2 y fibrinógeno.

CD11c

Es la cadena α de las integrinas X, $\alpha\beta 2$, CR4, con un peso de 145 kDa. Forma un dímero con CR4 al unirse con CD18. Se expresa en monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas. También funciona como subunidad del complejo con CD18 que es similar al complejo CD11b/CD18, con el que actúa de forma cooperativa; la forma de complejo CD11/CD18 es la que se encuentra principalmente en los macrófagos tisulares.

CD163

Es una glicoproteína monocaténaria tipo I (GH1/61) 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 endocitosis²⁸. Se ha descrito en humanos que este receptor, de tipo scavenger, contribuye tanto a la producción de citocinas pro como anti-inflamatorias con un papel importante en la inflamación y defensa a los agentes patógenos. En rata, este receptor se expresa en los

macrófagos tisulares y su contribución es proinflamatoria incrementando citocinas como IL-1, IL-6 y NO.²⁹

II. Características funcionales.

En condiciones fisiológicas, las células de Kupffer eliminan de la circulación sanguínea todo tipo de partículas extrañas, innecesarias o alteradas mediante el proceso de fagocitosis. 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, y que la presencia de un fenotipo M2, promueve la protección hepática en cirrosis alcohólica.³⁰ 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-anti-inflamatorio por la

vía de activación alternativa¹² cada uno contribuyendo con diferentes fenómenos de la respuesta inmune³¹, como se describe en la **Figura 5**.

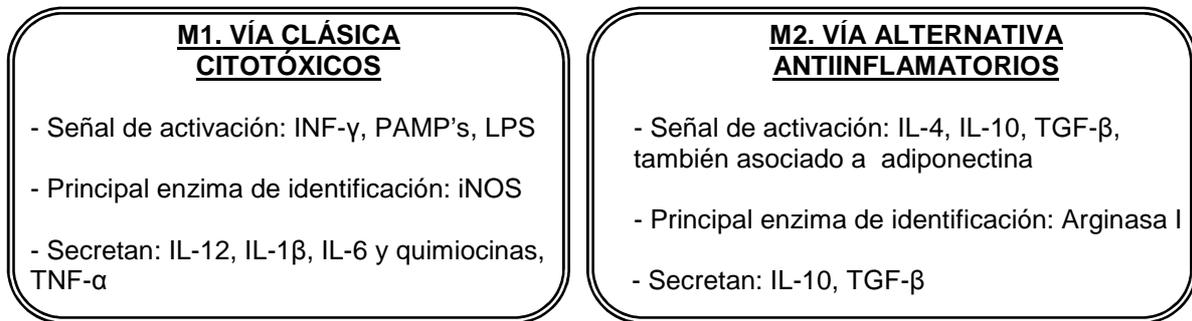


Figura 5. Comparación entre las dos vías de activación para macrófagos

Se ha descrito que la polarización a estos fenotipos, puede mediarse por la señalización dependiente de la adenosina¹¹ y reciente se ha confirmado que esto es dependiente de los receptores A2a y A2b³² para el fenotipo antiinflamatorio.

Los macrófagos de tipo M1, dependientes de la activación clásica, la cual consiste en la acción de citocinas del tipo I, como interferón- γ (INF- γ) o el factor de necrosis tumoral TNF- α o por el reconocimiento de PAMP's (patrones moleculares asociados a patógenos, por ejemplo: LPS, lipoproteínas, RNA de doble cadena, etc) por medio de los TLRs, exhiben una alta actividad microbicida y liberan varias citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-12), además de poseer actividad citotóxica y antiproliferativa, debida en parte a la liberación de especies reactivas oxígeno y óxido nítrico; cooperando con ello en el desarrollo del daño tisular.

En contraste, los macrófagos tipo M2 se activan por medio de rutas alternativas, en base a lo cual puede subdividirse en 3 tipos de respuestas: 1) M2a: activados por IL-4 ó IL-13; 2) M2b: activados por complejos inmunes en combinación con IL-1 o LPS; 3) M2c: activados por IL-10, o TGF. Estos últimos (M2c) están asociados a la respuesta de tipo Th2, liberando IL-10 e inhibiendo la proliferación las células T. Juegan un papel importante en la resolución de la inflamación vía la actividad fagocítica de los

neutrófilos en apoptosis, reduciendo la producción de citocinas proinflamatorias e incrementando la síntesis de mediadores importantes en la remodelación de tejido, angiogénesis, reparación y cicatrización. Uno de los marcadores que se han utilizado ampliamente para su identificación es el reconocimiento de la actividad de la enzima arginasa. Las principales características fenotípicas se enlistan 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		
	M2c		IL-10

Figura 6. Tabla comparativa de los principales fenotipos de activación de macrófagos M1/M2.³¹

Es de resaltar que es justo la plasticidad de éstas células para modificar su fenotipo a distintos tipos de activación, la que podría ser clave en la activación de procesos de reparación de tejido. A la par las células de Kupffer comparten características funcionales de todos los tipos de macrófagos.

1. Fagocitosis

La endocitosis en las células de Kupffer se puede llevar a cabo mediante 4 tipos de estructuras celulares: pseudópodos fagocíticos, vacuolas, vesículas de pinocitosis e

invaginaciones. La captación de partículas puede ser directa, aprovechando sus particularidades físicoquímicas, o bien mediada por receptores específicos. Las células de Kupffer expresan tanto receptores para Fc como para C3, de manera que se unen específicamente a los inmunocomplejos y los fagocitan. También son capaces de reconocer y fagocitar glicoproteínas o glicoconjugados de oro coloidal, carbón o albúmina sérica a través de receptores específicos para fucosa y galactosa. La fibronectina plasmática es una glicoproteína dimérica que también actúa como un potente agente opsonizante para facilitar la captación y la degradación de partículas extrañas por las células de Kupffer. Sin embargo, y a pesar de la existencia de sitios de unión en la membrana de las células de Kupffer, aún no se han caracterizado receptores específicos para esta proteína en estas células. Por otro lado, la endotoxina es reconocida por la molécula de membrana CD14 y se propone que constituye un intermediario de su interacción con las moléculas de TLR-2 y 4, que activan múltiples vías intracelulares de activación, dependientes de Myd88. El papel de CD14 parece particularmente importante toda vez que se ha observado un incremento en su expresión por efecto de tratamiento con alcohol.³³ Asimismo, esta molécula favorece la activación de macrófagos (vía clásica) o neutrófilos para la liberación de citocinas (TNF) y el incremento en las moléculas de adhesión. Por eso, este marcador se ha empleado para la identificación de esta población celular mediante las técnicas de citometría de flujo y PCR.³⁴

Activación por fagocitosis de hepatocitos apoptóticos.

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. 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 o el CCl₄. 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. En la **Figura 7** se describe brevemente la relación entre apoptosis y fibrosis. Aquí 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 por otro lado la liberación de Fas ligando que promueve la liberación de citocinas inflamatorias.

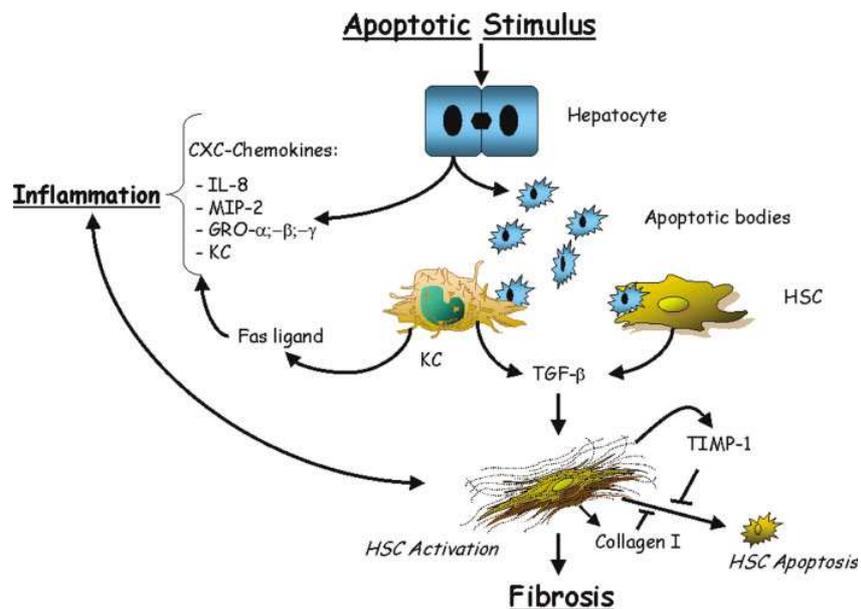


Figura 7. El esquema muestra la relación que existe entre la inducción de apoptosis en hepatocitos por un estímulo hepatotóxico, la activación de células de Kupffer y la consecuente activación de células estelares.³⁵

Sin embargo probablemente existe un segundo tipo de macrófagos involucrados, los M2c que exhiben este mismo comportamiento profibrótico, aunque se consideren

anti-inflamatorios, ya que su mecanismo de activación es distinto vía IL-10 y TGF- β , relacionándolos directamente con la respuesta inflamatoria crónica.

2. Liberación de factores de crecimiento y mediadores inflamatorios

Las células de Kupffer se activan por partículas fagocitadas y por la unión a través de receptores específicos de compuestos como ésteres de forbol, LPS, fragmento del complemento C5a, factores de crecimiento como GM-CSF o M-CSF, interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (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 , 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 , a la vez que suprime 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.

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 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.³⁷ 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.

III. Origen y cinética de las células Kupffer. El modelo de 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 la literatura, 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.³⁸ 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. 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.³⁹ En el caso concreto de la fibrosis inducida por CCl₄, la población de células de Kupffer triplica su número entre las 4 y las 8 semanas de tratamiento, dependiente de la concentración empleada de dicho hepatotóxico.¹⁹ En la **Figura 8** se muestra el comportamiento teórico de la población durante la inducción experimental de la cirrosis por CCl₄.

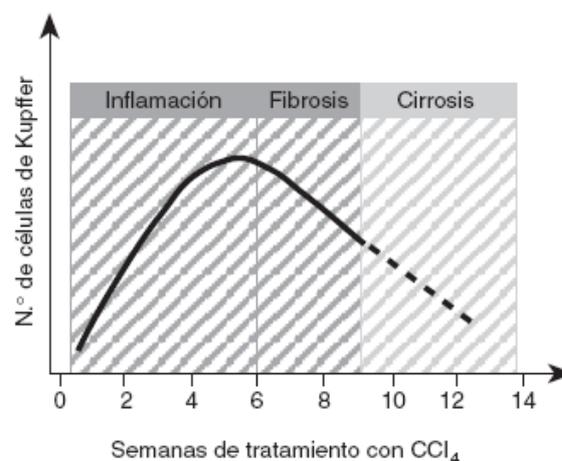


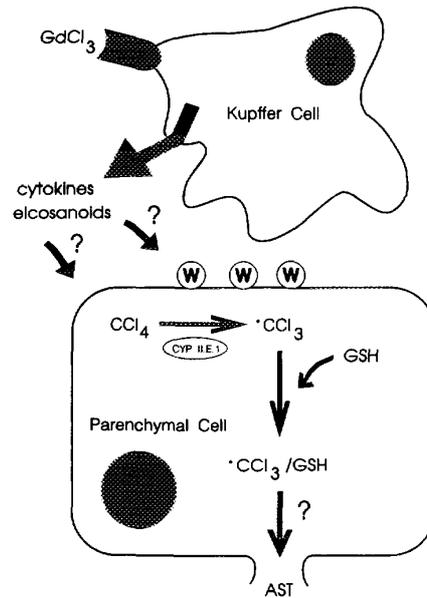
Figura 8. Gráfica de cinética de la población de células de Kupffer en el daño hepático por CCl₄.¹⁶

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 CCl₄, promoviendo la liberación de eicosanoides tóxicos y las citocinas por un mecanismo dependiente de calcio intracelular y de INF- γ .^{40, 41, 42} 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 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. Actualmente no se ha determinado 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. Por ejemplo, en las 6 h posteriores a la administración de CCl₄ se ha observado su aumento, alcanzando un máximo a las 72 h. Su papel clave en el desarrollo de la lesión hepática ha sido confirmada al inactivar o eliminar selectivamente esta población mediante el tratamiento con cloruro de gadolinio (GdCl₃) como se muestra en la **Figura 9**; 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 ligado invariablemente a los productos secretados por las células de Kupffer como las propias citocinas y los eicosanoides.⁴³

Figura. 9 Participación de las células de Kupffer en la toxicidad por CCl_4 .

El CCl_4 es metabolizado vía citocromo, para la formación del radical $\cdot\text{CCl}_3$ altamente reactivo el cuál interacciona rápidamente con células, proteínas y lípidos hepáticos, modificando su funcionalidad normal.



IV. La respuesta inmune, la fibrogenia y la inflamación.

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 ($\text{IL-1}\beta$, IL-2 , $\text{TNF-}\alpha$, 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 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, PDGF) que autoperpetúan el proceso inflamatorio.

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 sí 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.⁴⁴

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, 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 .⁴⁵ 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 siendo las principales productoras de MMP9 contribuyen mediante la degradación de la matriz extracelular subendotelial, la cual, como es sabido, mantiene a las HSC en su estado quiescente.⁴⁶ Las células de Kupffer activadas son las principales productoras de colagenasa tipo IV/gelatinasa tipo B con capacidad de digerir

esta matriz extracelular y por lo tanto de inducir la activación, proliferación y migración de las HSC.

La cirrosis como un proceso de inflamación crónica.

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 causante de la cirrosis. Estos virus poseen componentes en la pared celular que les permiten resistir la fagocitosis, tal es el caso del virus de hepatitis B y C, pero no es un mecanismo de evasión exclusivo o único.

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.⁴⁷

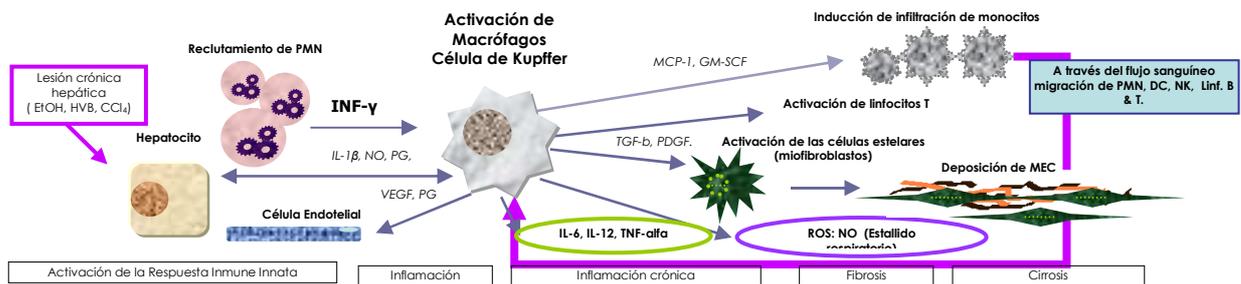


Figura 10. La cirrosis como un proceso de inflamación crónica.

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 HSC quiescentes y la producción de colágena. 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.

Por otro lado, se considera que las células de Kupffer también están 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.

Biomoléculas del proceso inmune.

INF- γ . Esta citocina va a ser producida y secretada sólo por las células T y NK, aunque esto va a depender del tipo de señales tisulares. Esta molécula posee diversas actividades pleiotrópicas que contribuyen a la reacción inflamatoria, entre las cuales se encuentra su capacidad para activar macrófagos. En su estado activado clásicamente, los macrófagos muestran un aumento de la expresión de moléculas como MHC II, mayor

actividad microbicida y secreción de citocinas. 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 circundantes.

TNF- α . En el modelo de CCl₄, se ha demostrado la participación de factores quimiotácticos tales como el TNF- α .⁴⁸ El TNF- α provee señales importantes para el reclutamiento de monocitos y fibroblastos en las etapas iniciales de lesiones hepáticas. El TNF- α del 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.⁴⁹ 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 reacción inflamatoria crónica.

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. 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, observándose además que el complejo IL-6-IL-6R puede activar a las células endoteliales para secretar IL-8 y MCP-1.⁵⁰

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.

Interleucinas.

IL-1 β . Esta interleucina es secretada de manera inmediata ante la presencia de daño en el tejido y depende su secreción de la activación del inflamosoma.⁵¹ La IL-1 β interacciona con 2 tipos de receptores y juega un papel esencial en las señales que derivan en la cirrosis.⁴⁵ 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.⁵² Junto con IL-6, la IL-1 β causa elevación de las proteínas hepáticas de fase aguda (por ejemplo: 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.⁵³

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.

IL-6. Su liberación está inducida por la IL-1 β y se incrementa en respuesta a TNF- α . Es una citocina con diversos efectos inflamatorios, aunque se han sugerido efecto anti-inflamatorios asociados con la activación de TGF-b o con procesos fibrogénicos de la cirrosis.⁵⁴ 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 directa con el curso de la enfermedad.⁵⁵

IL-10. Esta citocina es secretada principalmente por algunos subtipos de linfocitos T activados (Tregs, entre otras). 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 anti-inflamatorias y como ya se ha hecho mención, juega un papel trascendente en los cambios de fenotipos de activación de los macrófagos.

IL-12. Su principal fuente son los macrófagos y las células dendríticas y es un factor importante en la diferenciación de subpoblaciones Th₁ de células T cooperadoras. Así también, induce la producción de INF- γ en células T y NK, intensificando la actividad de éstas últimas. Se ha mostrado que por distintas vías de transducción de señales, se promueve la activación y la secreción de varias otras citocinas, así como por el efecto de la liberación de óxido nítrico (NO) en la propia señalización intracelular.

Adiponectina. Aunque genéricamente no está asociada al sistema inmune, estudios en los últimos 10 años han sugerido una activa interacción entre los componentes moleculares y celulares de la respuesta inmune y los adipocitos, que son las principales fuentes de adiponectina.⁵⁶ Recientemente se han mostrado cambios en los niveles séricos de las adipocitocinas leptina, resistina y adiponectina, en el modelo de lesión por etanol. Se reconoce que la adiponectina, además de su efecto en la homeostasis lipídica

en el hígado, posee un efecto anti-inflamatorio directo sobre la respuesta inmune como su acción en el metabolismo energético. Se ha observado que esta adipocina inhibe la producción de TNF- α y la capacidad fagocítica en las células de Kupffer, en el modelo de lesión hepática inducida por etanol. Para explicar este efecto se ha sugerido que las vías de activación NF- κ B y ERK1/2 estimuladas por LPS, son sensibles a los efectos inhibitorios de la adiponectina. De manera importante, el tratamiento con adiponectina sobre células de Kupffer sensibilizadas con LPS es capaz de normalizar el aumento de ERO y la expresión de TNF- α , por un mecanismo asociado con la secreción de IL-10.⁵⁷

V. Estrés oxidativo y su asociación con las células de Kupffer

Durante el proceso cirrótico se considera que existe un desequilibrio en los niveles de estrés principalmente a nivel mitocondrial, debido al incremento de las ERO y la degradación de los nucleótidos de adenina. Así es posible asociar tres fenómenos principales inducidos por la presencia del estrés apoptótico y derivados de las modificaciones en el sistema de GSH, en el caso particular del modelo de CCl₄:

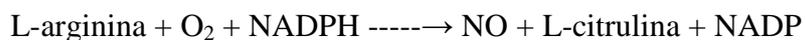
1. Activación de la iNOS de las células de Kupffer y endoteliales, lo que lleva al incremento en los niveles de NO.
2. Activación de NADPH-oxidasa y liberación de ión superóxido. Se sugiere que la activación de las células de Kupffer es la principal fuente de esta enzima que contribuye en el incremento tisular de radicales de oxígeno.
3. Formación de complejos con GSH y activación de citocromo P450 en el metabolismo de CCl₄.

Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) está relacionado con diversos mecanismos que dependen de la enzima que lo esté produciendo entre los cuales, ejerce control de flujo sanguíneo del hígado, al modular el tono vascular. Se sugiere que este efecto se genera a través del cGMP que desencadena una cascada de eventos que llevan a la modulación del tono muscular, por acción de la eNOS.⁵⁸

Sin embargo, el ·NO puede llevar a daño tisular e incluso a apoptosis; ya sea por una acción relajadora a nivel de células estelares o participación en la adhesión de los neutrófilos al endotelio y en la agregación plaquetaria. Asimismo, se ha sugerido que la formación del peroxinitrito (ONOO⁻) induce la liberación de la IL-1β y de otras citocinas proinflamatorias *in vivo*, en los hepatocitos. Además se ha mostrado que los niveles de NO tienen efectos en la regulación de síntesis de algunos transportadores del hígado en rata.^{59, 60}

Por otro lado, mediante un mecanismo de activación clásica, los macrófagos adquieren la capacidad de expresar en altas concentraciones la iNOS (sintetasa de óxido nítrico inducible) una enzima que oxida la L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico (NO), según la reacción:



El óxido nítrico tiene potente actividad antimicrobiana y puede combinarse con superóxido para propiciar la secreción de otras sustancias microbicidas, lo que explica la gran capacidad de los macrófagos para contener las infecciones bacterianas. Pero al mismo tiempo una acumulación de esta molécula favorecerá por el propio efecto citotóxico a la lesión tisular.

Arginasa

Esta enzima es importante para la fisiología hepática porque es exclusiva de este tejido; favoreciendo la transformación de la arginina a urea en el denominado ciclo de la urea. Durante la cirrosis se ha observado la alteración de algunas de las enzimas de este ciclo como la carbamil-fosfato-sintetasa, lo que contribuye al desequilibrio sistémico por acumulación de amonio.

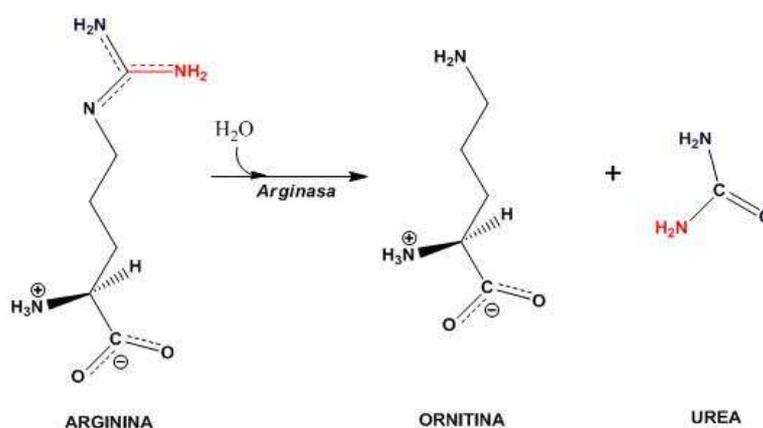


Figura. 11. Reacción catalizada por la arginasa dentro del ciclo de la urea⁶¹

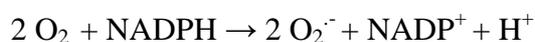
Existe una competencia con la iNOS por el sustrato: arginina, por lo que el hecho de que alguna de las dos se active permitirá que la otra enzima se inhiba.

Se ha determinado que esta enzima está asociada directamente al fenotipo de activación alternativa de los macrófagos y que su presencia se puede vincular con la disminución de NO, la secreción de citocinas como IL-4 ó IL-10 y la anti-inflamación.^{62,63}

NADPH-oxidasa

La actividad de la NADPH-oxidasa fagocítica constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno en el organismo. Durante la activación leucocitaria, se conforma el sistema enzimático activo. Los leucocitos

polimorfonucleares (PMN) humanos son movilizados a los sitios de inflamación donde destruyen a los agentes invasores por medio de la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y enzimas proteolíticas. Sin embargo, las ERO liberadas por los PMN pueden también provocar daño a los tejidos vecinos como se ha descrito en varias enfermedades. Los PMN adquieren la capacidad de producir ERO cuando son activados, estado que se caracteriza por un aumento del consumo de oxígeno (O₂) no asociado al transporte electrónico mitocondrial, proceso denominado "*estallido respiratorio*" y depende de la acción del sistema NADPH-oxidasa. La NADPH-oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O₂ con la formación de radical superóxido (O₂⁻). El O₂⁻ es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Estos, junto con los derivados reactivos del nitrógeno y el contenido de los gránulos, constituyen el mecanismo fundamental de defensa de los PMN. La NADPH-oxidasa cataliza la reacción:

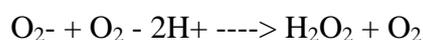


Durante la transferencia de electrones, estos pasan desde el NADPH hacia el FAD, y de ahí a los grupos hemo y de estos al O₂. La liberación de protones H⁺ hacia el lado citosólico genera una rápida depolarización de la membrana y una acidificación del medio intracelular. Estos cambios son compensados por la existencia de un canal de protones en la propia estructura del sistema enzimático que permite su salida hacia el lado extracelular.

El conocer con detalle los mecanismos catalíticos y de ensamblaje de este sistema enzimático, posiblemente ayudará a comprender las enfermedades causadas por déficit o exceso en su funcionamiento; reconociendo así su papel en las patologías hepáticas como la producida por el alcohol.⁶⁴

SOD. Superóxido dismutasa.

La enzima superóxido dismutasa (Clasificación 1.15.1.1) tiene como principal característica la capacidad de eliminar la acción nociva del radical superóxido. Su descubrimiento, en 1968, por McCord y Fridovich, constituyó una prueba de la existencia de estos radicales en los organismos vivos.⁶⁵ Estas enzimas catalizan la conversión del radical superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), en una de las reacciones catalizadas por enzimas más rápida que se conoce:



Como las concentraciones del O_2^- son normalmente bajas, la reacción depende de la difusión del ión. En eucariotas existen 3 tipos de SODs, con diferente localización, que en su conjunto contribuyen a la regulación de las concentraciones de este radical: Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular. En estudios realizados en hepatocitos de rata se encontró que el 20% de los O_2^- formados en la mitocondria pueden pasar al citosol, mientras el 80 % restante puede ser neutralizado por la enzima mitocondrial. Por lo que el modular su actividad podría colaborar en el mecanismo de detoxificación de los hepatocitos afectado en el modelo de CCl_4 .

GSHP. Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa es una enzima dependiente de selenio (Se) que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutación reducido (GSH). Se conoce que los L-OOH son tóxicos en los tejidos animales y que dan lugar a especies reactivas del oxígeno como los radicales peróxido (L-OO*). La GSHP, como parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los L-OOH, reduciéndolos en presencia de GSH. Esta reacción produce

hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcohólicos, para los que no se conoce enzima que los metabolice. La GSHP se puede localizar en la mitocondria y el citosol de la célula hepática, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune. Se conoce que algunas citocinas como el TNF- α , el IFN- γ e IL-1 son capaces de inhibir la actividad de esta enzima. La alteración de la actividad de la GSHP lleva a un aumento de los niveles de H₂O₂ y de lipoperóxidos, lo que puede ser fatal para la célula y aún más para el organismo, razón por la cual se encuentra implicada en un sinnúmero de enfermedades y procesos fisiológicos. Por lo que su regulación es parte de los procesos más trascendentales dentro de la respuesta antioxidante de cualquier patología.

G6PDH. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Además de su importancia en la caracterización de la presencia de células Kupffer, esta enzima posee otras propiedades involucradas en procesos metabólicos. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la primera enzima de la vía pentosa fosfato y la principal fuente intracelular de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), compuesto comprometido en diversos procesos fisiológicos, por ejemplo, en la defensa antioxidante (sobre todo en células como los eritrocitos), modulación del crecimiento endotelial, eritropoyesis, vascularización y fagocitosis.

Asimismo, el NADPH participa en la biosíntesis reductora del colesterol y de los ácidos grasos, así como también en la síntesis del óxido nítrico (NO). Por otra parte, éste se requiere para la actividad de la metahemoglobina reductasa y para el mantenimiento del nivel de glutatión reducido (GSH). NADPH y GSH son los responsables del potencial redox efectivo para proteger del estrés oxidativo tanto a los grupos sulfhidrilo de la

membrana celular, como a las enzimas y a la hemoglobina que compromete la supervivencia del eritrocito.⁶⁶ Además de estos efectos, esta enzima está implicada en varias otras funciones:

- Fagocitosis de leucocitos. La deficiencia severa de esta enzima provoca una reducción de la generación de NADPH, lo que trae como resultado una disminución de la producción de H₂O₂ y por lo tanto, la actividad microbicida del neutrófilo y de los macrófagos se ve afectada, y así mismo la respuesta inflamatoria.

- Modulación del factor de crecimiento endotelial vascular que regula la angiogénesis. El NADPH se utiliza como cofactor de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), modulando a su vez el crecimiento vascular y la migración endotelial.

Por la relevancia de esta enzima en la fisiología hepática es que se consideró evaluar las modificaciones a su actividad en el presente trabajo.

D. JUSTIFICACIÓN

En la búsqueda por una nueva opción de tratamiento de las diversas patologías hepáticas, se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Chagoya, en colaboración con el Dr. Hernández Luis, un derivado estructural de la molécula de adenosina, al que denominó IFC-305. Este compuesto mostró un efecto hepatoprotector en el modelo experimental de cirrosis inducida por CCl₄ en ratas Wistar. Estos resultados coinciden con los estudios que sugieren el efecto benéfico que tiene la adenosina para revertir la cirrosis experimental en el mismo modelo de estudio:

- Recuperación del tejido parenquimatoso.
- Restablecimiento de la función hepática: evaluado mediante los niveles de bilirrubina, albúmina, alanina transaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).⁶⁷
- Recuperación de la función del hepatocito
 - Restablecimiento de la carga energética⁶⁸
 - Recuperación de estructura y función de la mitocondria⁶⁹
 - Normalización del potencial redox⁶⁹
 - Incremento de la actividad proliferativa
- Incremento de la actividad colagenolítica
 - Normalización de la relación Colágena I / Colágena III
 - Disminución de los inhibidores de colagenasas TIMP-I y TIMP-II

En ese sentido, el interés del compuesto IFC-305 radica en que esta molécula fue capaz de reproducir todos estos efectos acompañados de una disminución de los niveles del TGF- β y aumento de los niveles del factor de crecimiento hepático HGF.⁷¹

Adicionalmente, se observó que su acción recupera a los niveles normales la expresión de varios de los genes diferenciales alterados durante la cirrosis experimental.⁷⁰ Entre ellos se encuentran más de 40 genes asociados a la respuesta inmune.

Sin embargo, para poder profundizar en el mecanismo molecular de su efecto biológico, los estudios con el animal íntegro son técnicamente difíciles, dada la estructura compleja del hígado. Por lo que un apoyo importante en elucidar el posible mecanismo es conocer a través de los modelos *in vitro* la participación de cada una de las células en la reversión de la cirrosis con este fármaco.

Hasta el momento, ya existen resultados del efecto de IFC-305 sobre las células estelares aisladas, los hepatocitos y las células endoteliales. Se ha demostrado que inhibe la apoptosis de los hepatocitos observada en la cirrosis e induce apoptosis de los miofibroblastos, a la vez que inhibe la activación de las células estelares.^{1,2}

Actualmente gran parte de la investigación sobre los procesos de reversión de la fibrosis hepática se ha enfocado en los orígenes celulares, los mecanismos de formación y degradación de la matriz, y sobretodo en la compleja red de interacciones entre células, citocinas y quimiocinas. Es notorio el hecho, que desde el desarrollo fetal del hígado se han demostrado importantes interacciones célula-célula y célula-matriz.⁷² Todas las estirpes que componen el hígado tienen comunicación y relaciones entre sí y se ha reconocido ampliamente que tanto bajo condiciones normales como patológicas, muchas de las funciones hepáticas están reguladas por las moléculas liberadas de las células vecinas no parenquimales.⁷³ Una de las estirpes celulares más trascendentales en

el hígado a nivel de respuesta inmunológica y de transferencia de éstas señales intercelulares son las células Kupffer.

Es por ello que así como diversos grupos de investigación se han dirigido al papel de estas células en la etiología alcohólica de la cirrosis, nosotros profundizaremos en su participación durante el fenómeno de reversión de la cirrosis por CCl₄ con el fármaco IFC-305.

E. HIPÓTESIS

El fármaco IFC-305 (aspartato de adenosina) a través de sus efectos previamente descritos en el modelo con CCl_4 sobre la recuperación del balance energético y el estado de óxido-reducción de la célula permite la recuperación y modulación de la activación de las células de Kupffer y otras estirpes inmunológicas del hígado durante su uso como tratamiento en reversión de la cirrosis.

F. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de las células Kupffer en la respuesta inmune y/o antioxidante del fármaco experimental IFC-305 en el fenómeno de reversión de la cirrosis experimental inducida por CCl₄.

G. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la arquitectura histológica del hígado, la población de células de Kupffer y otras células inmunológicas durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄.
 - 1^a. Comparar y comprobar un fenómeno de activación M1 por el CCl₄ con el efecto del fármaco IFC-305 sobre las células de Kupffer.
 - 1^b. Corroborar los cambios en el número de células de Kupffer por una técnica alternativa, empleando western blot para la detección de CD14.
2. Determinar actividades enzimáticas asociadas con la respuesta oxidante y antioxidante en el hígado y a nivel sistémico.
 - 2^a. Corroborar los cambios en la actividad enzimática de arginasa por una técnica alternativa, empleando western blot para la detección de Arginasa tipo I.
3. Comparar el efecto del fármaco IFC-305 sobre los niveles séricos de las citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF- γ , TNF- α y MCP-1 durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄.
4. Evaluar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la activación de la adiponectina durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄.

H. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales.

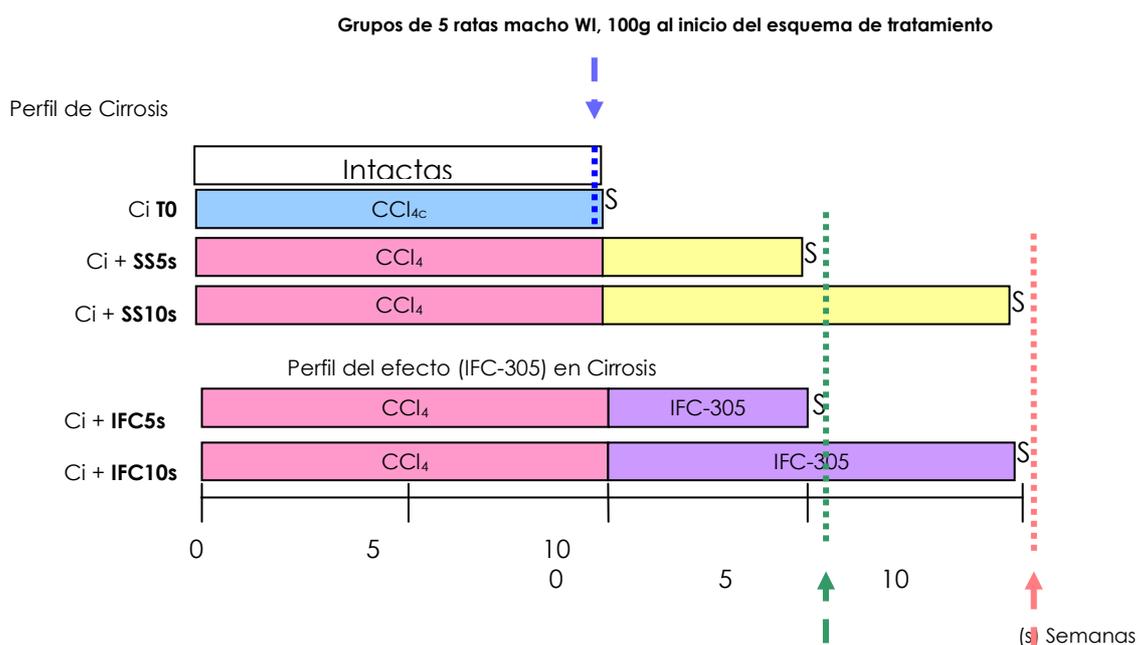
Se emplearon ratas Wistar macho, con un peso inicial de 100g, las cuales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

Se mantuvieron en consumo de agua y alimento libremente en las instalaciones controladas de temperatura, humedad y periodos luz/oscuridad en el Vivario del Instituto de Neurociencias de la UNAM.

Posterior al tiempo con diversos tratamientos (esquema experimental que se muestra más adelante), se sacrificaron de 3-7 animales por grupo, debido a que en algunos casos el tratamiento o la cirrosis inducida no permitió la sobrevivencia de la totalidad de las ratas. Pevio a su sacrificio, los animales fueron anestesiados con Anestésal® Pfizer.

Estrategia experimental

La estrategia experimental para evaluar la reversión de cirrosis experimental por IFC-305 se presenta en la siguiente figura:



Al inicio se pesaron y clasificaron aleatoriamente 48 ratas macho Wistar de 100-150g cada en 6 grupos de 8 ratas cada uno. Durante 10 semanas continuas, 5 de los 6 grupos fueron administrados intraperitonealmente (IP) 3 veces por semana con CCl₄ de concentración 1:6 con aceite vegetal comercial como vehículo para la generación de la cirrosis.

A las 10 semanas el grupo denominado T0 y una fracción del grupo de ratas Intactas fue sacrificado (flecha azul del esquema superior).

Durante 5 semanas posteriores se administraron IP a 2 grupos con solución salina y a 2 grupos con el fármaco experimental IFC-305 previamente disuelto en agua inyectable y se sacrificaron uno de cada uno de los grupos (flecha verde del esquema superior).

En las 5 semanas posteriores, es decir 10 semanas totales de tratamiento, se administraron IP a 1 grupo con solución salina y a 1 grupo con el fármaco experimental IFC-305 y se sacrificaron los dos grupos (flecha rosa del esquema superior).

La nomenclatura para todos los resultados presentados se uniformó de la siguiente manera:

GRUPO	NOMENCLATURA	TRATAMIENTO
1	Intactas	Control. n=5 Sin tratamiento 0-20 semanas
2	T0	CCl ₄ . n=5 (Admo. CCl ₄ 10 semanas [4g/kg peso])
3	SS5s	n= 3 (Admo. CCl ₄ : 10 semanas [4g/kg peso]+ Solución salina: 5 semanas [0.9%])
4	SS10s	n= 4 (Admo. CCl ₄ : 10 semanas [4g/kg peso]+ Solución salina: 10 semanas)
5	IFC5s	n= 3 (Admo. CCl ₄ : 10 semanas [4g/kg peso]+ IFC-305: 5 semanas [50mg/kg peso])
6	IFC10s	n= 3 (Admo. CCl ₄ : 10 semanas [4g/kg peso]+ IFC-305: 10 semanas [50mg/kg peso])

Toma de muestras y procesamiento

a) Suero

Durante cada sacrificio se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca. Se emplearon jeringas de 10ml, las cuales contenían 1ml de solución de EDTA como anticoagulante. Las jeringas se colocaron en refrigeración hasta su distribución en alícuotas que se conservaron a -70°C para su uso en las determinaciones enzimáticas.

b) Tejido

De los animales de todos los grupos se extrajeron muestras del hígado, bazo y ganglio mesentérico para su análisis histológico. Asimismo, a partir de estas muestras de tejido de hígado se aislaron células NCP (no parenquimales) por perfusión enzimática para su evaluación por citometría. Al mismo tiempo se extrajeron ambos femurs de las extremidades inferiores de los animales, para la extracción de las células de la médula ósea.

Evaluación inmunohistológica del hígado.

Al momento de extraer el tejido, se colocó en solución de paraformaldehído al 4%, para su fijación. Se embebieron las fracciones en parafina, para los cortes por microtomo, en un grosor del corte de 4 a 6 micras. Las tinciones se realizaron posteriores a la fijación y rehidratación de los cortes (etanol/agua) por dos métodos: eosina/hematoxilina (HE) y tricrómica de Masson.

Aislamiento de células hepáticas

Las células para su análisis por citometría de flujo se aislaron a partir de la fracción de hígado que permanece en la cavidad del animal. La perfusión del tejido se realizó a través de una abertura en la vena porta, en la que se colocó una cánula de un grosor aproximado de 0.5cm de diámetro. Por ella se hizo recircular 100 mL de solución

fisiológica por cada hígado (GBSS a 37 ° C, pH = 7.4). adicionada con glucosa. Al mismo tiempo, se preparó una solución de colagenasa tipo IV al 0.01%, la cual se perfundió, disuelta en 50mL de la misma solución de GBSS para cada hígado. Posterior a ello, se extrajo el hígado, se maceró y se hizo pasar por un tamiz con una malla de 100µm de poro. Este extracto se centrifugó por 5 minutos a 700 rpm y se colectó el sobrenadante, donde se encontraban las células no parenquimales. A continuación, se centrifugó la suspensión a 1500rpm para obtener un botón celular, antes de su enriquecimiento mediante un gradiente de Percoll 50/25. Posteriormente, se extrajeron las capas celulares intermedias, se lavaron con medio y se colocaron en SFB antes de congelar o resuspender en medio DMEM para su tinción.

Evaluación por citometría del flujo

En base a lo descrito en la introducción, aquí consideraremos como células de Kupffer las células viables positivas para el doble marcaje de superficie: CD11b⁺/HIS36⁺ y/o CD11b⁺/CD163⁺. Con ese objetivo, las células fueron extraídas de las muestras de tejido hepático fresco por el método descrito previamente. A continuación se determinó el número y viabilidad de células mediante la técnica de azul tripano. Todas las tinciones se realizaron con un porcentaje de viabilidad superior al 85% y se colocaron en placas de 96 pozos un volumen de 100µL por pozo que contenía un aproximado de 1X10⁶ células. Las tinciones de la superficie celular células se realizaron con los ajustes pertinentes de la concentración de cada uno de los siguientes anticuerpos:

Marcador	Dilución empleada	Células blanco
NK/T/B cocktail	1:50	Linfocitos T, B y células NK
CD103	1:70	Dendríticas
RP-1	1:30	Granulocitos y PMN
CD11b/c	1:70	Monocitos/macrófagos
CD11b	1:200	Monocitos/macrófagos
HIS 36	1:70	Kupffer
CD163	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, tanto del hígado como de la médula ósea. 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.

Evaluación por Western Blot

De muestras de hígado criopreservadas, se realizó la extracción de proteínas totales mediante la obtención de un homogenado hepático con vástagos y pistilo resuspendiendo en un buffer fisiológico con los inhibidores de proteasas correspondientes, empleando fragmentos con pesos promedio de 100 y 200mg. Se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Biuret. Las proteínas se procesaron y se les colocó en un gel a electroforesis para su separación y posterior transferencia a membranas. Dichas membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario CD14 y reveladas mediante una reacción fluorescente de HRP-peroxidasa. El mismo procedimiento se utilizó para los resultados obtenidos para Arginasa I mostrados más adelante. Al mismo tiempo se detectó la presencia de Arginasa I en homogenados totales para correlacionar los resultados con los obtenidos en citometría y en las actividades enzimáticas.

La electroforesis en geles de acrilamida se realizó empleando 50 a 100 μ g de proteínas total de los homogenados de hígado por carril. La transferencia se efectuó en una

cámara semi-seca Bio Rad® en membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos y las diluciones empleadas fueron:

Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
CD14. Santa cruz ®	1:2000	Conejo	1:5000
Arginasa I. Santa cruz ®	1:3000	Ratón	1:6000

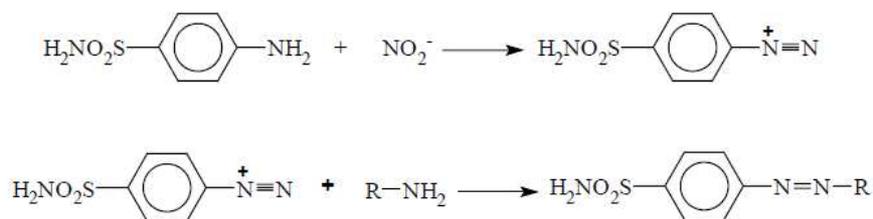
El revelado se llevó a cabo con un sistema de sustrato HRP Luminata® Millipore, en película fotográfica Kodak®

Cuantificación de proteína total por Biuret

Para la determinación de proteína total, se empleó el método espectrofotométrico de Biuret. El cual se basa en la formación de un complejo coloreado (púrpura) entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas.

Determinación de óxido nítrico

Se empleó la técnica de Griess, la cual se basa en la formación de un complejo o producto coloreado con por N,N naftil etilendiamina y sulfanilamida que se detecta espectrofotométricamente:



Producto coloreado, $\lambda_{\text{max}}=540 \text{ nm}$

Determinaciones enzimáticas

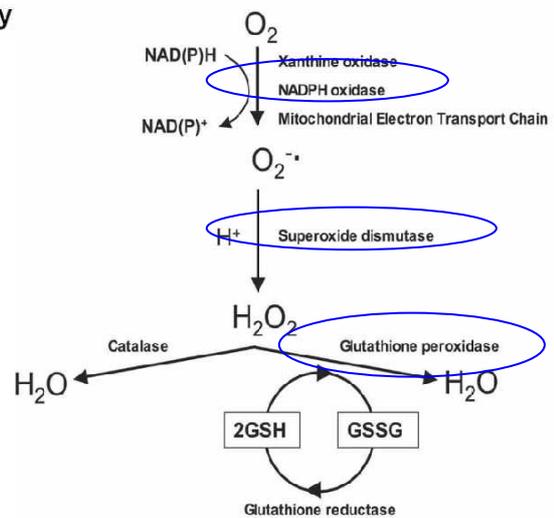
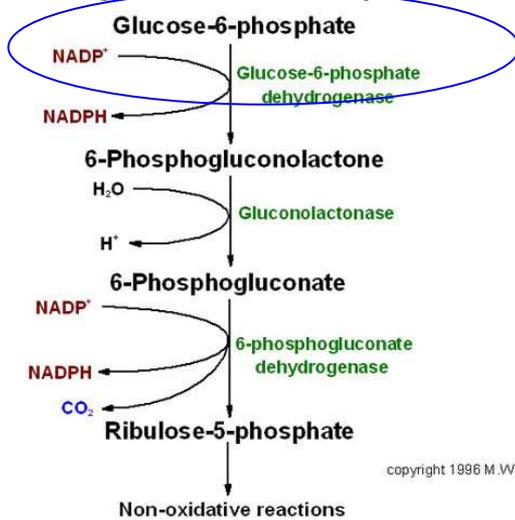
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). El método se basa en la extinción de NADP^+ cofactor en la reacción de transformación de glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconato por esta enzima, que puede detectarse espectrofotométricamente.

NADPHoxidasa. El método se basa en la detección del anión superóxido a través de la reducción del ferricitocromo C presente en la mezcla de reacción que se detecta mediante un espectro.

Superóxido dismutasa (SOD). El método se basa en detectar la extinción de xantina, la cual se emplea en la reacción de esta enzima para transformar el oxígeno molecular en anión superóxido, sustrato de esta enzima.

Glutación peroxidasa (GSHP). El método de detección se basa en la formación de NADP^+ detectable espectrofotométricamente.

Oxidative Stage of Pentose Phosphate Pathway



El cuadro a continuación resume los reactivos, las concentraciones, los volúmenes de muestra, condiciones de incubación y de lectura de los métodos espectrofotométricos que corresponden para cada una de las enzimas cómo se han descrito previamente en la literatura.⁷⁴

Métodos	ABS (nm)	Blanco	Estándar	Volumen de suero y/o homogenado	Reactivos	H ₂ O	Incubación o lectura						
BIURET	560	Biuret + agua	albúmina (10mg/mL)	μL	μL	μL	30 mins	leer					
			50	50	2	950			2	950			
NO	548	Rxn mix	KNO ₃				30 mins	leer					
				500	ZnSO ₄ + 10,000 rpm	Recolectar SN, y colocar con Lentejas Cd			MIX 1:1 (Sulfanilamida y naftiletildiamina) Vol. dependiente de no. de muestras (1.5mL por c/u)	100			
G6DPH	340	Todo - TPN	STD. Rintacta		BUFFER TEA	TPN (μL)	Glu-6P (μL)	3-10 mins	leer				
			Mismo vol. que la muestra	1000	2.0 mL	50	50						
				500		25	25						
				100		5	5						
	20	1	1										
SOD	550	Todo - XAN	STD Rintacta		BUFFER 7.0	FerrC(μL)	Xantina (μL)	XANox (μL)	3-16 mins	leer			
			Mismo vol. que la muestra	500	2.0 mL	150 (0.2mM)	30 (0.05mM)	5					
				100		30	6	1					
	20	6	1	0.1									
GHSP	340	Todo - NADPH	STD Rintacta		BUFFER 7.8	NADPH (μL)	GHSred (μL)	GSSGez (μL)	H ₂ O ₂ (μL)	3-12 mins	leer		
			Mismo vol. que la muestra	200	2.0 mL	30 (0.2mM)	100 (1.0mM)	10	200 (0.25mM)				
				100		15	50	5	100				
	20	3	10	1		20							
NOX	550	Ferr C	STD Rintacta		HBSS	Azida	FerrC(μL)	60 mins	leer				
			Mismo vol. que la muestra	100	1.0 mL	1 mL(2mM)	1 mL (80μM)						
				50	1.0 mL		1 mL (80μM)						
			50	2.0 mL	100 (dil 1:10)	1 mL (80μM)							

Arginasa. Se realizó la detección de la urea total producida mediante un método espectrofotométrico. En resumen, la enzima se activó calentando por 10 minutos a 56°C la muestra a analizar. La hidrólisis de la arginina se lleva a cabo incubándola a un pH de 9.7 a 37°C por 60 min. La reacción se detuvo con una mezcla ácida y la urea formada se midió a 540 nm después de que reacciona con α-isonitrosopropiofenona. Una unidad de actividad enzimática se definirá como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol urea/min.⁶²

Determinación de niveles de citocinas

La evaluación de los niveles comparativos de citocinas séricas fue determinado mediante el sistema Luminex® xMAP. Este método se basa en combinar tecnologías ya existentes y probadas tales como citometría de flujo, microesferas, láseres, y señalización digital. El Luminex cuenta con pequeñas regiones con microesferas las cuales se distribuyen en 100 diferentes posiciones. Cada región o bead se ha cubierto de un reactivo específico para cada bioensayo en particular, permitiendo con ello la captura y detección de analitos específicos para cada muestra. Durante este estudio se empleo esta metodología por que con ella es posible conocer varias citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , INF- γ y MCP-1) con poco volumen 25 μ L. El método empleado es el descrito en el inserto del kit (MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Panel.

Referencia : RCYTO-80K de MILLIPORE®).

I. RESULTADOS

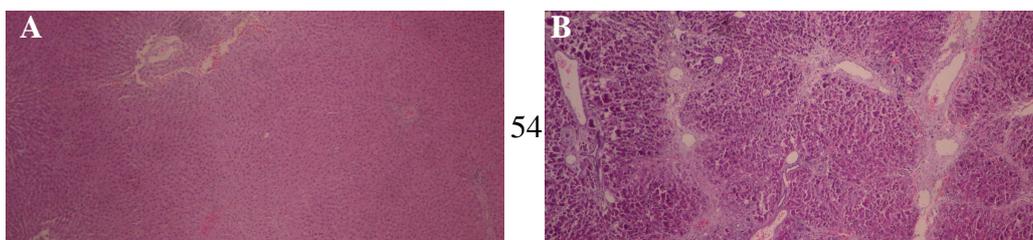
1. *Comparar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la arquitectura histológica del hígado, la población de células de Kupffer y otras células inmunológicas durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄.*

1. HISTOLOGÍA

En esta sección observaremos dos tipos de tinciones. En primer lugar la que corresponde a eosina/hematoxilina que nos permite detectar células de la respuesta inmune, como las que conforman el infiltrado inflamatorio, por ejemplo los neutrófilos. Por otro lado observamos tinciones con tricrómica de Masson que nos permite determinar la presencia de fibrosis.

En la **Figura 13** se observa que los animales con cirrosis experimental por 10 semanas (**B**) presentaron un claro infiltrado inflamatorio, al tiempo que mostraron cambios notables en la arquitectura de un hígado control (**A**). Principalmente se observa depósito en regiones periportales.

Por otro lado, se observa que el tratamiento con IFC-305 por 5 semanas, posterior al desarrollo de la cirrosis experimental (**C**) presenta una distribución del parénquima más ordenada, en comparación al tratamiento sólo con solución salina (**D**). Un caso semejante ocurre cuando se tratan los animales por 10 semanas con IFC-305 (**E**), en comparación con el tratamiento placebo por el mismo tiempo (**F**). Esto sugiere que IFC-305 induce un efecto de reversión en la desorganización de arquitectura hepática por efecto de la cirrosis experimental en ratas.



Por otro lado, con el objetivo de comparar el efecto sobre la matriz extracelular, principalmente, asociado a la presencia de fibras de colágeno, se evaluaron los mismos grupos experimentales por la técnica tricrómica de Masson, como se muestra en la

Figura 14. Esta tinción permite observar las fibras de colágeno tipo I de color azul, los

Figura 13: Efecto de IFC-305 en la cirrosis experimental. Cortes representativo (4X). El tejido fue fijado en paraformaldehído, teñido con Eosina/Hematoxilina (HE).
A) SS5s. CCl₄: 10 semanas + Solución salina: 5 semanas; B) IFC5s. CCl₄: 10 semanas + IFC-305: 5 semanas; C) SS10s. CCl₄: 10 semanas + Solución salina: 10 semanas; D) SS5s. CCl₄: 10 semanas + Solución salina: 5 semanas; E) IFC10s. CCl₄: 10 semanas + IFC-305: 10 semanas; F) SS10s. CCl₄: 10 semanas + Solución salina: 10 semanas.

la condición control (**I**), se observa en hígados de animales con cirrosis experimental (**II** y **IV**) una alta deposición de fibras de colágeno y una distribución desordenada de los cordones de hepatocitos. Por su parte, el tratamiento con IFC-305 durante 5 semanas posteriores al desarrollo de la cirrosis experimental (**III**) redujo el tamaño de las fibras de colágeno, al tiempo que el parénquima presentó una arquitectura más organizada. Esto sugiere que el fármaco IFC-305 redujo el depósito de fibras de colágeno y mejoró la ultraestructura del hígado alterada por el tratamiento con CCl₄.

En la **Figura 15** se observa la evaluación comparativa para los grupos a las 10 semanas de tratamiento en los 3 grupos experimentales, Aquí es posible observar que el corte histológico de las ratas Intactas (**1**) no presentan fibras y el tejido es ordenado, mientras que el tratamiento con IFC-305 durante 10 semanas (**2**) en comparación con la solución salina (**3**) tiene menor deposición de fibras de colágena y el tejido parenquimal se encuentra más homogéneo y con menor cantidad de estructuras oxidadas ya que el color rojo es menos intenso.

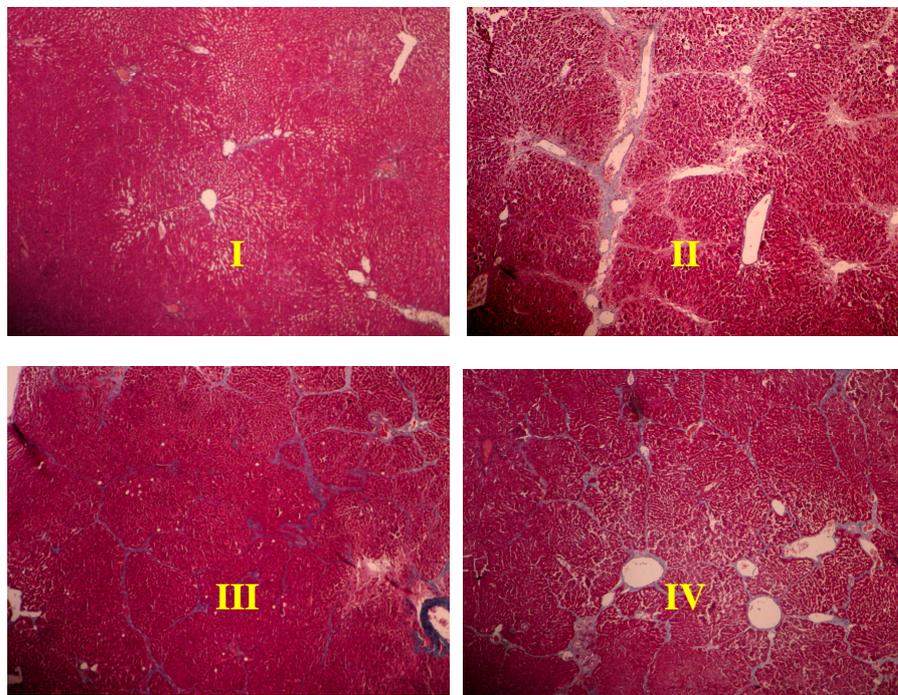


Figura 14. Evaluación comparativa del efecto de IFC-305 en la cirrosis experimental sobre las fibras de colágeno. El tejido hepático (4X) fue fijado en paraformaldehído, teñido con la técnica tricrómica de Masson (ver Material y métodos). Figuras: I. Intactas, II. T0 : CCl₄ ,III. IFC 5s,IV. SS 5s.

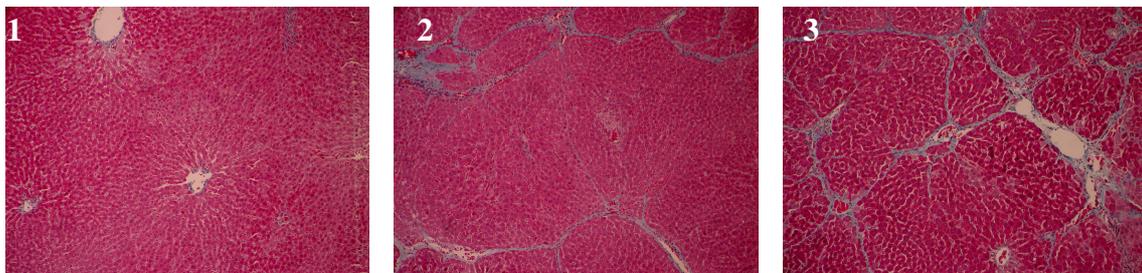


Figura 15. Tejido hepático 10X. Fijado en paraformaldehído, teñido con tricrómica de Masson. 1. Intactas, 2. IFC10s, 3. SS10s.

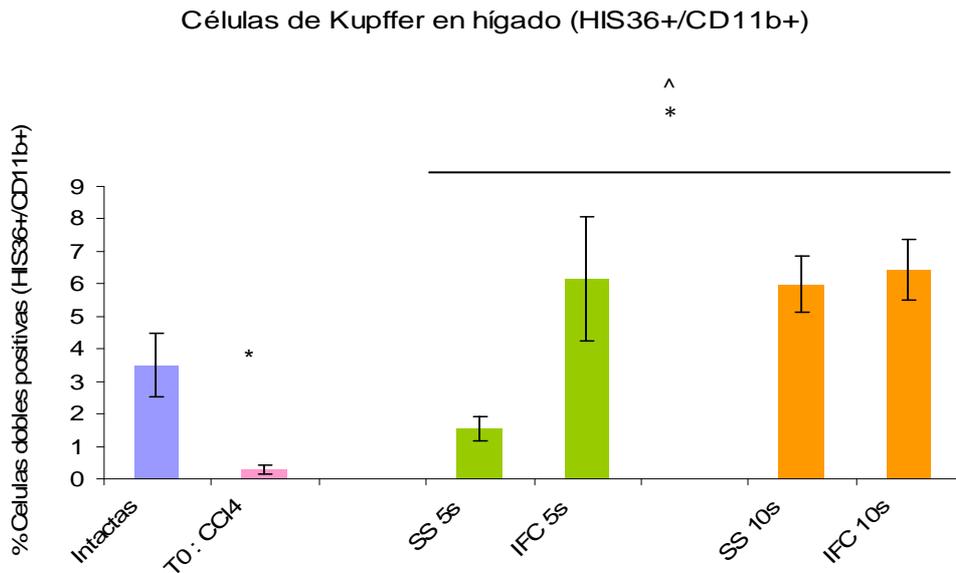
2. CITOMETRÍA DE FLUJO

CÉLULAS DE KUPFFER

HÍGADO (CD11b+/HIS36+)

Según los antecedentes presentados, para la identificación de las células de Kupffer se han tomado como referencia dos marcadores: CD11b y CD68⁵, sin embargo para nuestro modelo de rata, CD68 no es un marcador disponible para citometría y su empleo es más común en muestras de origen humano. Por esto se decidió emplear el marcador HIS36 conjugado, el cual reconoce a un receptor de superficie similar a ED-2 que expresan específicamente los macrófagos tisulares de rata.

En la **Gráfica 1** se presentan los porcentajes de las células dobles positivas, para los 2 marcadores CD11b⁺ y HIS36⁺ que corresponden a las células de Kupffer o macrófagos tisulares hepáticos totales, independientemente del estado de activación en el que se encuentren.



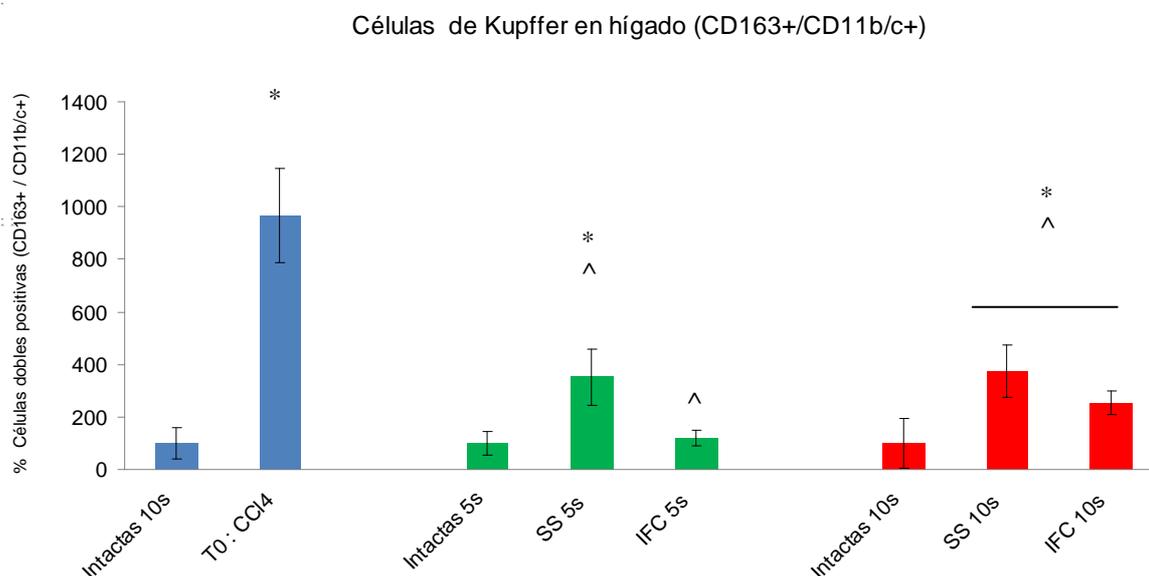
Gráfica 1. Efecto de IFC-305 sobre la relación porcentual de células HIS36⁺/CD11B⁺. Los valores corresponden al promedio del porcentaje \pm E.S. $p = 0.05$ * respecto a Intactas, ^ respecto a T0 : CCl₄

Podemos observar en la Gráfica 1, que el porcentaje de células de Kupffer disminuye de manera significativa por el efecto del T0:CCl₄, respecto al grupo de ratas intactas. Algo similar ocurre cuando, posterior a la inducción de cirrosis, los animales son tratados por 5 semanas con solución salina (SS), pero no así cuando el tratamiento es por 10 semanas donde se observó un aumento significativo del porcentaje de células de Kupffer. Por otro lado, el fármaco indujo un incremento significativo en la población de células de Kupffer desde las 5 y a las 10 semanas de tratamiento mostrando con ello un efecto directo sobre el número total de células de Kupffer.

1ª. Comparar y comprobar un fenómeno de activación MI por el CCl₄ con el efecto del fármaco IFC-305 sobre las células de Kupffer.

HÍGADO (CD11b+/CD163+)

Empleando el mismo modelo, pero un experimento posterior, se compararon las poblaciones de células CD11b+/CD163+ para la detección de la cantidad de células de Kupffer activada. Para ello se realizó la tinción de las células de Kupffer con un anticuerpo que reconoce el receptor CD163 el cuál se ha vinculado con la activación clásica M1; por lo tanto, un aumento en esta marca significaría la promoción de la respuesta inflamatoria. En la **Gráfica 2** se puede observar que la población doble positiva se incrementó de manera significativa por efecto de la cirrosis experimental, en comparación de los animales control. Por su parte, desde las 5 semanas de tratamiento con solución salina (SS) disminuyó el perfil inflamatorio y, consecuentemente, la población CD11b+/CD163+.



Gráfica. 2. Citometría de flujo. Relación porcentual de células dobles positivas respecto al 100% de las ratas Intactas. (CD163+/CD11b/c+) \pm E.S. p = 0.05 * respecto a Intactas , ^ respecto a T0 : CCl₄

Existe un aumento significativo respecto al grupo de ratas intactas de las células de Kupffer inflamatorias, activadas clásicamente, fenotipo M1 durante la cirrosis, tal cómo era de esperarse para el grupo T0, ya que el CCl₄ está promoviendo la inflamación local. El número de células de Kupffer disminuye a las 5 y 10 semanas tanto para los grupos tratados con el IFC-305 como con solución salina respecto al T0. El porcentaje de células CD163+ se mantiene elevado por encima de las Intactas, significativamente para los dos grupos con solución salina, lo que significa que en las poblaciones de células de Kupffer presentes predomina un estado de activación inflamatorio.

El fármaco IFC-305 lo disminuye significativamente las células CD163+, asociadas a inflamación y potencialmente es capaz de modular un estado de activación diferente para el total de las células de Kupffer.

1^b. Corroborar los cambios en el número de células de Kupffer por una técnica alternativa, empleando western blot para la detección de CD14.

HÍGADO. WESTERN BLOT. CD14

En este apartado observamos la expresión de la proteína CD14. Esta molécula funge como co-receptor de TLR4, cuyo nivel cambia con respecto al microambiente de citocinas: IL-13 ocasiona que baje su presencia y citocinas proinflamatorias hace que aumente. Se ha reportado que en muestras de origen humano su detección a nivel de RNA mensajero se relaciona de manera directa con el número de células de Kupffer. Sin embargo los cambios en la expresión a nivel de proteína podrían asociarse no sólo al número de células de Kupffer, sino a un estado de activación clásica de las mismas e

incluso al número de monocitos infiltrados en el tejido, ya que estas células también expresan CD14.

La figura 16 muestra los resultados obtenidos para el Western Blot.

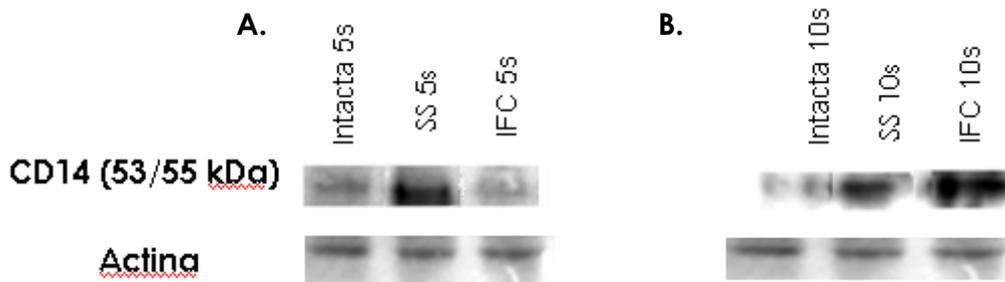
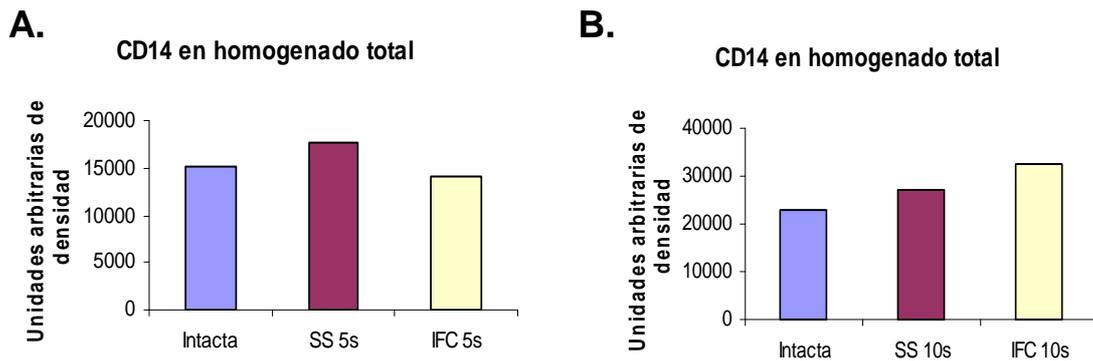


Fig. 16. Imágenes representativas de los films revelados para Western blot. Transferencia semi-seca. 100µg de proteína. CD14 (1:3000) y el control de Actina.

- A. Rata intacta, y de los grupos: IFC 5s y SS 5s
- B. Rata intacta, y de los grupos: IFC 10s y SS 10s



Graf. 3 y 4. Cuantificación de muestras independientes para cada grupo de un experimento representativo. Unidades arbitrarias de densidad.

- A. Rata intacta, y de los grupos: IFC 5s y SS 5s
- B. Rata intacta, y de los grupos: IFC 10s y SS 10s

Este resultado muestra que la expresión de CD14; asociada al número de células de Kupffer proinflamatorias y a los monocitos infiltrados; aumenta a las 5 semanas en el grupo de solución salina y a las 10 semanas ambos grupos: con el tratamiento IFC-305 y con solución salina (**Fig. 16 y gráficas 3,4**) respecto al grupo de Intactas. Esto podría significar por un lado que disminuye la activación clásica de las células de Kupffer a las

5 semanas de tratamiento con IFC-305 y que aumenta el infiltrado de monocitos a las 10 semanas con el mismo tratamiento.

Este mismo fenómeno, en cuanto a las células de Kupffer proinflamatorias fue observado en la citometría de flujo a las 10 semanas, lo que abre paso a establecer una hipótesis adicional en la que más allá de un efecto de reversión de la cirrosis el fármaco es potencialmente capaz de modular el estado de activación del macrófago a un fenotipo antiinflamatorio M2, para lo que se utilizaron otras proteínas marcadores de éstos y se analizaron otras poblaciones inmunológicas que pudieran estar asociadas a este mecanismo, cómo los propios precursores de los macrófagos de la médula ósea.

HÍGADO. SUBPOBLACIONES CELULARES

En las mismas fracciones de células no parenquimales se realizó la tinción para otras estirpes inmunológicas las cuales podrían asociarse a la modificación en el número de células de Kupffer, al tiempo de reforzar una propiedad de inmunomodulación del fármaco IFC-305.

HÍGADO							
Estirpe celular	Marcador	Grupos					
		Intactas	T0 : CCl4	SS 5s	IFC 5s	SS 10s	IFC 10s
Linfocitos T	CD3	10.45 ± 0.81	ND	7.79 ± 2.99	19.19 ± 6.83	13.6 ± 1.80*	9.0 ± 2.19 ^a
Células Dendríticas	CD103	12.3 ± 5.73	33.73 ± 2.65*	31.35 ± 10.05*	30.86 ± 11.9*	5.50 ± 3.64*	2.32 ± 1.3*
PMN Granulocitos	RP-1	12.15 ± 4.94	20.9 ± 10.6	38.28 ± 4.27*	34.02 ± 6.31*	11.90 ± 7.2	24.77 ± 7.14*
Monocitos macrófagos	CD11 b/c	32.51 ± 2.74	ND	50.8 ± 6.98*	26.68 ± 1.94	32.2 ± 3.97*	37.51 ± 6.15*
* p = 0.05 respecto a Intactas, ^a p = 0.05 respecto a SS 10s							

Tabla 1. Citometría de flujo para distintas poblaciones inmunes del hígado, a las 5 y 10 semanas de los respectivos tratamientos.

La **tabla 1** nos muestra los resultados para 4 poblaciones distintas. Durante la cirrosis, en el grupo T0, por efecto del CCl₄ aumenta el infiltrado inflamatorio tal como se observó en la histología y acorde con el incremento del número de células dendríticas (CD103+) y de granulocitos (RP-1+) respecto al grupo de Intactas. El fármaco IFC-305 a las 5 semanas de tratamiento es capaz de recuperar los niveles de células CD11b/c+ y a las 10 semanas existe una disminución de las células dendríticas (CD103+) y de linfocitos T (CD3+), respecto al grupo tratado con solución salina SS 10s, así como un incremento de los granulocitos y células CD11b/c+. Estos resultados deberán asociarse a mecanismos de activación de las mismas estirpes y será necesario un ensayo adicional de marcadores de superficie, para profundizar en dicho resultado en otras etapas experimentales, pero estos cambios en el número de células indican que el fármaco está modulando niveles de otras estirpes inmunológicas y que su efecto no es exclusivo de la población de células de Kupffer.

MÉDULA ÓSEA

Empleando el CD11b/c se buscó caracterizar cambios en la población de las células precursoras monocíticas de médula ósea. La **tabla 2** muestra los resultados obtenidos a las 10 semanas con los tratamientos, para monocitos/macrófagos de médula ósea, ya que por cuestiones metodológicas no fue posible incluir el resultado para el T0 y los grupos de 5 semanas.

MÉDULA ÓSEA				
Estirpe celular	Marcador	Grupos		
		Intactas	SS 10s	IFC 10s
Monocitos/macrófagos	CD11 b/c	62.90 ±4.63	49.00±8.17 *	64.20±1.68 ^a
* p = 0.05 respecto a Intactas, ^a p = 0.05 respecto a SS 10s				

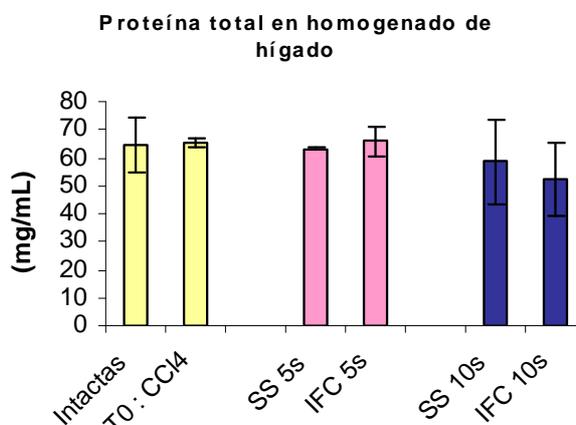
Tabla 2. Citometría de flujo para macrófagos/monocitos de médula ósea, a las 10 semanas de los tratamientos.

Cómo podemos observar estadísticamente, los datos revelan que existe una recuperación del número de células precursoras que radican en la médula ósea del grupo tratado con IFC-305 respecto al tratado con solución salina, de las cuáles un porcentaje serán reclutadas en el hígado y transformadas a los dos diferentes fenotipos de la células de Kupffer. Esto indica que el fármaco incluso es capaz de ejercer un efecto de modulación sobre el número de células precursoras de algunas estirpes de la respuesta inmune.

2. Determinar actividades enzimáticas asociadas con la respuesta oxidante y antioxidante en el hígado y a nivel sistémico.

3. HÍGADO. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Se realizó la cuantificación de la cantidad de proteína en homogenados totales de hígado, así como la concentración de NO, las actividades enzimáticas de SOD, NADPHox, GHSP, G6PDH y Arginasa, los resultados se muestran a continuación:

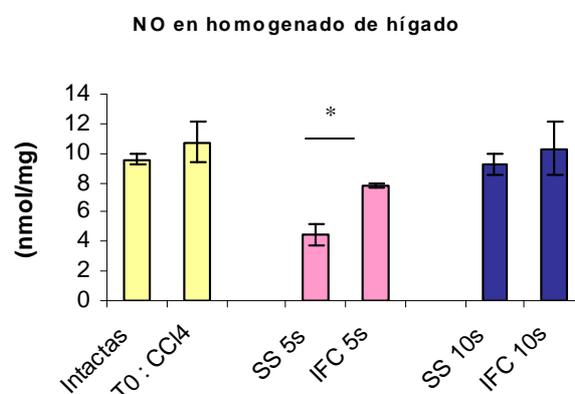


Graf. 5. Concentración de proteínas totales en homogenado de hígado (Promedio \pm ES n>3)

La cantidad de proteína presente en los homogenados no presenta cambios significativos entre los grupos experimentales. Estos datos se emplearon para ajustar la cantidad de proteína en los ensayos de actividades enzimáticas.

NO. Óxido nítrico

Se ha demostrado que los niveles de NO tienen efectos en la regulación de síntesis de algunos transportadores del hígado en rata, además de ser un inmunomodulador de trascendencia para la comunicación en procesos inflamatorios.

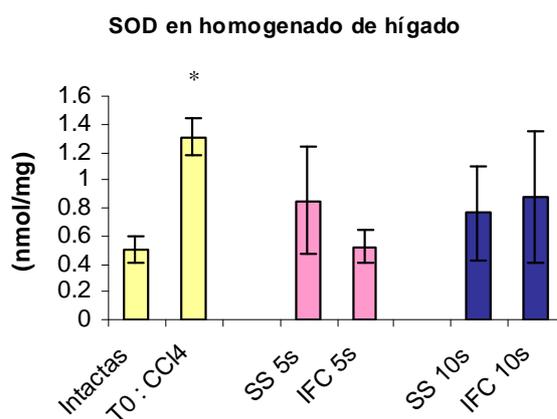


Graf. 6. Concentración de nitratos y nitritos en homogenado de hígado (Promedio \pm ES n>3)
* p = 0.05 respecto a Intactas

El NO aumenta en grupo T0 pero no significativamente respecto al grupo de ratas Intactas. A las 5 semanas disminuyen los niveles tanto para el grupo tratado con el IFC-305 como para el de solución salina, pero de manera estadísticamente diferente entre ellos. Esto refleja que el IFC-305 está recuperando la función de las enzimas que sintetizan NO, como son la eNOS por su presencia en el endotelio, mientras que la solución salina lo hace más lentamente, ya que a las 10 semanas no se presentan diferencias respecto a Intactas para ninguno de los dos grupos.

SOD. Superóxido dismutasa

Esta enzima es mediadora de la producción de especies reactivas de oxígeno y por ello está involucrada en procesos de estrés oxidativo el cual se ha demostrado necesario para la activación de células de Kupffer en diversas patologías. De las 3 isoformas, la CuZn-SOD citosólica es la que se determina a niveles séricos.

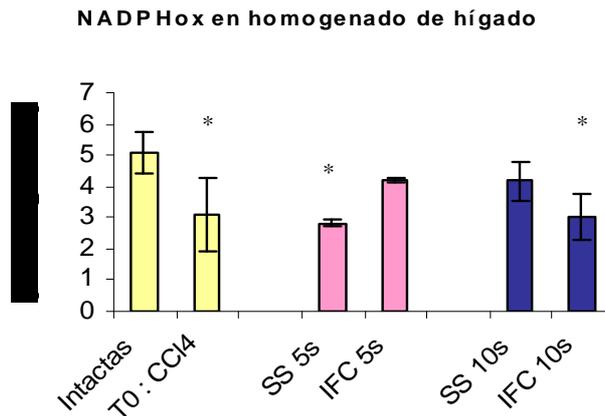


Graf. 7. Actividad enzimática de SOD en homogenado de hígado (Promedio \pm ES n>3)
* p = 0.05 respecto a Intactas

En el proceso cirrótico producido por el CCl_4 la CuZn-SOD citosólica incrementa su actividad (grupo T0). El IFC-305 a las 5 semanas es capaz de recuperar los niveles de actividad de SOD a los de Intactas, no así con el grupo tratado con solución salina. Ocurre lo mismo para ambos grupos de 10 semanas SS 10s e IFC 10s, significando con ello que el efecto es más evidente a las 5 semanas para el tratamiento con IFC-305.

NADPHoxidasa

Esta enzima es importante por la regulación que tiene sobre el anión superóxido, principal mediador del estallido respiratorio en macrófagos y se ha demostrado su participación esencial en las fases de inflamación en procesos infecciosos.



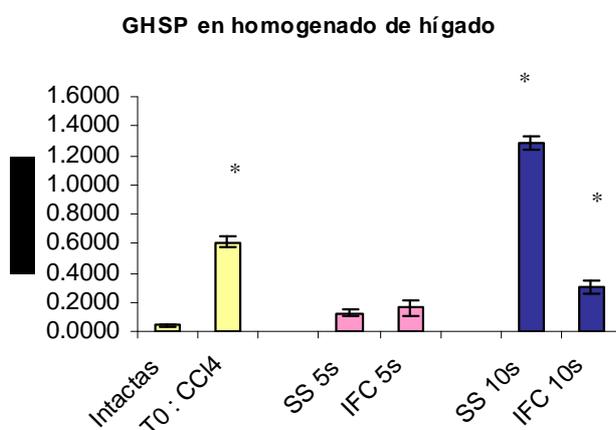
Graf. 8. Actividad enzimática de NADPHox por concentración de ión superóxido en homogenado de hígado (Promedio ± ES n>3) * p = 0.05 respecto a Intactas

La actividad de NADPH oxidasa disminuye en T0, por el hecho de que el tejido hepático ha perdido sus funciones por efecto de la cirrosis y el efecto progresa con solución salina a las 5 semanas aún más y significativamente respecto a Intactas. No se observaron cambios para los grupos tratados con IFC-305 respecto a Intactas a las 5 semanas. Sí realizamos la comparación entre los grupos a las 5 semanas de ambos tratamientos, el IFC-305 está favoreciendo la recuperación de las funciones hepáticas normales, como la activación de la NADPHox y la capacidad fagocítica del hígado, en comparación con el tratamiento de SS. Sin embargo a 10 semanas el fármaco ocasiona una disminución de la actividad, lo que se pudiera atribuir a una desactivación del endotelio o de las propias células de Kupffer proinflamatorias.

GHSP. Glutación peroxidasa

Dentro de los mecanismos antioxidantes la GSHP tiene como papel la eliminación del peróxido formado por la SOD, que emplea el glutatión como un donador de electrones, sí esta enzima se ve modificada podremos conocer potencial efecto antioxidante en el

mecanismo de acción del fármaco, necesario para compensar un exceso en la formación de ERO.



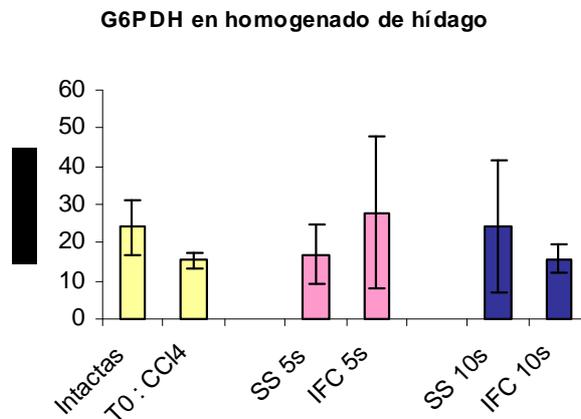
Graf. 9. Actividad enzimática de GHSP en homogenado de hígado (Promedio ± ES n>3)
* p = 0.05 respecto a Intactas

La actividad de GHSP aumenta en T0 por efecto del CCl₄ ya que como se ha descrito en la literatura éste se metaboliza por citocromo P450 y el ión triclorometano resultante se conjuga con glutatión, promoviendo la actividad de las enzimas asociadas al propio glutatión. Con solución salina a las 5 semanas no se observaron cambios, pero a 10 semanas aumenta la actividad aún más y significativamente respecto a Intactas. No se observaron cambios para los grupos tratados con IFC-305 respecto a Intactas, corroborando con ello que el fármaco es capaz de conservar los niveles normales de la actividad de GHSP, potencialmente bloqueando el metabolismo del CCl₄ en los hepatocitos.

G9PDH. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

La principal enzima generadora de NADPH, es utilizada en reacciones que requieren un donador de electrones con un alto potencial de oxido-reducción. El NADPH es utilizado como fuente de electrones para la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides o en reacciones enzimáticas como la de la propia NADPHoxidasas. Recordemos que se ha

empleado para poder distinguir la presencia de las células de Kupffer de las células endoteliales.

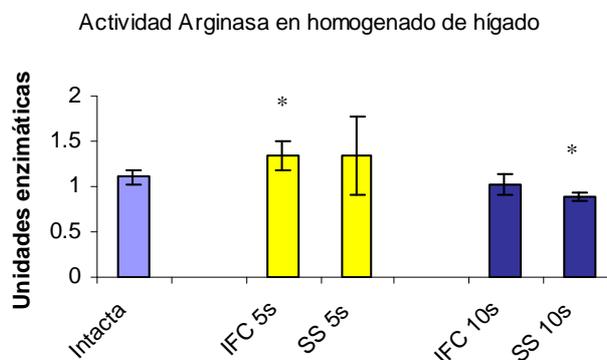


Graf. 10. Actividad enzimática de G6PDH en homogenado de hígado (Promedio ± ES n>3)

Las actividades de esta enzima G6PDH de todos los grupos experimentales no presentaron cambios significativos entre ellas, esto quizá debido a que el hígado es capaz de compensar los efectos sobre ella, ya que es una enzima que participa en múltiples procesos que involucran la producción del poder reductor del NADPH.

Arginasa

Esta enzima compete por la arginina, el principal sustrato de la iNOS, pero en particular su importancia radica en que su actividad se vincula con antiinflamación e inclusive con la recuperación de la función normal hepática



Graf. 11. Actividad enzimática de Arginasa en homogenado de hígado (Promedio ± ES n>3)
* p = 0.5 respecto a Intactas

No se presentaron cambios respecto al grupo de Intactas a las 5 semanas para ninguno de los 2 grupos. La actividad de esta enzima disminuye significativamente a las 10 semanas en el grupo tratado con solución salina. Sin embargo a las 10 semanas de tratamiento el IFC-305 recupera los niveles a los de Intactas. Este fenómeno podría vincularse directamente con la recuperación global de las funciones hepáticas que se ha reportado por efecto del fármaco IFC-305, ya que uno de los ciclos bioquímicos que se ven afectados en la cirrosis es el urea, en el que participa la arginasa en el metabolismo de la arginina, sin dejar pasar por alto su relación con el estado de activación alternativa de las células de Kupffer antiinflamatorias.

2ª. Corroborar los cambios en la actividad enzimática de arginasa por una técnica alternativa, empleando western blot para la detección de Arginasa tipo I.

HÍGADO. WESTERN BLOT. ARGINASA I

A continuación se muestra en la **Figura 17** el resultado para Arginasa I en homogenado de hígado.

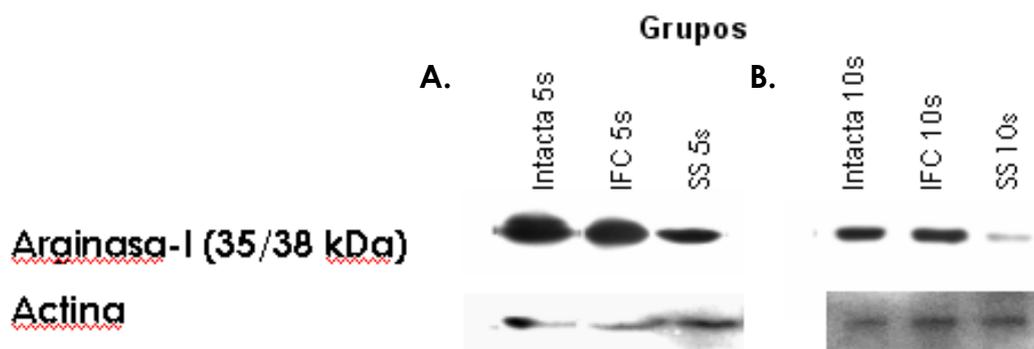


Fig. 17. Imágenes de films revelados para Western blot. Transferencia semi-seca. 100µg de proteína. Arginasa I (1:3000)

- A. Grupos de ratas intactas, tratadas con IFC-305 y solución salina durante 5 semanas
- B. Grupos de ratas intactas, tratadas con IFC-305 y solución salina durante 10 semanas

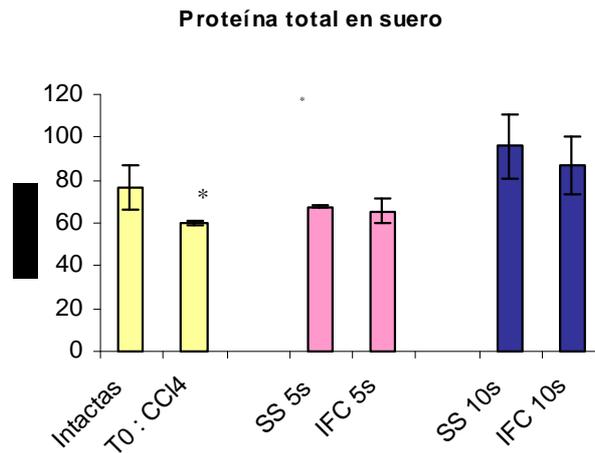
Existe un aumento de la enzima Arginasa tipo I asociada al fenotipo anti-inflamatorio M2 de las células de Kupffer, lo cuál se observó tanto en la actividad de homogenado total de hígado con diferencias significativas para los grupos de 10 semanas comparados entre sí (Gráfica 11), así como en la detección de proteína por Western Blot (Fig. 17).

Sin embargo como se ha mencionado, los niveles en homogenado total están reflejando la recuperación de la función hepática total y no exclusivamente lo ocurrido en específico para las células de Kupffer. Es importante remarcar que los fenómenos presentados a nivel tisular, no son exclusivos de la estirpe que tenemos como objeto principal de estudio (células de Kupffer), por lo que es indispensable realizar una serie de estudios *in vitro*, para conocer su participación específica en todos estos procesos. A nivel de tejido sería relevante la co-localización de cada una de las enzimas mediante el empleo de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia y la corroboración de las actividades mediante la detección de los niveles de proteína por Western Blot y/o los niveles de RNA mensajero por RT-PCR.

Con la finalidad de explorar el equilibrio oxidante/antioxidante y los efectos del fármaco IFC-305 a nivel sistémico, se determinaron las mismas actividades enzimáticas relacionadas a un posible proceso antioxidante generado por el fármaco de estudio.

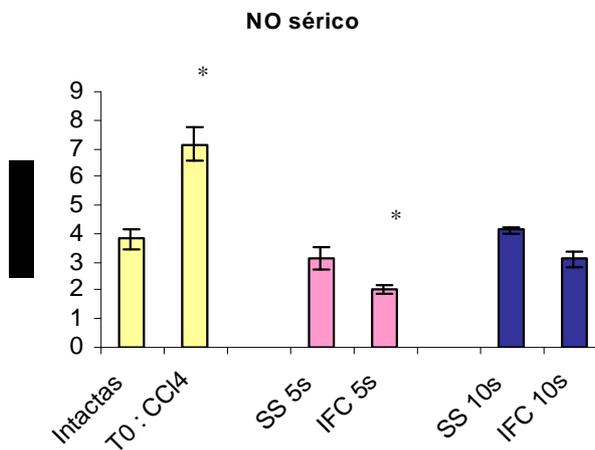
4. SUERO. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

La cantidad de proteína presente en los sueros disminuye significativamente en el grupo T0, no presenta cambios significativos entre los grupos de 5 y 10 semanas. Estos datos se emplearon para ajustar la cantidad de proteína en los ensayos de actividades enzimáticas.



Graf. 15. Concentración de proteínas totales en suero (Promedio ± ES n>3)
* p = 0.05 respecto a Intactas

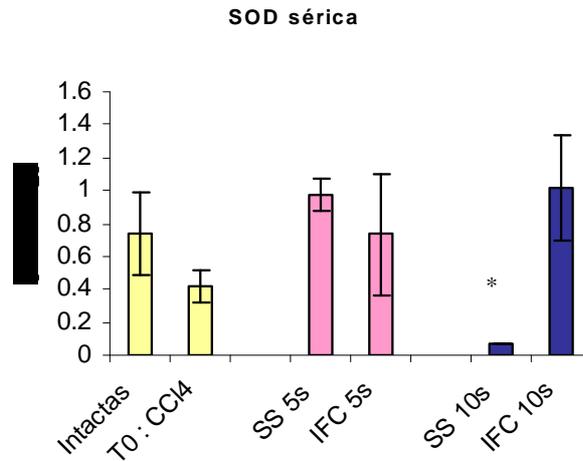
NO. Óxido nítrico



Graf. 16. Concentración de nitratos y nitritos en suero (Promedio ± ES n>3)
* p = 0.05 respecto a Intactas

El NO aumenta significativamente respecto al grupo de Intactas por efecto del CCl₄ en el grupo T0, coherente con el proceso inflamatorio que desencadenó el hepatotóxico y que se refleja sistémicamente. Sin embargo los niveles regresan a los de Intactas a las 5 y 10 semanas con la solución salina, disminuyendo significativamente a las 5 semanas de tratamiento con IFC-305, efecto que podría vincularse con la desactivación de enzimas como la iNOS y/o eNOS a cualquier nivel del organismo, contribuyendo con ello en la reversión de la cirrosis.

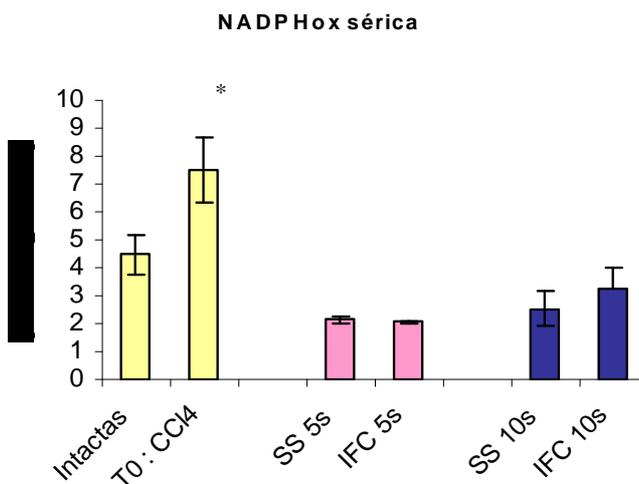
SOD. Superóxido dismutasa



Graf. 17. Actividad enzimática de SOD en suero (Promedio \pm ES $n > 3$)
* $p = 0.05$ respecto a Intactas

No existen diferencias para la actividad de la SOD entre los grupos, a excepción del tratado con solución salina a las 10 semanas en el que la actividad es menor que la del grupo Intactas. El caso del resultado de SS 10s no corresponde a lo esperado, por lo que necesariamente deberá comprobarse este efecto en un mayor número de muestras o mediante otro método experimental, como el Western Blot.

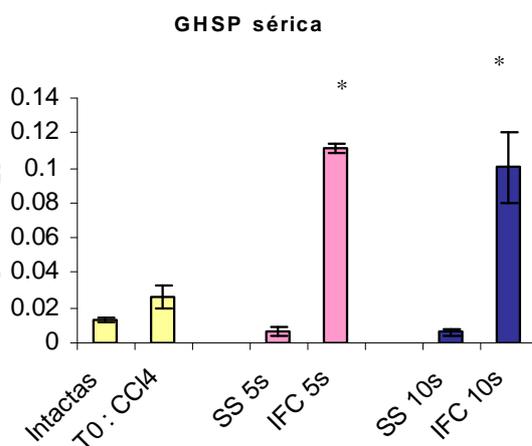
NADPHoxidasa



Graf. 18. Actividad enzimática de NADPHox por concentración de ión superóxido en suero (Promedio \pm ES $n > 3$) * $p = 0.05$ respecto a Intactas

La actividad de la NADPHox se exacerba por el efecto del CCl₄ en el grupo T0, como reflejo de la activación del estrés oxidante generado por el radical triclorometano y otros radicales que ejercen efectos sistémicos como el propio ión supeóxido. Caso contrario a lo que se observó en el homogenado total, en donde el hígado ha perdido sus funciones por efecto de la cirrosis incluso a niveles de esta enzima. Podemos observar que la NADPHox disminuye para ambos grupos de 5 semanas incluso por debajo del grupo de Intactas, pero no existen diferencias entre los grupos de 10 semanas, quizá debido a que a estas semanas el organismo es capaz de recuperarse sistémicamente para ambos tratamientos.

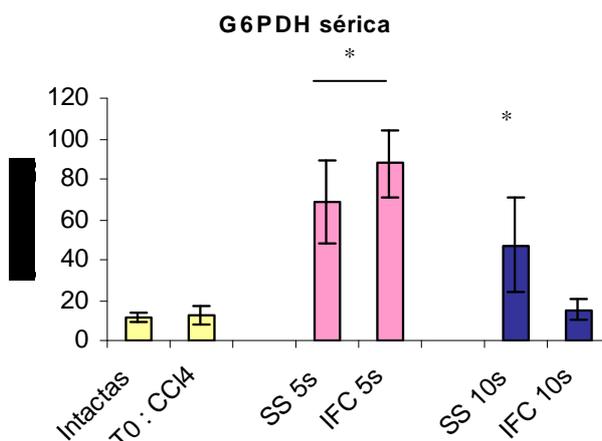
GHSP. Glutación peroxidasa



Graf. 19. Actividad enzimática de GHSP en suero (Promedio ± ES n>3)
* p = 0.05 respecto a Intactas

La actividad de la GHSP incrementa significativamente por efecto del fármaco a las 5 y 10 semanas de tratamiento respecto al grupo de Intactas, pero no existen diferencias entre los grupos de solución salina, caso contrario a lo observado en hígado. Es quizá debido a que el organismo requiere activar esta enzima para abatir el estrés oxidante generado a nivel sistémico y con ello el IFC-305 es capaz de contribuir a la respuesta antioxidante en la totalidad del organismo.

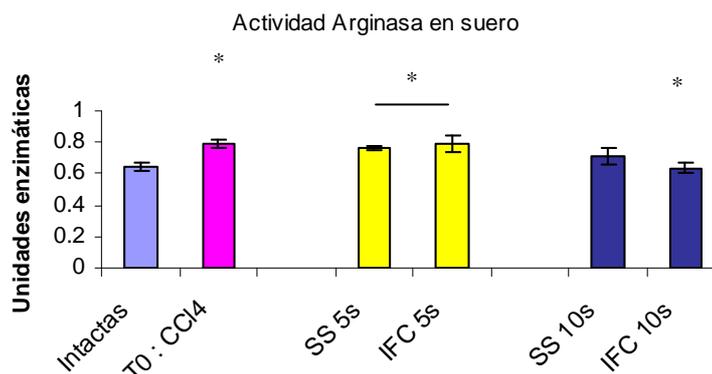
G6PDH. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa



Graf. 20. Actividad enzimática de G6PDH en suero (Promedio \pm ES n>3)
* p = 0.05 respecto a Intactas

La actividad de la G6PDH incrementa significativamente para ambos grupos a las 5 semanas y a las 10 semanas para el grupo tratado con solución salina. Sin embargo a nivel sistémico no es posible determinar cual es el significado real de estos cambios, porque la molécula producto de esta enzima está involucrada en una gran cantidad de procesos bioquímicos.

Arginasa



Graf. 21. Actividad enzimática de Arginasa en suero (Promedio \pm ES n>3) * p = 0.5 respecto a Intactas

La actividad de esta enzima arginasa aumenta para el grupo T0 y para el tratado con IFC-305 a las 5 semanas, significativamente respecto a Intactas. A las 10 semanas los niveles son los normales.

Se ha observado que los efectos del IFC-305 son más evidentes, de manera global, a las 5 semanas de tratamiento, y que a las 10 semanas el organismo recupera algunas de sus funciones tanto con el fármaco como con solución salina, lo cual se observa en este caso en la actividad de arginasa a nivel sérico; esto, ya que el hepatotóxico CCl₄ se ha retirado y no existen las señales moleculares que indiquen el daño.

Daremos paso a lo que ocurre a nivel sistémico con las citocinas, principales moléculas de comunicación de la respuesta inmune, siendo ellas, las responsables de notificar a través del torrente sanguíneo la presencia del daño tisular y en este caso parte esencial en las causales y consecuencias de la cirrosis.

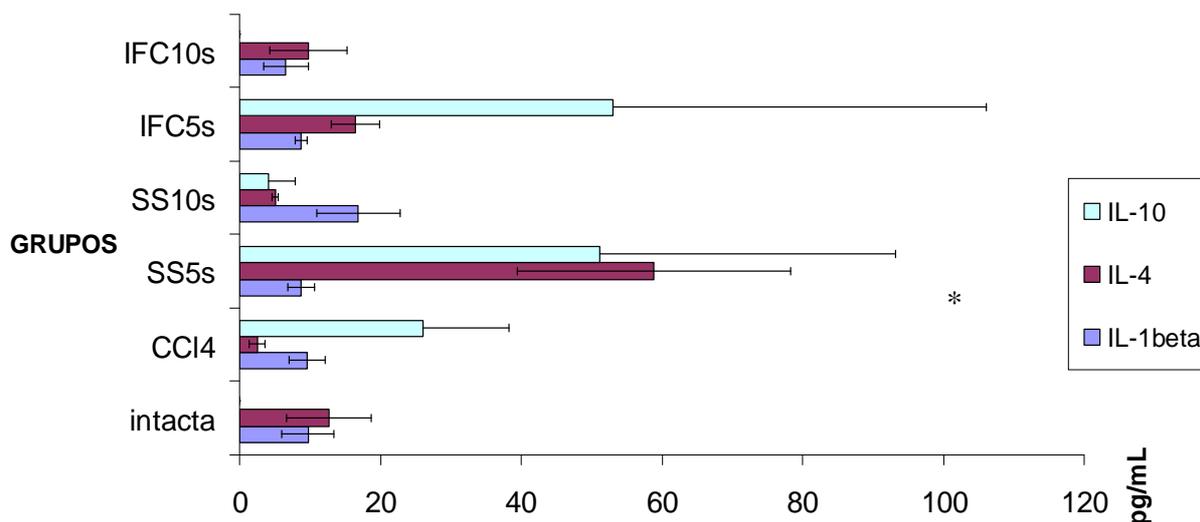
3. Comparar el efecto del fármaco IFC-305 sobre los niveles séricos de las citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF- γ , TNF- α y MCP-1 durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄.

5. SUERO. CITOCINAS

La determinación se realizó por MILLIPLEX® y únicamente se muestran los resultados obtenidos para suero. No se muestran los resultados obtenidos para TNF- α y MCP-1, ya que no fue posible determinar los niveles en ninguno de los casos porque se encontraron fuera del rango de detección del sistema.

Todas las citocinas juegan papeles muy dinámicos, ya que algunas presentan actividades pleiotrópicas y sus efectos dependerán de su concentración, de sus sitios de acción, y la

interacción con sus receptores en las diversas células del organismo. Por lo tanto, los resultados que se presentan a continuación deberán considerarse como la respuesta general a nivel sistémico, que no necesariamente refleja el fenómeno total que están produciendo cada una de las moléculas.



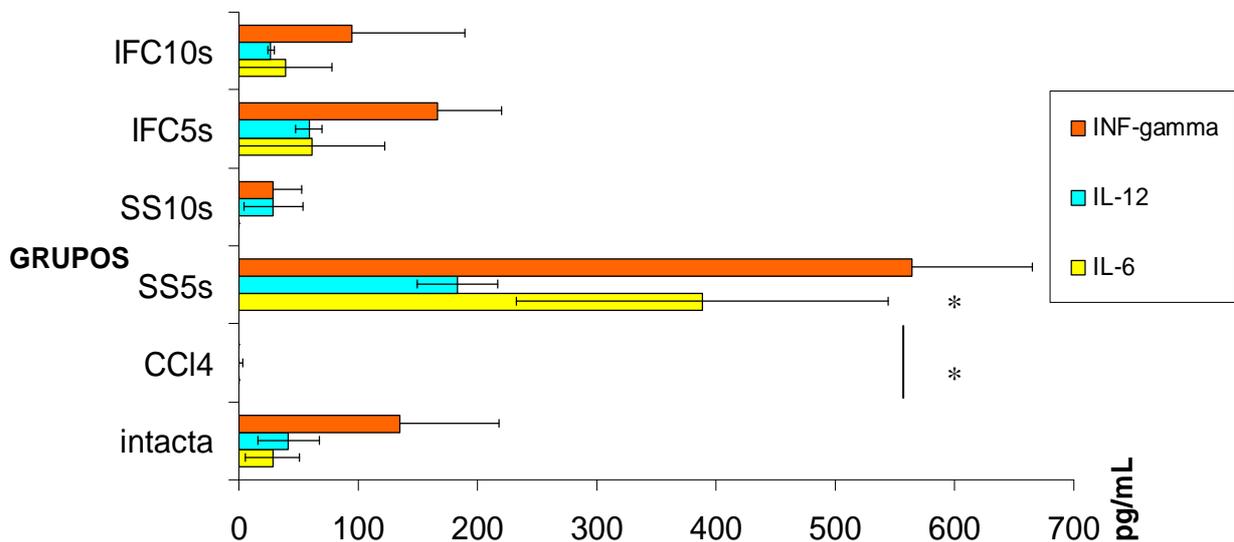
Graf. 12. Citocinas séricas (IL-4, IL-10 e IL-1β) (Promedio ± ES n>3) * p = 0.05 respecto a Intactas

Como podemos observar en la **gráfica 12**, los niveles de la IL-1β no presentan cambios significativos para ninguno de los grupos, esto acorde a la temporalidad del esquema experimental, ya que esta citocina es una de las primeras señales que emplea el organismo para desencadenar la inflamación. Deberá estudiarse necesariamente en las etapas de inflamación en las que se está estableciendo la cirrosis, es decir antes del T0, quizá en las primeras 4 - 6 semanas en las que también se ha descrito un incremento importante en el número de células de Kupffer.

Para el caso de la IL-4 el CCl₄ disminuye significativamente los niveles respecto al grupo de Intactas, pero aumenta de manera significativa a las 5 semanas en SS 5s como parte de la respuesta inflamatoria que se mantiene en este momento, pero para los grupos con IFC-305 los niveles no varían respecto a los detectados para el grupo de

ratas Intactas, mostrando con ello, que el fármaco es capaz de bloquear la liberación al torrente sanguíneo de esta citocina.

La IL-10 aumenta tanto para SS 5s como para IFC 5s, sin embargo posee efectos antiinflamatorios y profibrogénicos. En un proceso de inflamación crónica, como la cirrosis, este resultado necesariamente deberá asociarse a otras moléculas como el TGF- β y/o los niveles de fibrosis, ya que se ha descrito que su efecto dependerá del equilibrio con otras citocinas. El IFC-305 es capaz de promover la respuesta antiinflamatoria ya que en la histología se demostró que disminuye el infiltrado inflamatorio, además de que en resultados previos, aún no publicados, se demostró que la IL-10 aumenta en homogenados de hígados de las ratas tratadas. Los niveles de IL-10 se recuperan a los del grupo de Intactas a las 10 semanas con el fármaco IFC-305, significando que el fármaco también ejerce efecto en la síntesis y/o liberación de esta citocina restableciendo con el paso del tiempo las concentraciones normales.



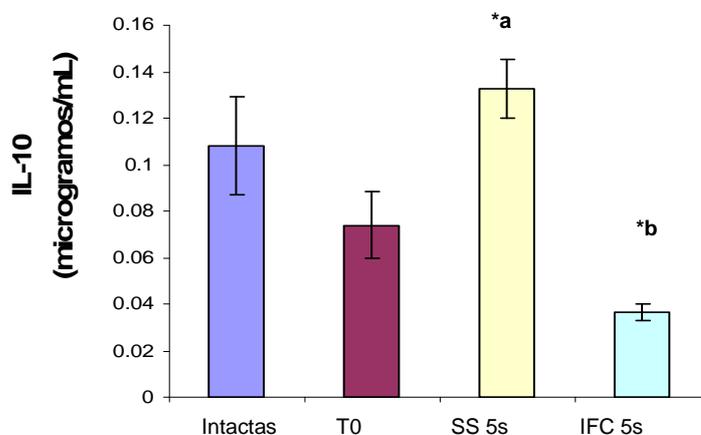
Graf. 13. Citocinas séricas (IL-6, IL-12, INF- γ) (Promedio \pm ES n>3) * p = 0.05 respecto a Intactas

En la **gráfica 13** podemos observar que los niveles de IL-6, IL-12 e INF-gamma para el grupo T0 de CCl₄ son significativamente menores a los del grupo de Intactas.

Considerando a las 3 moléculas como señales proinflamatorias, deberán, del mismo modo que la IL-1 β , determinarse los niveles a una temporalidad más adecuada en donde la inflamación juega un papel central en el proceso del establecimiento de la cirrosis. Sin embargo es notable que los niveles de las 3 moléculas aumentan a las 5 semanas con solución salina, lo que podría contribuir con la perpetuación de la inflamación y la cirrosis.

Por otro lado, tanto a las 5 como a las 10 semanas de tratamiento con el IFC-305, la IL-6, IL-12 y el INF-gamma presentan las mismas concentraciones que el grupo de ratas Intactas, demostrando con ello, nuevamente, que el fármaco es capaz de ejercer un efecto en la síntesis y/o liberación de estas moléculas, normalizando sus niveles a las concentraciones que se presentan en las ratas Intactas.

SUERO. ELISA. IL-10



Graf. 14. IL-10 sérica (Promedio \pm ES n>3) por ELISA. *a (p= 0.02) respecto a IFC 5s *b (p < 0.5) respecto al grupo control (Intactas) y a SS 5

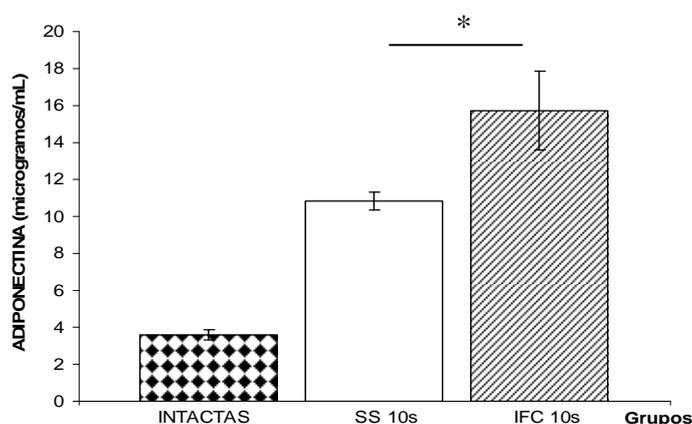
Existe una disminución de esta citocina en el grupo T0 respecto al control, sin embargo aumenta para SS 5s y disminuye significativamente para IFC 5s. Tal como se ha mencionado, esta molécula presenta dos actividades que contribuyen de manera muy distinta en la cirrosis y su reversión, por una parte deseamos que los niveles de IL-10

con propiedades antiinflamatorias aumenten, pero que la IL-10 con propiedades profibrogénicas disminuya, por consecuencia, es necesario hacer un análisis de los niveles de esta molécula presente en hígado y de los equilibrios, con otras citocinas como el TGF- β para poder atribuir una respuesta auténtica a estas variaciones sistémicas en la concentración de IL-10.

Mas allá de todas las respuestas observadas, es necesario aproximarse al posible mecanismo de acción del IFC-305. Es notable que el cambio de fenotipo de las células de Kupffer antiinflamatorias esta jugando un papel esencial en la reversión de la cirrosis. Por ello, se decidió comenzar el estudio de otras moléculas que se ha vinculado a la antiinflamación, ya que una de las vías de señalización en las células de Kupffer está mediada por la adiponectina y la unión a sus receptores adipo R1 Y R2 y adicionalmente se ha involucrado esta molécula en otros fenómenos de regulación de la respuesta inmune.

4. *Evaluar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la activación de la adiponectina durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄.*

6. SUERO. Adiponectina



Graf. 22. Adiponectina en suero (Promedio \pm ES n>3), determinada por RIA. *(p = 0.046)

La **gráfica 22** muestra que existen diferencias significativas en la concentración de adiponectina en suero a las 10 semanas tanto para el grupo con solución salina y aún mayor con IFC-305, sin embargo por cuestiones metodológicas no fue posible determinar lo que ocurría para el T0 y los grupos de 5 semanas.

Es posible que el fármaco esté promoviendo la síntesis de esta molécula, que promueve el cambio a un fenotipo antiinflamatorio de las células de Kupffer, pero habrá que determinar necesariamente sus interacciones con sus receptores y su concentración en el hígado y en particular su efecto sobre las células de Kupffer, para caracterizar su participación en la reversión de la cirrosis y sus efectos sobre la inmunomodulación.

J. RESUMEN DE RESULTADOS

Para realizar un análisis de resultados más integral se muestra a continuación la tabla 3 que resume los resultados más significativos obtenidos experimentalmente en este trabajo.

GRUPOS	T0 : CCl ₄	SS 5s	IFC 5s	SS 10s	IFC 10s
HÍGADO					
CELULARIDAD					
Células de Kupffer	↓	↓	↑	↑	↑
Kupffer M1. CD163	↑	↑	---	↑	↑
CD14	ND	↑	---	↑	↑
Granulocitos	---	↑	↑	↑	↑
Células dendríticas	↑	↑	↑	↓	↓
Células T	ND	---	↑	↑	---
MÉDULA ÓSEA					
Monocitos	ND	ND	ND	↓	---
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA					
Proteína total	---	---	---	---	---
Óxido nítrico	---	↓	↓	---	---
SOD	↑	---	---	---	---
NADPHox	↓	↓	---	---	↓
GHSP	↑	↑	↑	↑	↑
G6PDH	---	---	---	---	---
Arginasa	---	---	↑	---	↑
SUERO					
CITOCINAS					
IL-1β	---	---	---	---	---
IL-4	↓	↑	---	↓	---
IL-6	↓	↑	---	↓	---
IL-10	↑	↑	---	↑	---
IL-12	↓	↑	---	---	---
INF-γ	↓	↑	---	---	---
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA					
Proteína total	↓	---	---	---	---
Óxido nítrico	↑	---	↓	---	---
SOD	---	---	---	↓	---
NADPHox	↑	↓	↓	↓	---
GHSP	↑	---	↑	---	↑
G6PDH	---	↑	↑	↑	---
Arginasa	↑	↑	↑	↑	---
Adiponectina	ND	ND	ND	↑	↑

Tabla 3. Resumen global de los resultados obtenidos.

Simbología:

↑ Aumenta significativamente respecto al grupo de Intactas

↓ Disminuye significativamente respecto al grupo de Intactas

--- No presenta cambios significativos respecto al grupo de Intactas

ND No se determinó experimentalmente

K. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de estudiar el papel de las células Kupffer en la respuesta inmune y/o antioxidante del fármaco experimental IFC-305 en el fenómeno de reversión de la cirrosis experimental inducida por CCl_4 . Todos los resultados se obtuvieron después de la inducción de cirrosis experimental con CCl_4 una vez que se retiró el hepatotóxico. Sabemos, por lo reportado en la literatura, que a este tiempo la cirrosis se ha establecido y es irreversible, que el proceso inflamatorio se ha transformado a una inflamación crónica en la que existe la activación de la respuesta inmune adaptativa.

A las 5 y 10 semanas después del considerado T0, se desea observar que ocurre durante un fenómeno de reversión; en donde la hipótesis indica que el fármaco IFC-305 recuperará la función y la arquitectura del hígado eficientemente respecto a los grupos tratados con solución salina.

La comparación de los datos se realizó respecto al grupo de Intactas; para así determinar si el fármaco es capaz de normalizar los valores al estado basal.

A continuación se enlistan los objetivos planteados en el trabajo, con la finalidad de realizar el análisis de los resultados conforme a los objetivos planteados.

1. *Comparar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la arquitectura histológica del hígado, la población de células de Kupffer y otras células inmunológicas durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl_4 .*

Se observó cualitativamente que en las tinciones con eosina-hematoxilina el tratamiento con IFC-305 reduce el infiltrado inflamatorio y recupera la distribución del parénquima. El fármaco es capaz de disminuir las fibras de colágena después de 5 y 10 semanas de tratamiento, observado en las tinciones de tricrómica de Masson, recuperando paulatinamente la arquitectura normal del hígado, validando con ello el modelo experimental de cirrosis inducida por CCl₄ y el efecto de la reversión de la cirrosis con el IFC-305, tal y como se encuentra reportado en trabajos previos de este mismo grupo de investigación.⁷⁵

Se conoce que en la respuesta inmunológica a CCl₄ están involucradas estirpes inmunológicas que incluyen a los macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas.⁷⁶ En particular, en este trabajo deseábamos conocer lo que sucede con los macrófagos residentes del hígado, las células de Kupffer, que cómo se ha establecido^{12,30} poseen distintos fenotipos de activación que pueden vincularse con los fenómenos de cirrosis y la reversión de la misma por efecto del fármaco IFC-305.

En la citometría de flujo en los porcentajes de población doble positiva total (HIS36+/CD11b+) se detectó una tendencia de cambios en el número total de células de Kupffer HIS36+. Cómo se observa en la **Gráfica 1** la inducción de hepatotoxicidad con CCl₄ disminuye considerablemente la población, esto se ha descrito cómo parte del proceso que indica que la cirrosis ya se ha establecido y que se han superado las etapas agudas de inflamación.¹⁶ Son de remarcar, dos hallazgos: el aumento a las 5 y 10 semanas de esta población HIS36+ por efecto del tratamiento con IFC-305. El más trascendente es el incremento en la población a las 5 semanas con el tratamiento IFC-305; ya que sí dichas células de Kupffer están activadas, estarán mediando un proceso

más acelerado respecto al proceso normal homeostático-inmunológico, el cual puede ser anti-inflamatorio y/o de reparación de tejido. El segundo es que a las 10 semanas existe un incremento semejante en el número total de células de Kupffer tanto para el tratamiento con IFC-305 como para solución salina, independientemente del estado de activación que esté presentado cada población. Es importante relacionar estos datos con dos aspectos importantes: la regulación de otras estirpes inmunológicas y la secreción de mediadores anti-inflamatorios (citocinas).

En una reproducción adicional del experimento, en el que se siguió el mismo esquema de tratamiento, se cuantificaron las células de Kupffer con un marcador diferente (CD163) asociado a una activación clásica y a un fenotipo inflamatorio. En la **Gráfica 2** se puede observar que aumentan las células para el grupo de T0 lo que indica que el hepatotóxico promueve la presencia de células de Kupffer M1, lo mismo ocurre para las 10 semanas con solución salina, lo que significa que el fenotipo inflamatorio permanece. Caso contrario lo observado con el IFC-305 que disminuye el porcentaje de células CD163+ incluso a los niveles de las ratas Intactas, asociando el total de células de Kupffer a otra población activada por el fármaco que, cómo se ha mencionado, podría contribuir en la reversión de la cirrosis.

En el caso de los resultados obtenidos para el CD14 por western blot (**Figura 16**), podemos mencionar que existe variación entre los grupos de solución salina vs IFC-305, y que esta disminución en la presencia de la cantidad de CD14 para el IFC-305 podría relacionarse por un lado con el fenómeno inflamatorio^{33, 34} ya que la expresión de esta molécula se exagera en al fenotipo fagocítico y citotóxico M1, pero al mismo

tiempo podría reflejar cambios en la cantidad de monocitos reclutados, ya que estas células también expresan CD14.

Estos resultados nos hablan de la participación de las células de Kupffer en el proceso de resolución de la inflamación y de la capacidad del fármaco de modular no sólo el número de estas células, sino potencialmente los fenotipos de activación.

En lo que concierne a las otras estirpes inmunológicas del hígado, como se ha descrito, la proliferación de los linfocitos T está asociada a una activación clásica de tipo M1⁷⁷, por tanto, una disminución de esta población y de células dendríticas (**Tabla 1**) por efecto del tratamiento, apoya una hipótesis: El fenotipo para los macrófagos presentes con IFC-305 a las 10 semanas es de tipo M2. Además se tiene reportado que la respuesta defensiva en el modelo de CCl₄ es de tipo Th₂ que apoya de la misma manera el fenotipo M2. Se revela también una disminución en los monocitos de manera significativa respecto al grupo control, lo que nos habla de que los macrófagos presentes, no son circulantes únicamente y que en su mayoría han modificado su fenotipo ya sea a M1 o M2 con cambios en la intensidad de la expresión de estos marcadores a las 10 semanas de tratamiento (CD11b/c).

Un dato que nos permite asociar sí estos macrófagos están migrando al hígado es conocer sí existe algún cambio en los precursores de estas células a nivel de médula ósea. Se conoce el proceso de reclutamiento y migración se encuentran alterados en la cirrosis, el cual está mediado principalmente por MCP-1. Como se ha detallado en el resumen de resultados los precursores de médula ósea están disminuidos en el grupo con solución salina a las 10 semanas (**Tabla 2**) y regresan a sus valores normales con el fármaco. Este dato refuerza la propiedad de la molécula IFC-305 y su núcleo de

adenosina, que activa mecanismos celulares, cómo la proliferación, en este caso a nivel de médula ósea.

A las 5 semanas las células dendríticas aumentan para solución salina y para el grupo tratado con IFC-305, tal como sucede en el T0, sin embargo disminuyen significativamente respecto a Intactas a las 10 semanas, lo que significará que probablemente estas células ya no participan en estas etapas. Los granulocitos aumentan tanto con el fármaco como con solución salina, pero habrá que determinar dentro de esta población heterogénea, cuál es cada una de las estirpes y el estado de activación y la secreción de citocinas señal que proveen cada una.

Estos fenómenos deberán ser estudiados a profundidad para determinar su contribución en el fenómeno de reversión de la cirrosis, pero a nivel general indican un fenómeno de inmunomodulación.

Además de la asociación con otras estirpes de la respuesta inmunológica, es necesario conocer el estado general tanto a nivel de hígado como a nivel sistémico. Se ha confirmado muy recientemente que las células de Kupffer son los principales secretores de citocinas en hígado a través de NF- κ B y que además median diversos mecanismos oxidantes/antioxidantes por sus actividades enzimáticas inherentes, cobrando mayor importancia terapéutica en el tratamiento de patologías hepáticas asociando su participación en mecanismos de inmunomodulación.⁷⁸

2. *Determinar actividades enzimáticas asociadas con la respuesta oxidante y antioxidante en el hígado y a nivel sistémico.*

En el tejido hepático los cambios porcentuales en los niveles de proteína no mostraron diferencias entre los grupos experimentales. Los niveles de NO no se ven modificados respecto al grupo de Intactas a nivel de tejido, sin embargo incrementan con el CCl₄ en los niveles séricos, como resultado, en parte, de la activación de la iNOS de las células de Kupffer en respuesta al estrés que produce metabolizar el CCl₄ y/o la muerte de los hepatocitos. Dicho incremento disminuye tanto a las 5 como a las 10 semanas con el tratamiento IFC-305, lo que se traduce en una reducción de los niveles de ERO en un fenómeno potencialmente antioxidante. Al mismo tiempo, en el grupo tratado con solución salina durante 10 semanas no se presentaron cambios en los niveles de NO, lo que significa que el organismo es capaz de compensar esta producción de ERO mediante algún mecanismo enzimático antioxidante una vez que se ha retirado la fuente de estrés. Cabe resaltar que el origen específico del NO en ambos resultados se desconoce ya que existen diversas estirpes que lo producen, por lo que se requerirá de un experimento adicional en el que se determine la fuente de dicho NO para poder interpretar de mejor manera estos resultados a través de la cuantificación de la iNOS o la eNOS por western blot y/o inmunohistoquímica.

Al observar lo que ocurre con el ión superóxido producido por la NADPHox con el CCl₄, a nivel de tejido, hay una disminución en la actividad, ya que de manera general hay cambios en la función hepática, lo cual no se refleja necesariamente a nivel sistémico ya que la actividad incrementa a nivel sérico. En el caso particular de las células de Kupffer y los macrófagos en general, esta enzima es la responsable de dar comienzo al estallido respiratorio que tiene como finalidad eliminar agentes patógenos o un exceso de células necróticas, por lo que el incremento en su actividad es un reflejo del combate que lleva a cabo con el gran número de hepatocitos necróticos presentes

con el CCl₄, activada por INF-gamma, y los cambios de actividad se reflejaría indirectamente en los niveles de anión superóxido que se han determinado.

Al inicio con CCl₄, se percibe un incremento a nivel sérico de los niveles de anión superóxido, pero no del mismo modo a nivel de tejido, indicando probablemente, que no sólo los macrófagos circulantes como primeras defensas inmunológicas están actuando, sino que en el tejido (Kupffer) lo hacen de manera distinta ya que el origen de esta molécula no es exclusivo de esta estirpe, existen otras fuentes que contribuyen a la presencia de esta ERO. Sin embargo el fármaco, cualquiera que fuese el origen, es capaz de recuperar los niveles normales a las 10 semanas de tratamiento en el suero e incluso disminuir los niveles en el tejido.

Es remarcable el hecho de que un fenómeno de estrés oxidante la presencia de ERO no conforman en su totalidad la respuesta del organismo, la activación del sistema de defensas enzimáticas promueve que se reestablezca un equilibrio oxidante/antioxidante, pero al mismo tiempo una respuesta enzimática exacerbada estaría contribuyendo en el desequilibrio.

Al detenernos en lo que ocurre con 2 enzimas antioxidantes que combaten el estrés oxidante la SOD y GHSP encontramos que los cambios en estas enzimas difieren nuevamente entre los de tejido respecto al sérico. Con el CCl₄ se presenta un aumento en la actividad de la ZnCu-SOD tisular, acorde al mecanismo hepatotóxico que produce un aumento en ERO que el organismo debe combatir a nivel local. Los niveles de esta enzima con el tratamiento IFC-305 y con solución salina a las 5 y 10 semanas no presentan cambios respecto al grupo de Intactas en tejido. A nivel sérico se presentan

cambios únicamente en el grupo de solución salina a las 10 semanas. Teorizando un poco en el mecanismo, tanto del compuesto como la eliminación del hepatotóxico, al no existir un agente generador de estrés oxidante, el tejido no activa la enzima para su combate, recuperando los niveles normales de actividad en el tejido. Esto a diferencia de lo que sucede en suero, donde a las 10 semanas con solución salina, la pérdida de la función normal se refleja en una caída de la actividad que no se observa con el tratamiento de IFC-305, el cual potencialmente está restableciendo la homeostasis sistémica ya que no se observan diferencias respecto al grupo de Intactas.

En el caso de la GHSP se observa que para todos los grupos su actividad está incrementada respecto al grupo de Intactas y esto es coherente debido a que el metabolismo del CCl_4 está asociado al sistema glutatión y en todos los casos se requiere de este sistema de detoxificación y antioxidación. A nivel de suero ocurre que el fármaco es capaz de activar esta defensa antioxidante, un indicador de la búsqueda del equilibrio entre especies reactivas de oxígeno y mecanismos antioxidantes, en donde el tratamiento con IFC-305 está activando este tipo de defensas a diferencia de lo que sucede con la solución salina tanto a las 5 como a las 10 semanas de tratamiento, un fenómeno que incluso se ha reportado en trabajos previos del laboratorio.

Con la actividad de G6PDH no se observaron cambios en tejido, pero a nivel de suero los niveles regresan a los del grupo Intactas a las 10 semanas de tratamiento con el fármaco, contribuyendo a recuperar la capacidad del organismo de generar niveles adecuados de poder reductor de NADPH, necesario como cofactor en múltiples actividades enzimáticas, controlando con ello otras respuestas enzimáticas.

Es importante remarcar que los fenómenos presentados a nivel tisular, no son exclusivos de la estirpe que estudiamos (células de Kupffer), por lo que es indispensable realizar los estudios *in vitro*, para dar paso a conocer su participación específica en todos estos procesos.

Ahora bien, la vinculación de estos resultados con algunas de las moléculas de inflamación como las citocinas nos permite acercarnos más a la clasificación particular del estado de activación de cada de las poblaciones de macrófagos observada.

3. Comparar el efecto del fármaco IFC-305 sobre los niveles séricos de las citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF- γ , TNF- α y MCP-1 durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄.

Inicialmente IL-1beta, junto con TNF- α , secretada principalmente por células de Kupffer juega un papel de señalización potencializadora del daño, magnificando así la activación de moléculas de adhesión endoteliales y la migración leucocitaria. Sin embargo ambas moléculas están descritas para fases tempranas de inflamación, por lo que es necesario estudiarlas en las primeras semanas de tratamiento, en donde potencialmente el estado de activación a encontrarse será el inflamatorio.

De manera global, las citocinas cuantificadas en las **Gráficas 12 y 13** durante las primeras 10 semanas con CCl₄ no presentaron niveles detectables. Esto se puede asociar a la **Gráfica 1**, ya que en ella se observa que la población porcentual de macrófagos ha disminuido. La población de los macrófagos que contribuyen en las

etapas de inflamación pertenecen al fenotipo M1, la señal de activación será vía PAMP's asociados a las células apoptóticas provenientes de los hepatocitos que han metabolizado el CCl₄ vía citocromo P450 I.I.E.I,⁷⁹ y se comprueba con la **Gráfica 2**, en donde aumenta la cantidad de células de Kupffer CD163+ inflamatorias

Lo que ocurre a las 5 semanas del tratamiento con solución salina y con IFC-305 con las citocinas cuantificadas nos habla de dos fenotipos adicionales.

Cómo recordaremos, en procesos de cirrosis con CCl₄ se ha descrito que el tipo de respuesta está polarizada a una de tipo Th2 regulada por citocinas IL-13 y 21, mediada por linfocitos Th2 (colaboradores). Este tipo de respuesta está vinculada con el fenotipo de activación M2.

En nuestro modelo, por una parte, existen diferencias en el número de macrófagos, en donde observamos que la recuperación es más lenta para el grupo con solución salina, los niveles de INF- γ se encuentran elevados en el grupo SS 5s, lo que indicaría que estos macrófagos podrían estarse activando por esta vía, y además existe un incremento en linfocitos T acorde con el INF- γ , lo que nos daría pie a caracterizar la activación en el grupo de solución salina de tipo M1 tal como ocurre con el CCl₄, en donde la evolución en el tejido es patológica.

IL-6 asociada a la fase aguda de inflamación e IL-12 como la principal activadora de linfocitos para la secreción de INF- γ , no presentan cambios respecto al grupo de Intactas, a pesar de que normalmente se espera un aumento de ambas como citocinas proinflamatorias, en el caso del hígado se tiene bien caracterizado que tanto IL-6 como

TNF- α están asociadas a proliferación, por lo que sí el IFC-305 a las 5 y 10 semanas conserva los niveles de Intactas estará acompañado de una recuperación a un estado normal sistémico, posterior a la disminución del proceso inflamatorio y una proliferación controlada de hepatocitos.

Otra de las citocinas que nos revela el estado de activación de los macrófagos es la IL-4. En este caso podemos observar que dicha citocina está disminuida para el CCl₄ pero se recuperan los niveles normales con el tratamiento de IFC-305 a las 5 y 10 semanas, sin embargo este dato debe corroborarse por otro método como puede ser ELISA o Western Blot, para poder sustentar la hipótesis de que los macrófagos con el tratamiento de IFC-305 son de tipo M2, ya que adicionalmente no se observan diferencias significativas a las 10 semanas al comparar ambos grupos SS 10s vs IFC 10s.

Activación de las células de Kupffer

- 2^a. *Corroborar los cambios en la actividad enzimática de arginasa por una técnica alternativa, empleando western blot para la detección de Arginasa tipo I.*

4. *Evaluar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la activación de la adiponectina durante la cirrosis experimental por el modelo de CCl₄*

A las 10 semanas (**Gráficas 1**) el porcentaje de células HIS36+, células de Kupffer totales, se recuperan para ambos tratamientos IFC 10s y SS 10s, pero no ocurre lo mismo para el porcentaje de células CD163+ (**Gráfica 2**) inflamatorias²⁹, en donde el IFC-305 disminuye aún más esta población respecto a los grupos de solución salina. Sin

embargo, existen tres datos que orientan de mejor manera la causa de que no existan diferencias en el fenómeno presente.

A las 5 semanas para ambos grupos se revela que los macrófagos presentes en el grupo de solución salina son de fenotipo distinto, probablemente M2c y M1, los cuales cómo recordaremos, son los responsables de dar pie a la deposición de matriz extracelular por TGF- β , ya que los niveles de IL-10 están por encima de las ratas Intactas. Este dato se corroboró por ELISA, en muestras de suero **Gráfica 14**, donde se observó la misma tendencia y la diferencia es significativa, esta citocina, IL-10 descrita como la principal anti-inflamatoria tiene asociado al igual que el TGF- β el fenómeno profibrogénico, por lo que un aumento en una patología fibrogénica como la cirrosis estaría contribuyendo al desorden tisular, caso que no ocurre con el IFC-305 a este tiempo.

La arginasa se conoce es un marcador del fenotipo de células de Kupffer anti-inflamatorias^{31, 62} y podemos observar que los niveles de expresión de dicha proteína están por arriba de los normales en las ratas tratadas con IFC-305 (**Gráfica 11, Fig. 17**). Es éste, quizá uno de los resultados que apoyan firmemente la hipótesis de que el fármaco es capaz de modular el estado de activación de las células de Kupffer a un fenotipo M2 anti-inflamatorio.

La adiponectina que se ha descrito como la molécula capaz de “desactivar” a los macrófagos o promover un cambio de fenotipo anti-inflamatorio; en el modelo de etanol⁵⁷ favorece la recuperación del tejido, disminuyendo la secreción de TNF- α y ERO, deteniendo así la evolución del daño tisular; aumenta por efecto del IFC-305 a las 10 semanas de tratamiento, tal y cómo lo observamos en la **gráfica 22**.

Todo lo anterior apunta a corroborar la hipótesis planteada en la que sí el fármaco IFC-305 (aspartato de adenosina) además de recuperar el balance energético y el estado de óxido-reducción de la célula permite la recuperación y modulación de la activación de las células de Kupffer y otras estirpes inmunológicas del hígado durante su uso como tratamiento en reversión de la cirrosis, al tiempo que ejerce un efecto en células estelares y hepatocitos. Todo lo anterior adicionalmente podrían estar mediando un fenómeno de activación de las células de Kupffer a un fenotipo anti-inflamatorio. Pero aún queda mucho campo para experimentar, habrá que determinar si el fenómeno es detectable en un modelo *in vitro* y con ello profundizar en los mecanismos de activación y las cascadas de señalización que pudieran involucrarse en ello, y así poder dirigir esta propiedad del fármaco en el combate de otras patologías asociadas a la polarización de los macrófagos dando paso a nuevas perspectivas.

L. PERSPECTIVAS

- Elucidar el mecanismo por el cuál el fármaco IFC-305 interacciona con las células de la respuesta inmune.
- Determinar modificaciones en las células de la respuesta inmune en otros órganos asociados como son el ganglio mesentérico y/o el bazo.
- Cuantificar diversas citocinas a nivel de homogenado de hígado y caracterizar la expresión de citocinas y/o enzimas involucradas en la antioxidación en las células de Kupffer.
- Estudiar los fenómenos de activación por el fármaco IFC-305 de las células de Kupffer a nivel in vitro.
- Determinar la interacción del fármaco IFC-305 con las células de Kupffer ya sea a través de los receptores de adenosina, de los trasportadores o metabolismo.

M. CONCLUSIONES

El fármaco IFC-305 es capaz de recuperar la arquitectura del tejido hepático, de inmunomodular al tiempo que modifica los mecanismos antioxidantes de respuesta al CCl₄.

Durante las primeras 10 semanas con CCl₄ se da el proceso inflamatorio con una activación de macrófagos M1, la activación de la NADPHoxidasa y la iNOS promueven la formación de NO y de ión superóxido, el aumento de células de Kupffer inflamatorias CD163+, de células dendríticas CD103+ y de granulocitos RP-1+.

En las 5 semanas de tratamiento con IFC-305 es posible observar, en comparación con el grupo de solución salina que:

- Disminuyen los niveles de INF- γ , IL-4, IL-6 e IL-12.
- Incrementa el porcentaje total de células de Kupffer HIS36+; la población de macrófagos que se está recuperando no se encuentra activada por la vía clásica M1, ya que las células CD163+ están disminuyendo a la par de la inflamación.

En las 10 semanas de tratamiento con IFC-305 es posible observar, en comparación con el grupo de solución salina al mismo tiempo que:

- No existe diferencia en el número total de células de Kupffer en hígado HIS36+, ya que en ambos casos incrementa.
- Disminuye el número de linfocitos T en hígado CD3+ y de células dendríticas.
- Aumenta el número de monocitos precursores de médula ósea CD11b/c+ y el número de granulocitos.

- Las citocinas INF- γ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 se recuperan a los niveles del grupo de ratas Intactas

A las 10 semanas existen dos estados diferentes de activación para las células de Kupffer. Para el grupo con solución salina pertenecen a los macrófagos inflamatorios y el IFC-305 está activando potencialmente un fenotipo de macrófagos anti-inflamatorios con un incremento en los niveles de arginasa y adiponectina, contribuyendo con ello a la reparación del tejido hepático.

No existen cambios en IL-1 la cual es una citocina de fase aguda, por lo que es necesario cuantificarlas en estados más tempranos de inflamación y a tiempos más cortos en los tratamientos.

No fue posible detectar cambios en los niveles de MCP-1 y TNF- α , con la metodología empleada por Milliplex®

REFERENCIAS

- 1 Cabrales Romero MP. (2010) *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 Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. México.
- 2 Velasco Loyden, G. (2006) *Inhibición de la activación de las células estelares hepáticas*. XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. México.
- 3 <http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/pnscap1.pdf>
- 4 Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen H, Scheuer PJ, Sobin LH. (1977) *The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification*. Bull World Health Organ; 55: 521–540.
- 5 Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. (1978) *The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization*. J of Clin Pathol; 31, 395-414.
- 6 Imai, S. and Nakazawa, M. (1991) *Role of adenosine and adenine nucleotides in the biological system*. Elsevier. Amsterdam.
- 7 Drury, A.N. and Szent-Györgyi, A. (1929) *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*. J. Physiol; 68, 213–237.
- 8 Ohta A, Sitkovsky M. (2009) *The adenosinergic immunomodulatory drugs*. Curr Opin Pharmacol; 9 (4):501-6.
- 9 Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, González-Pérez A, Gaya J, Miquel R, Arroyo V. (2005) *Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells*. J Leukoc Biol. Oct; 78(4):871-8.
- 10 Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. (2002) *Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation*. Nat. Rev. Immunol; 2, 787–795.
- 11 Haskò, G, Cronstein, BN. (2004) *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. TRENDS in Immunology; 25. No. 1: 33-39.
- 12 Mosser, D. and Edwards JP. (2008) *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol; Dec; 8 (12):958-69.
- 13 Crofton, R.W., Martina, M.C., Diesseihoff-den Dulk, M.M.C., and Van Furth, R. (1978) *The origin, kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state*. J. Exp. Med; 148:1.
- 14 Mirodzhov GK, Pavlov VL. (1991) *Liver sinusoidal cells: nature, functional characteristics, and cooperative relationships*. Arkh Patol.;53 (4):72-6.
- 15 Rombouts K, Pinzani M. (2011) *What is new in the liver sinusoids? Meeting report, 16th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (ISCHS)*. Fibrogenesis Tissue Repair 13;4(1):27
- 16 J. Clària y E. Titos. (2004) *La célula de Kupffer*. Artículo especial. 91.085. Gastroenterol Hepatol; 27(4):264-73.
- 17 Munthe-Kaas AC, Berg T, Seglen PO, Seljelid R. (1975) *Mass isolation and culture of rat kupffer cells*. J Exp Med; 141 (1):1-10.
- 18 Wisse E. (1974) *Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells*. J Ultrastruct Res; 46:393-426.

-
- 19 Praaning, D.P., Dalen, and Knook DL. (1982) *Quantitative determination of in vivo endocytosis by rat liver kupffer and endothelial cells facilitates by an improved cell isolation method*. FEBS Lett. 141(2):229-32.
- 20 Sun WB, Han BL, Peng ZM, Li K, Ji Q, Chen J, Wang HZ, Ma RL. (1998) *Effect of aging on cytoskeleton system of Kupffer cell and its phagocytic capacity*. World J Gastroenterol ; 4:77-9.
- 21 Knook DL, Sleyster EC, Teutsch HF. (1980) *High activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Kupffer cells isolated from rat liver*. Histochemistry; 69(2):211-6. <Abstract only>
- 22 Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, Kolios G, Kouroumalis EA. (2003) *Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures*. Cell Biol Int;27(1):67-73.
- 23 Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. (1985) *The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3*. Immunology; 54:589-99.
- 24 Wacker, HH, Radzun, HJ and Parwaresc, MR. (1985) *Ki-M2R, a new specific monoclonal antibody, discriminates tissue macrophages from reticulum cells and monocytes in vivo and in vitro*. J Leukoc Biol; 38(4):509-20.
- 25 Maruiwa, M, Mizoguchi A, Russell GJ, Narula N, Stronska M, Mizoguchi E, Rabb H, Arnaut MA, Bhan AK. (1993) *Anti-KCA-3, a monoclonal antibody reactive with a rat complement C3 receptor, distinguishes Kupffer cells from other macrophages*. J Immunol; 150 (9): 4019-4030.
- 26 Pulford, KA, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC, Mason DY. (1989) *KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections*. J Clin Pathol; 42(4): 414-421.
- 27 Alabraba EB, Curbishley SM, Lai WK, Wigmore SJ, Adams DH. (2007) *A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells*. J Immunol Methods; 326(1-2):139-44.
- 28 Kindt, T. *Immunología de Kuby*. 6ª. Ed. MacGraw Hill Interamericana, México, 2007. pp. A10-A19
- 29 Polfliet MM, Fabriek BO, Daniëls WP, Dijkstra CD, van den Berg TK. (2006) *The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role un inflammatory mediator production*. Immunobiology; 211(6-8):419-25.
- 30 Teixeira-Clerc, F. (2010) *Cannabinoid receptor 2 protects from alcoholic liver disease by promoting Kupffer cell polatization toward an anti-inflamatory phenotype*. INSERM, 15th ISCHS, California, USA.
- 31 Laskin, D. (2009) *Macrophages and Inflammatory Mediators in Chemical Toxicity: A Battle of Forces*. Chem. Res. Toxicol; 22, 1376-1385.
- 32 Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr, Gause WC, Leibovich SJ, Haskó G. (2011) *Adenosine promotes alternative macrophage activation via A(2A) and A(2B) receptors*. FASEB J;26(1):376-86.
- 33 Järveläinen HA, Oinonen T, Lindros KO (1997) *Alcohol-Induced Expression of the CD14 Endotoxin Receptor Protein in Rat Kupffer Cells*. Alcohol Clin Exp Res. Nov;21(8):1547-51.
- 34 Takeda, Y, Arai S, Mori A, Imamura M. (2003) *High expression of the CD14 gene and interleukin-1 β gene in the liver and lungs of cirrhotic rats after partial hepatectomy*. J Surg Res; 115(1):9-17.
- 35 Canbay A, Friedman S, Gores GJ. (2004) *Apoptosis: The Nexus of Liver Injury and Fibrosis*. Hepatology; 39: 273-279.
- 36 Bhatnagar R, Schirmer R, Ernst M, Decker K. (1981) *Superoxide release by zymosan-stimulated rat Kupffer cells in vitro*. Eur J Biochem; 119:171.

-
- 37 Park PH, Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Nagy LE. (2006) *Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: Role of adiponectin*. J Gastroenterol Hepatol. 21 Suppl 3:S30-3.
- 38 Van Furth R. (1980) *Monocyte origin of Kupffer cells*. Blood Cells; 6:87-92.
- 39 Geerts A, Schellinck P, Bouwens L, Wisse E. (1988) *Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration*. J Hepatol; 6:50-6.
- 40 Edwards M.J., Keller B.J., Kauffman F.C., Thurman R.G. (1993) *The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol; Apr;119(2):275-9.
- 41 Alric L, Orfila C, Carrere N, Beraud M, Carrera G, Lepert JC, Duffaut M, Pipy B, Vinel JP. (2000) *Reactive oxygen intermediates and eicosanoid production by kupffer cells and infiltrated macrophages in acute and chronic liver injury induced in rats by CCl4*. Inflamm Res; 49(12):700-7.
- 42 Decker, K. (1990) *Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)*, Eur. J. Biochem. 192, 245-2611
- 43 Muriel P, Escobar Y. (2003) *Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride*. J Appl Toxicol. Mar-Apr; 23(2):103-8.
- 44 Bataller R, Ginès P. (2002) *Nuevas perspectivas terapéuticas de la fibrosis hepática: bases patogénicas*. Med Clin (Barc); 118:339-46
- 45 Gressner AM, Zerbe O. (1987) *Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture*. J Hepatol; 5:299-310
- 46 Friedman SL. (2003) *Liver fibrosis -- from bench to bedside*. J. Hepatol;38 Suppl 1:S38-53. Review
- 47 Kindt, T. *Inmunología de Kuby*. 6ª. Ed. Mc Graw Hill. México, 2007. pp 344-345.
- 48 Armendariz-Borunda J, Seyer JM, Postlethwaite AE, Kang AH. (1991) *Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat livers produce chemotactic factors for fibroblasts and monocytes: the role of tumor necrosis factor-alpha*. Department of Medicine, University of Tennessee, Memphis. Hepatology; Nov;14(5):895-900.
- 49 Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. (1997) *Antibodies to Tumor Necrosis Factor Alfa Attenuate Hepatic Necrosis and Inflammation Caused by Chronic Exposure to Ethanol in the Rat*. Hepatology; 26 (6): 1530-1537.
- 50 <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/quimio/quimio.htm> <consulta: MAYO 2009>
- 51 Williams CD, Antoine DJ, Shaw PJ, Benson C, Farhood A, Williams DP, Kanneganti TD, Park BK, Jaeschke H. (2011) *Role of the Nalp3 inflammasome in acetaminophen-induced sterile inflammation and liver injury*. Toxicol Appl Pharmacol; 252(3):289-97.
- 52 Gieling RG, Wallace K, Han YP. (2009) *Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 296(6):G1324-31.
- 53 Moshage, H. (1997) *Cytokines and the hepatic acute phase response*. J pathol;181:257-266.
- 54 Kayano, K Okita K.(2000) *Does IL-6 regulate liver fibrosis / cirrhosis directly and indirectly?* J Gastroenterol; 35:250–251.
- 55 Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF. (1990) *Plasma tumor necrosis factor a predicts decreased long term survival in severe alcoholic hepatitis*. Alcohol Clin Exp Res; 14:255-259.

-
- 56 Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. (2011) *What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases?* Nat Rev Rheumatol;7(9):528-36.
- 57 Huang H, Park PH, McMullen MR, Nagy LE. (2008) *Mechanisms for the anti-inflammatory effects of adiponectin in macrophages.* J Gastroenterol Hepatol; 23 Suppl. 1; S50–S53.
- 58 Romanque P, Uribe M M, Videla LA. (2005) *Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico.* Rev Méd Chile; 133: 469-476
- 59 Kimiko AOKI, (2008) *Nitric Oxide and Peroxynitrite Regulate Transporter Transcription in Rat Liver Slices* Biol. Pharm. Bull. 31(10) 1882—1887
- 60 Kimiko AOKI, (2008) *Effect of Aminoguanidine on Lipopolysaccharide-Induced Changes in Rat Liver Transporters and Transcription Factors,* Biol. Pharm. Bull. 31(3) 412—420
- 61 <http://www.info-farmacia.com/bioquimica/ciclo-de-la-urea>
- 62 Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. (1995) *Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages.* Biochem Biophys Res Commun; 206(2):667-73.
- 63 Wang XP, Chen YG, Qin WD, Zhang W, Wei SJ, Wang J, Liu FQ, Gong L, An FS, Zhang Y, Chen ZY, Zhang MX. (2011) *Arginase I Attenuates Inflammatory Cytokine Secretion Induced by Lipopolysaccharide in Vascular Smooth Muscle Cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol; 31:1853-1860.
- 64 Kono H, Rusyn I, Yin M, Gäbele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. (2000) *NADPH oxidase- derived free radicals are key oxidants in alcohol –induced liver disease.* J Clin Invest;106(7):867-72.
- 65 García, B. (1997) *Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutase.* Rev Cubana Invest Biomed 14(1): 1997
- 66 Bonilla, J. (2007) *Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Respuesta de los hematíes y otras células humanas a la disminución en su actividad.* Revista Colombia Médica. Vol.38, no. 1: 52-60.
- 67 Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez J, Chagoya de Sánchez V. (1990) *Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats.* Hepatology; 12(2):242-8.
- 68 Hernández-Muñoz R, Santamaría A, García-Sáinz JA, Piña E, Chagoya de Sánchez V. (1978) *On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine.* Arch Biochem Biophys;190(1):155-62
- 69 García-Sáinz JA, Hernández-Muñoz R, Glender W, Piña E, Chagoya de Sánchez V. (1980) *Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism.* Biochem Pharmacol; 29(12):1709-14.
- 71 Suárez Cuenca, J. (2001) *Activación de los genes HGF, TGF- α y TGF- β 1 durante el efecto de la adenosina en la reversión de la lesión hepática tipo cirrosis inducida por tetracloruro de carbono en ratas.* Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM, México.
- 70 Pérez Carreón, J. (2006) *Aplicación de los microarreglos de DNA y el RT-PCR cuantitativo para el estudio de la cirrosis experimental en rata y las estrategias de su reversión.* XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, México.
- 72 Yoshinori S, Toru K, Nobuyoshi S. (2007) *Immunohistochemical analyses of cell–cell interactions during hepatic organoid formation from fetal mouse liver cells cultured in vitro.* Histochem Cell Biol; 28:521–531

73 Kmiec Z. (2001) *Cooperation of liver cells in health and disease*. Adv Anat Embryol Cell Biol;161: III-XIII, 1-151.

74 Bergmeyer, HU, Bergmeyer J, Bial, M. *Methods of Enzymatic Analysis Samples, Reagents, Assessment of Results*. John Wiley & Sons Inc.

75 Pérez-Carreón JI, Martínez-Pérez L, Loredó ML, Yañez-Maldonado L, Velasco-Loyden G, Vidrio-Gómez S, Ramírez-Salcedo J, Hernández-Luis F, Velázquez-Martínez I, Suárez-Cuenca JA, Hernández-Muñoz R, de Sánchez VC. (2010) *An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl(4)-induced rat cirrhosis*. Int J Biochem Cell Biol; 42(2):287-96.

76 Berezhkova RV, Romanov V (1981) *Localization of immune complexes in the liver in experimental cirrhosis*. Arkh Patol; 43(11):25-9.

77 Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJ, van Hall T, van der Burg SH. (2011) *M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells*. J Immunol; 187(3):1157-65. Epub 2011 Jun 27.

78 Fernández, E. (2011) *Thalidomide and its Analogs: A potential Immunomodulatory alternative for treating liver diseases and cirrhosis*. Nova, Chapter 1

79 Johnston DE, Kroening C. (1998) *Mechanism of early carbon tetrachloride toxicity in cultured rat hepatocytes*. Pharmacol Toxicol. Dec;83(6):231-9.