

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD



REGULACIÓN DE LA INTERLEUCINA 8 POR LA INTERLEUCINA 4 Y 10 EN  
CELULAS HepG2 TRATADAS CON ACETALDEHIDO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

M. en BIOL. EXP. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

Comité tutorial:

TUTORA: DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

ASESORES: DR. DAVID KERSHENOVICH STALNIKOWICZ

DR. JOSE C. FERNANDEZ-CHECA

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

MÉXICO, D.F.

2004

## RESUMEN

Las citocinas pro-inflamatorias y las quimiocinas, como la interleucina 8 (IL-8), son mediadores importantes del daño y la reparación hepática. El propósito del presente trabajo fue el estudio de la regulación de la IL8 por las interleucinas 4 y 10 en células HepG2 tratadas con Acetaldehído (Ac). Las células fueron tratadas con IL-10 e IL-4 previo a la exposición con el Ac, examinamos la producción de IL-8 por medio de RT-PCR y ELISA, así como la activación de los factores de transcripción que controlan su expresión. Los resultados mostraron que el tratamiento con Ac produce un incremento en la inducción y secreción de la IL-8 que se previene con el pretratamiento de la IL-4; IL-10 no previno la producción de IL-8. Consistente con estos resultados el Ac incrementó la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP1, dicha activación fue prevenida por el pretratamiento con IL-4, por no con la IL-10, incluso el pretratamiento con solo IL-10 eleva la síntesis de IL-8 en una forma dependiente de la activación del NF- $\kappa$ B. En contraste con la función pro-inflamatoria que se observó en las células HepG2, la IL-10 no mostró tener efecto alguno en las células WRL68, una línea hepática fetal humana. Más aún IL-10 no indujo la degradación del inhibidor natural del NF- $\kappa$ B en cultivos primarios de hepatocitos de rata. En conclusión podemos afirmar que los presentes datos demuestran que la IL-4 tiene un claro efecto anti-inflamatorio en las células HepG2, previniendo la producción de la IL-8 y que la regulación de las quimiocinas es un proceso muy complejo que depende de la naturaleza y del tipo celular.

## **ABSTRACT**

Proinflammatory cytokines and chemokines, such as interleukin-8 are important mediators of hepatic injury and repair following an insult. The purpose of this work was to study the regulation of IL-8 by IL-4 and IL-10 in HepG2 cells treated with Acetaldehyde (Ac). HepG2 cells were pretreated with IL-10 or IL-4 before exposure to Ac, examining IL-8 expression by RT-PCR and Western blot. Results. Ac treatment produced an increment in IL-8 induction and secretion that was prevented by IL-4 pretreatment, while IL-10 pretreatment failed to decrease Ac-induced IL-8 production. Consistent with these findings Ac increased NF- $\kappa$ B and AP1 activation that were prevented by IL-4 but not IL-10 findings accompanied by greater I $\kappa$ B- $\alpha$  levels in IL-4 but not IL-10 pretreated cells. In contrast to the proinflammatory role of IL-10 in HepG2, IL-10 did not show any change in the activation of NF- $\kappa$ B by Ac in WRL-68 cells, a human fetal hepatic cell line. Moreover, IL-10 did not induce the degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in the cellular extract from rat primary cultured cells. While the present findings demonstrate the anti-inflammatory role of IL-4 in preventing the expression of IL-8 by Ac, the regulation of chemokines by anti-inflammatory cytokines is complex and depends on the cellular lineage.

## INDICE

	Página
Resumen	8
Abstract	9
I. INTRODUCCION	12
I.1 Patología de la enfermedad hepática alcohólica	12
I.2 Mecanismos celulares y moleculares del daño hepático	
Inducido por el alcohol	13
I.3 Citocinas y factores de crecimiento	16
I.4 Interleucina 8	17
I.5 Citocinas anti-inflamatorias	20
I.6 Líneas celulares	23
II OBJETIVOS	24
II.1 Objetivo General	24
II. Objetivos Particulares	24
III HIPOTESIS	25
IV MATERIAL Y METODOS	25
IV.1 Cultivo Celular	25
IV.2 Diseño Experimental	27
IV.3 Determinación de la secreción de la IL8	28
IV.4 Aislamiento del ARN total	28

IV.5 Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa	29
IV.6 Obtención de proteína nuclear	30
IV.7 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)	31
IV.8 Determinación de los niveles de IκB	32
IV.9 Determinación del contenido de proteína	34
IV.10 Ensayo de viabilidad celular	34
IV.11 Análisis estadístico	35
V RESULTADOS	36
VI DISCUSION	52
VII CONCLUSIONES	58
VIII REFERENCIAS	59
IX CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTICULO	66
X MANUSCRITO DEL ARTICULO	67

## **I. INTRODUCCION.**

Las enfermedades hepáticas constituyen la quinta causa de muerte en México. En 1999 se presentaron 27,040 defunciones relacionadas con éstas, de las cuales 13,417 fueron causadas por el consumo de alcohol (Etanol, EtOH) representando el 6% de las defunciones a nivel nacional, por otro lado, el consumo de EtOH es la primera causa de muerte entre jóvenes y está involucrado en el 50% de accidentes automovilísticos. Se estima que 32 millones de personas consumen EtOH en el país, siendo un 75% hombres y el resto mujeres. De lo anterior se infiere que la enfermedad hepática alcohólica (EHA) continúa siendo un problema grave de salud pública (DGEI, Secretaría de Salud, 2001).

Si bien el conocimiento del desarrollo del daño hepático por el EtOH ha tenido avances importantes en su comprensión en los últimos años, todavía quedan grandes enigmas que resolver, que seguramente permitirán crear nuevas estrategias terapéuticas para el control de la enfermedad.

### **I.1 Patología de la enfermedad hepática alcohólica.**

La EHA presenta características histopatológicas diversas, virtualmente todas las formas de patología hepática pueden ser encontradas en pacientes con una historia de consumo crónico de EtOH. El espectro de la EHA incluye esteatosis, hepatitis, fibrosis, y cirrosis. La administración crónica de EtOH en animales de experimentación ha demostrado ser la causa de la generación de numerosos cambios hepáticos que incluyen esteatosis, necrosis hepatocelular, infiltración de células inflamatorias, proliferación del retículo endoplásmico liso y aberraciones mitocondriales (Jarvelainen, 2000). Todos estos cambios también

ocurren en la fase temprana de la EHA en humanos, sin embargo otros estados patológicos, como la hepatitis alcohólica, los cuerpos de Mallory y la cirrosis hepática avanzada, raramente los presentan los animales de experimentación, a no ser que se agregue a los tratamientos otros factores que favorezcan el desarrollo de estos estados.

## 1.2 Mecanismos celulares y moleculares del daño hepático inducido por el alcohol.

En el proceso de daño hepático inducido por el consumo del alcohol están involucrados prácticamente todos los tipos celulares del hígado, tomando particular importancia los hepatocitos (células del parénquima), las células inmunológicas residentes del hígado las células de Kupffer (macrófagos) y las células estelares hepáticas (Lieber, 1994)

El inicio de la patología, se da principalmente en dos niveles celulares: en los hepatocitos y en las células de Kupffer.

El hepatocito es el tipo celular con mayor presencia dentro del hígado, es el encargado de metabolizar al EtOH produciendo acetaldehído (Ac) y especies reactivas de oxígeno (ROS).

El EtOH puede ser metabolizado por tres sistemas enzimáticos: la alcohol deshidrogenasa, el citocromo P450 2E1 (Cit P450) y la catalasa. En el consumo agudo, el EtOH es metabolizado por el primer sistema, mientras que en la ingesta crónica hace lo propio el Cit P450, generando, además de Ac, radicales libres como el radical hidroxietilo (Albano, 1999) y ROS las cuales están estrechamente involucradas en la activación de varios genes que conducen al daño celular.

Todas las rutas de oxidación del EtOH resultan en la formación de Ac, el cual puede ser oxidado en acetato por medio de las aldehído deshidrogenasas localizadas en la mitocondria, Es bien sabido quem en el hígado, el Ac es mucho más tóxico que el EtOH. Datos de nuestro laboratorio han mostrado que el Ac, disminuye la funcionalidad celular determinada por la técnica de rojo neutro en células HepG2, mientras que el EtOH y el Lipopolisacárido (LPS) no mostraron tener efectos significativos (Gómez-Quiroz, 2003). El Ac es capaz de unirse covalentemente a proteínas formando aductos y generando neoantígenos (Lieber, 1994) y pérdida de la función de la proteína, puede inducir la expresión de genes por medio de la activación de los factores de transcripción, como lo reportamos en esta investigación y como se ha reportado previamente (Román et al. 2000)

Se ha mostrado que algunas consecuencias funcionales de la toxicidad celular del Ac incluyen aberraciones mitocondriales y de retícula endoplásmico, modificaciones en el metabolismo del colesterol y depleción del glitación mitocondrial (Lluis et al, 2003)

Además de su participación metabólica, el hepatocito es capaz, no solo de responder a citocinas, sino también, secretarlas en respuesta a la agresión. Previamente hemos reportado que las células HepG2 responden tanto al Ac como al LPS secretando interleucina 8, en un proceso dependiente del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Así mismo, es bien sabido que el hepatocito es capaz de responder a diversos estímulos secretando principalmente IL-6, TNF- $\alpha$ , y quimiocinas (Gutiérrez-Ruiz et al. 2001)



Además del hepatocito, el inicio de la patología también ocurre a nivel de las células inmunológicas las cuales son reclutadas en la zona de daño como respuesta a la generación de quimiocinas. La inflamación, en la mayoría de los casos, es un mecanismo de defensa del sistema inmunológico, sin embargo, la respuesta inflamatoria sostenida y excesiva es un proceso patológico que puede dar paso al daño tisular.

El reclutamiento, principalmente de neutrófilos, está conducido primordialmente por la generación de la IL-8 por el hepatocito dañado, el cual crea las condiciones para que los neutrófilos atraviesen el epitelio hepático.

Las células inmunológicas ya en el parénquima y las células de Kupffer en el espacio de Disse son activadas por las ROS generadas por el metabolismo del EtOH, por citocinas como el TNF- $\alpha$  o por el LPS, el cual se lleva en el sistema porta por un incremento en la permeabilidad intestinal a bacterias Gram-negativas causada por el consumo de EtOH. Las células de Kupffer activadas son una fuente de gran cantidad de radicales libres y citocinas, principalmente TNF- $\alpha$ , lo que conduce a la activación irregular de genes y al daño tisular (Loguercio y Federico, 2003).

### I.3 Citocinas y factores de crecimiento

Sin lugar a dudas, las citocinas y los factores de crecimiento, son los principales mediadores de la comunicación entre las células, tanto en estados fisiológicos, como en patológicos (Hoek y Pastorino, 2002)

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por una variedad de células después de un estímulo, las citocinas son generadas por prácticamente todos los tipos celulares del hígado (Simpson, 1997).

Todas las citocinas tienen una función fisiológica, sin embargo, en procesos patológicos, como en la EHA, la concentración normal se ve alterada, ocasionando un desbalance en otras citocinas, ya que existe una estrecha regulación entre ellas.

Existen varias clasificaciones que intentan agruparlas tomando en cuenta parámetros estructurales o de función. Una de las más usada pero cada vez más controversial es aquella que las asocia según su función en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, sin embargo el efecto que ejercen depende en mucho del tipo celular del que se trate. Basándonos en esta idea, podemos mencionar que dentro del grupo de las citocinas pro-inflamatorias se encuentran el TNF- $\alpha$ , el IL-8, la IL-1, etc., mientras que en el grupo de las anti-inflamatorias se puede incluir a la IL-10, la IL-4, la IL-13, etc.

No es difícil imaginar que las citocinas anti-inflamatorias regulan a las pro-inflamatorias o viceversa. La IL-4 regula la actividad del TNF- $\alpha$ , al disminuir el número de receptores en la célula (Manna, 1998), incluso puede existir una ínter

regulación dentro del mismo grupo por ejemplo el TNF- $\alpha$  regula la inducción y secreción de IL-6, IL-8, etc. (Marie, 1999).

#### I.4 La interleucina 8

La IL-8 es una citocina pro-inflamatoria de la familia de las quimiocinas, que promueve la quimiotaxis, la acumulación y la activación de los neutrófilos en el sitio donde es producida (Harada, 1994), generalmente una zona dañada; en este sitio los neutrófilos liberan el contenido de sus gránulos y fagocitan las células dañadas (Lindley, 1998; Damme, 1994).

La IL-8 es producida por diversos tipos celulares bajo un estímulo apropiado como el TNF- $\alpha$ , el LPS, ROS entre otros (Gómez-Quiroz, 2003), mientras que es inhibida con citocinas anti-inflamatorias o con agentes antioxidantes (Marie, 2000; Gómez-Quiroz, 2003)

La IL-8 fue identificada en 1987 como un factor soluble presente en sobrenadantes de monocitos tratados con LPS (Locati, 1999), pertenece al grupo clasificado como CXC, el cual agrupa a varias quimiocinas que presentan en su estructura un aminoácido (aa) entre los dos primeros residuos de cisterna.

El gene de IL-8 se localiza en el cromosoma 4, comprende 4 exones y 3 intrones. La IL-8 humana está codificada por un solo ARNm de aproximadamente 1.8 kb. La quimiocina se produce como una proteína de 99 aa, pero la forma activa se presenta como una proteína de 77 aa, como es el caso de la secretada por células endoteliales y hepatocitos mientras que los monocitos secretan

principalmente una proteína de 72 aa, así como otras formas de 77, 70 y 69 residuos (Lindley, 1998).

La IL-8 es una proteína altamente regulada. Existen en su región promotora sitios de unión para factores de transcripción que responden a estrés como el Factor Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la Proteína Activadora 1 (AP-1) (Lindley, 1998). Se ha observado que la activación del NF- $\kappa$ B está mediado selectivamente por peróxidos, como el  $H_2O_2$ , el cual activa rápidamente al factor de transcripción, efecto que no se observa con superóxidos o con el radical hidroxilo (Dalton, 1999).

Por otro lado, la AP-1 es activada principalmente por  $O_2^{\circ}$  ya que se ha observado que la inducción de este factor nuclear es bloqueada por la adición de la superóxido dismutasa (SOD) y no por la catalasa (Dalton, 1999). Sin embargo Román y cols. (2000) reportan que estos factores de transcripción son activados por el Ac en un mecanismo independiente de estrés oxidativo, posiblemente por una ruta mediada por la proteína cinasa C.

La IL-8 ejerce su actividad por medio de receptores glicosilados designados como IL-8RA e IL-8RB. La IL-8 se une con alta afinidad en ambos receptores, aunque, solo el IL-8RA es específico, ya que el otro receptor une también a otras quimiocinas (Locati y Murphy, 1999).

Se ha propuesto que en la EHA la IL-8 tiene una participación trascendental, ya que se han encontrado niveles altos de la interleucina en plasma de pacientes cirróticos (Li, 1996), así como en líquido de ascitis en el mismo tipo de pacientes (Martínez-Brú, 1999).

Un estudio llevado al cabo por Sheron y cols. (1993), reveló que en personas sanas, no se detectaron niveles circulantes de IL-8, mientras que en pacientes con hepatitis alcohólica se determinaron niveles de la quimiocina, del orden de 600 ng/ml, particularmente en aquellos pacientes que murieron, esto se correlacionó con indicadores bioquímicos de daño hepático severo. Por otro lado, se encontró un incremento moderado de IL-8 en personas que presentaban cirrosis alcohólica (93 ng/ml) y en pacientes alcohólicos que se encontraban en abstinencia (137 ng/ml), mientras que los niveles de pacientes que presentaban hepatitis no-alcohólica presentaron niveles de 17 ng/ml.

Estudios *in-vitro* han mostrado que la IL-8, se secreta por hepatocitos tratados con metales pesados, (Dong, 1998a), con LPS (Dong, 1998b) y con EtOH (Shiratori, 1993). Sin embargo, no se conoce como es que estos tóxicos estimulan la secreción de la quimiocina. Se sabe que el TNF- $\alpha$  está involucrado en dicha secreción, así como el estrés oxidativo o productos de la lipoperoxidación (Jayatilleke, 1998). En un trabajo previo reportamos que el TNF- $\alpha$  está involucrado en la secreción de IL-8 en células HepG2 tratadas con Ac (Gómez-Quiroz, 2003).

El TNF- $\alpha$  es uno de los primeros mediadores de comunicación celular secretados después de un estímulo. Se ha propuesto que el TNF- $\alpha$  juega un rol crítico en el desarrollo de la EHA, ya que niveles altos de esta citocina se han reportado en pacientes con hepatitis alcohólica aguda y con EHA crónica (Colell, 1998).

Si bien el TNF- $\alpha$  estimula la secreción de otros mediadores de daño, por si solo ejerce daño citotóxico en hepatocitos de la línea celular HepG2 (Hill, 1995).

Por otro lado investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio del Dr. Fernández-Checa han mostrado que el TNF- $\alpha$  tiene su principal blanco en la mitocondria, generando ROS y estimulando la movilización del gangliósido GD3 hacia este organelo, lo que genera una desestabilización y el inicio de la apoptosis (García-Ruiz et al., 2002)

### 1.5 Citocinas anti-inflamatorias

Las citocinas anti-inflamatorias, como se ha mencionado tienen su principal función en la regulación de la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T ayudadores (Th) 1, principalmente en la disminución en la producción de las citocinas pro-inflamatorias, siendo las más importantes la IL-4 y la IL-10.

La IL-4 es una glicoproteína de 20 kDa secretada principalmente por las subpoblaciones de linfocitos Th2. Esta considerada como una citocina altamente anti-inflamatoria, ejerciendo principalmente sus efecto en el bloqueo de la señalización inducida por el TNF- $\alpha$  (Manna, 1998), lo que le confiere tener efectos antagónicos en la respuesta de fase aguda.

Si bien el principal blanco de la IL-4 es la subpoblación de linfocitos Th1 contrarrestando la secreción de citocinas pro-inflamatorias, también ejerce sus efectos en diversos tipos celulares epiteliales (Gusdez, 2000)

Otra citocina pro-inflamatoria es la IL-10, esta proteína es un importante inmunorregulador pleiotrópico con múltiples y variados efectos biológicos en distintos tipos celulares (Conti, 2003; Haddad y Fahlman , 2002).

IL-10 ejerce su función a través de su receptor, que al igual que IL-4 activa la ruta de señalización mediada por JAK/STAT. El receptor de la IL-10 sin embargo, es mas amplio en cuanto a la capacidad de reclutar cinasas JAK y de fosforilar a las proteínas STAT, ya que puede activar a la STAT 5, a la STAT1 y a la STAT 3, siendo ésta última la más importante para su respuesta anti-inflamatoria. (Moore et al, 2001)

En el hígado, es producida localmente por las células de Kupffer, las cuales responden secretándola cuando son estimuladas con agentes tóxicos como el LPS, las micobacterias, las lipoproteínas microbianas, los virus y las citocinas como el TNF- $\alpha$  (Louis et al, 2003)

Está bien documentado que existe una regulación mutua entre las citocinas del grupo anti-inflamatorio con las del grupo pro-inflamatorio, sin embargo en el hepatocito poco se sabe de este control.

Los efectos anti-inflamatorios de la IL-4 y de la IL-10 residen de manera central en el bloqueo de las cascadas de señalización inflamatorias mediadas principalmente por la activación del NF-kB. Poco se conoce sobre este efecto en el hepatocito.

Cada vez queda más claro que el hepatocito no es solo una célula confinada a procesos metabólicos sino que es altamente efectora capaz de influir en su microambiente con la secreción de diversos mediadores de comunicación celular, por lo que creemos que el conocer los mecanismos moleculares que el hepatocito despliega ante la agresión nos puede permitir proponer nuevas formas de abordar el estudio de la EHA. En el presente trabajo nos hemos centrado

particularmente en el estudio de la regulación que pueden tener las interleucinas 4 y 10 en la regulación de la IL-8, citocina clave en el inicio de la respuesta inflamatoria hepática.



## I.6 La línea celular HepG2 y otros hepatocitos.

Finalmente hemos considerado importante el estudio de la respuesta anti-inflamatoria ejercida en el hepatocito por sus implicaciones metabólicas y por su participación en el inicio de la patología, por lo que el presente estudio se utilizó la línea celular HepG2.

Estas células son hepatocitos derivados de un hepatoblastoma humano, ha mostrado conservar varias de las funciones de un hepatocito normal por lo que resulta ser un buen modelo para diversos estudios *in vitro*. Las células HepG2 carecen de la capacidad de metabolizar al EtOH, lo que representa una ventaja cuando se quiere analizar de manera separada, los efectos del EtOH y de su metabolito (Román, 1999; Román 2000; Gómez-Quiroz, 2003; Lluís 2003).

Sin embargo, algunos experimentos utilizamos además cultivos primarios de hepatocitos de rata y hepatocitos fetales humanos de la línea celular WRL68 los cuales nos permitieron determinar la especificidad de la respuesta celular.

## II OBJETIVOS

### II.1 Objetivo General

Evaluar los efectos que ejercen la IL-4 y la IL-10 en la expresión y secreción de IL-8 en células HepG2 tratadas con acetaldehído.

### II.2 Objetivos particulares

Conocer si el pretratamiento con IL-4 o IL-10 disminuye la expresión y secreción de la IL-8 en células HepG2 tratadas con Ac.

Determinar la participación del factor nuclear  $\kappa$ B en el mecanismo de regulación de la IL-8 ejercido por la IL-10 y por la IL-4.

Determinar la participación de la Proteína Activadora 1 en el mecanismo de regulación de la IL-8 ejercido por la IL-10 y por la IL-4.

Determinar la especificidad celular de la respuesta ejercida por las citocinas anti-inflamatorias en células provenientes de tejido tumoral y tejido hepático normal.

### **III HIPÓTESIS**

Dado que la IL-4 y la IL-10 ejercen una respuesta anti-inflamatoria en diversos tipos celulares, estas citocinas disminuirán la producción de IL-8 en células HepG2 estimuladas con acetaldehído.

### **IV MATERIALES Y METODOS**

#### **IV.1 Cultivo celular**

Las células HepG2, línea celular derivada de un hepatosblastoma humano, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) en el pasaje número 79, se cultivaron en medio William's, el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB, Hy-Clone, Logan, UT, EUA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. En adelante este medio se le llamará medio completo. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning, Acton, MA, EUA). El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron a una dilución 1:3 una vez por semana, levantándose con tripsina-EDTA al 0.25% previo lavado con un buffer salino de fosfatos (PBS).

Las células WRL68, línea fetal hepática humana, se obtuvieron de la ATCC, en el pasaje número 67, se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) el cual se

suplementó con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles. El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron con una dilución 1:3 una vez por semana, levantándose con tripsina verseno al 0.025% previo lavado con PBS.

Los hepatocitos se obtuvieron de ratas macho Wistar (200-250 g) por medio de una perfusión hepática con colagenasa, según la técnica reportada por Viña y cols. (1979). La viabilidad de los hepatocitos se midió por medio de la técnica de exclusión de azul de tripano y rutinariamente fue superior al 90%. Los hepatocitos de rata se cultivaron en medio Dulbecco suplementado con 20 mU/ml de insulina, 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Se dejó el cultivo por 2 h para una correcta adherencia de las células, posteriormente se retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS para remover las células muertas. Se le agregó medio fresco y se dejó estabilizar el cultivo por 12 h. Después de este tiempo se procedió a realizar los experimentos mencionados.

Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37° C de temperatura con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

## IV.2 Diseño Experimental

Se sembraron las células en cajas Petri (Corning) con medio completo. Se dejó estabilizar el cultivo por 24 h. Posteriormente se cambió el medio por uno libre de SFB y conteniendo una concentración inicial de 80  $\mu$ M de Ac o en su caso 10 ng/ml de IL-4 o IL-10 recombinante humano, para el caso de los tratamientos en la células HepG2 o WRL68, o recombinante de rata para los tratamientos de los cultivos primarios de hepatocitos de rata. Todas las proteínas recombinantes se obtuvieron de R&D systems (Minneapolis, MN, EUA).

Todos los pretratamientos fueron por periodos de 1h y los tratamientos ya sea con Ac o con las citocinas anti-inflamatorias fueron por 1 hr para los ensayos de RT-PCR y Western blot del I $\kappa$ B, por 2 y 4 hrs. para los estudios de ensayos de retardo (EMSA) de NF- $\kappa$ B y AP-1, respectivamente y por 18 h para los estudios de secreción de IL-8. Las cajas fueron selladas con parafilm para evitar la evaporación del Ac. Se utilizó un inhibidor del NF- $\kappa$ B el L-1-cloro-3-[4-tosilamida]-4-fenil-2-butanona (TPCK), a una concentración de 10  $\mu$ g/ml como pretratamiento por una hora previo a la adición de la IL-10.

Terminado el tiempo del tratamiento los medios fueron recolectados, centrifugados a 4,000 rpm y congelados a -80°C para la determinación posterior de la IL-8. Las células se emplearon en las diferentes pruebas.

Todos los tratamientos se aplicaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico.

Todos los reactivos usados fueron de la marca Sigma (San Louis, MO, EUA) excepto cuando se indica lo contrario

#### IV.3 Determinación de la secreción de la IL-8

La determinación de la secreción de la IL-8 al medio de cultivo se realizó utilizando ensayos comerciales inmunoenzimáticos (ELISA, Quantikine, R&D systems) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### IV.4 Aislamiento del ARN total.

El aislamiento de ARN total se llevó al cabo empleando la técnica de Chomczynski (1993). Se sembraron  $10^6$  células por cada tratamiento. Después de 24 h, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS, y posteriormente se les agregó 1 ml de Trizol y se levantaron con un gendarme de goma estéril. Las células se pasaron a un microtubo (Corning) en donde se les dejó reposar y se les agregó 0.5 ml de cloroformo, se agitó el tubo por 15 segundos y se centrifugó 10 min. a 12,000 rpm a 4°C. La fase acuosa (superior) fue recuperada y se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol, se dejó reposar por 12 min. y se centrifugó por 10 min. a 12,000 rpm. El sobrenadante se decantó y el precipitado, se lavó con EtOH al 70% y se centrifugó por 5 min. a 12,000 rpm. El precipitado de ARN se secó al vacío y se resuspendió en una solución de dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%.

Finalmente se cuantificó el ARN por espectrofotometría utilizando una longitud de onda de 260 nm de absorbancia.

#### IV.5 Transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

EL RT-PCR se realizó usando un ensayo comercial (GeneAmp, Perkin Elmer). Para la transcripción reversa (RT) se tomaron 1.5 µg/ml de ARN total de cada tratamiento al que le agregaron 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 1 µl de ATP 10 mM; 1 µl de GTP 10 mM; 1 µl de CTP 10 mM; 1 µl de TTP 10 mM; 0.5 µl de inhibidor de ARNasa a una concentración de 10 U/µl, 0.5 µL de oligo d(T)<sub>16</sub> 5 nmoles; 0.5 µL de transcriptasa reversa a una concentración de 50 U/µL y 1 µL de un buffer para PCR 10X que contiene: 10 mM de KCl; 200 mM TRIS-HCl; pH 8.8, 100 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>; 10% Triton X y 100 µg/ml de albúmina sérica bovina. La mezcla se llevó a reacción en un termociclador (Perkin Elmer 480) y se sometió a 37°C por 60 min seguido de 5 min. a 95°C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó al cabo utilizando el ensayo comercial anteriormente mencionado. A 3 µl de ADN complementario (ADNc) que se obtuvo en la reacción de RT, se le agregaron 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 4µl de Buffer PCR 10X ; 31.75µl de agua estéril; 0.25 µl de DNA polimerasa (AmpliTaQDNA polimerase, Perkin Elmer) a una concentración de 5 U/µl y 2.5 µl de los oligonucleótidos siguientes: para IL-8: sentido 5'-TTG GCA GCC TTC CTG ATT-3', antisentido 5'- AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG-3', a una concentración de 10 µM. La mezcla se llevó a reacción al termociclador con las siguientes condiciones: 74°C ,1 min.; 63°C 1 min.; 92°C, 1 min. por 35 ciclos.

Para la  $\beta_2$  microglobulina, que se empleó como sonda interna, se usaron los siguientes oligonucleótidos: sentido 5'-GAT GCT GCT TAC ACG-3', antisentido 5'- CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3', a una concentración de 10  $\mu$ M con las siguientes condiciones. 74°C, 1 min.; 53° C 1 min.; 92°C, 1 min. por 35 ciclos.

Los ADNc amplificados se identificaron en geles de agarosa al 1%. Se disolvieron 0.60 g de agarosa en 40 ml de TBE 0.5 X, se calentó para disolver perfectamente la agarosa, se dejó enfriar y se agregaron 4.5  $\mu$ l de una solución de bromuro de etidio con una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Se pusieron 5  $\mu$ l de ADNc con 2  $\mu$ l de buffer de carga en los pozos del gel y se corrió en una cámara de electroforesis (BIO-RAD) a 100 volts por 30 min.

Las bandas resultantes en los geles se observaron y cuantificaron por medio del software Quantity one (BioRad, Hércules, CA, EUA).

#### IV. Obtención de proteína nuclear

Se sembraron  $3 \times 10^6$  células en cajas de Petri de 70mm de diámetro con medio completo, se dejó estabilizar el cultivo por 24 h. Después de este tiempo se lavaron las células con PBS y se aplicaron los tratamientos arriba mencionados, concluido el tiempo de exposición se retiró el medio, se lavaron las células con PBS y se despegaron con un gendarme de goma. Se recupero la suspensión celular y se centrifugó por un minuto a 3,000 rpm. Las células precipitadas se incubaron por 15 min. en hielo con 800  $\mu$ l de solución A que contenía: HEPES 10 mM, KCl 10mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1mM, DTT, 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.9. Pasado este tiempo, a la suspensión se agregaron 50  $\mu$ l de una solución de Igepal



al 10% en solución A. Se agitó vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg a 4°C. El precipitado obtenido (núcleos) se incubó por 15 min. en hielo con 30-70 µl de solución C que contenía: HEPES 20 mM, NaCl 0.4mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT, 1 mM, PMSF 1mM, pH 7.9. Durante este tiempo se agitó vigorosamente cada 3 min. Terminado el tiempo de incubación la suspensión se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se tomó una alícuota 5 µl para la determinación de la cantidad de proteína el resto se mantuvo a -80°C para su empleo posterior.

#### IV.7 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

Se adicionaron en un microtubo 5 µl de una solución de incubación que contenía: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoetanol y 20% glicerol, posteriormente se adicionó 1 µg de poli (dI.dC) y de 5-30 µg de la proteína nuclear. Se incubó en hielo por 15 min. Al termino de la incubación se agregaron 2 µl de la sonda correspondiente marcada con <sup>32</sup>P (300,000 cpm/muestra). Se utilizaron oligonucleótidos con secuencia consenso para NF-κB 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' y para AP-1 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' (Promega, Madison, WI, EUA). La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min, finalmente se le adicionaron 2µl de azul de bromofenol al 0.1 %. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% el cual se preparó de la siguiente forma: se mezclaron 4 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1), 1 ml de una solución de TBE 5X, 15 ml de agua desionizada,

200  $\mu$ l de de persulfato de amonio al 10% y 10  $\mu$ l de TEMED. Se corrió el gel a 150 V durante 2 h.

El gel se colocó en una casete para su autorradiografía. Las imágenes se cuantificaron por medio del software Quantity one (BioRad)

#### IV.8 Determinación de los niveles de I $\kappa$ B.

La determinación de los niveles de los dos inhibidores del NF- $\kappa$ B fue realizada por medio de Western blot utilizando anticuerpos policlonales contra el I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

Se sembraron  $3 \times 10^6$  células en cajas Petri de 60 mm de diámetro, se dejó el cultivo estabilizar por 24 h, y posteriormente se sometió al cultivo al tratamiento correspondiente. Terminado el tiempo de tratamiento las células se lavaron con PBS y posteriormente se les adicionaron 300  $\mu$ l de una solución amortiguadora de lisis que contenía: 50 mM TRIS-HCl, 120 mM NaCl, 0.5% Igepal, 100 mM NaF, 200  $\mu$ M NaVO<sub>3</sub>, pH 8.0. Las células se despegaron con un gendarme de goma. El volumen total se colocó en un microtubo y se dejó en hielo por espacio de 5 min. con agitación constante. Pasado este tiempo la muestra se centrifugó por 20 min. a 14000 rpm a una temperatura de 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80°C.

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% de la siguiente forma: 2.5 ml de solución 1 (TRIS-HCl 0.75 M, SDS 0.2%, pH 8.8), 1.7 ml de solución 2 (archilamida-Bis archilamida 30% proporción 37.5:1), 0.8 ml de agua, 7  $\mu$ l de TEMED, 25  $\mu$ l de persulfato de amonio al 13 %.

Se pusieron 50  $\mu$ g de proteína del lisado total con 30  $\mu$ l de una solución de muestra que contenía:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 M, glicerol al 30%, SDS al 7.5% y azul de bromofenol al 0.5%. Se incubó por 5 min. a ebullición. Se cargó el total de la muestra anterior en el gel de poliacrilamida, el cual se corrió a 125 volts por 60 min.

Terminada la electroforesis se procedió a la transferencia de la proteína separada a una membrana de transferencia PVDF polyscreen (NEN) a 290 mA durante 60 min. a 4°C en una cámara (BioRad), con 800 ml de una solución de transferencia que contenía: TRIS-base 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20%.

Terminada la transferencia la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 8% en una solución de TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6) por una hora en agitación constante. Posteriormente se hicieron lavados sucesivos con una solución de Tween 20 al 0.05% en TBS (TBS-Tween 20).

La membrana ya bloqueada se incubó con el anticuerpo primario (anti-I- $\kappa$ B $\alpha$  ó anti-I- $\kappa$ B $\beta$ ) a una dilución 1:1000 en TBS-Tween 20.

Terminado el tiempo de incubación la membrana se sometió a lavados sucesivos con una solución de TBS-Tween 20.1

Posteriormente la membrana se incubó durante una hora con un anticuerpo secundario (anti-cabra acoplado a una peroxidasa de rábano; Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:5000 en TBS-Tween 20, a temperatura ambiente y con agitación constante.

Terminado el tiempo de incubación la membrana se sometió a lavados sucesivos con una solución de Tween 20 al 0.05% en TBS.

Finalmente la membrana se incubó con un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal, Pierce) por 15 min. a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo la membrana se secó, se colocó en una bolsa de plástico y se sometió a autorradiografía. Las imágenes se cuantificaron por medio del software Quantity one (BioRad)

#### IV.9 Determinación del contenido de proteína.

El contenido de proteína se determinó por medio de la técnica de Bradford. Se utilizó el reactivo BioRad Protein, (BioRad), utilizando estándares con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. Se siguió el protocolo del fabricante.

#### IV.10 Ensayo de viabilidad celular.

La viabilidad celular se determinó midiendo la habilidad de las células vivas de excluir el colorante azul de tripano a una concentración final del 0.2% en PBS. Las células se contaron en un hemocitómetro.

#### IV.11 Análisis estadístico.

Cada experimento se realizó por triplicado en al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba no paramétrica de Tukey. Se empleó para el análisis el programa SPSS 8.0. El nivel de significancia fue de  $p \leq 0.05$ .

## V RESULTADOS

Con la finalidad de conocer si los pretratamientos con las citocinas anti-inflamatorias previenen la expresión de la IL-9 realizamos ensayos de RT-PCR. En la figura 1 se puede observar que las células HepG2 expresan concentraciones basales de ARNm de IL-8. Esta producción se eleva un 61% cuando las células se tratan por una hora con 80 $\mu$ M de Ac. Previamente habíamos determinado que la expresión máxima del ARNm de IL-8 es a la hora de tratamiento (Gómez-Quiroz, 2003). Cuando los cultivos celulares fueron pretratados con 10 ng/ml de IL-10 o IL-4 y luego tratados con Ac por una hora se observa que, en el caso del pretratamiento con IL-4, la expresión de IL-8 se ve disminuida a valores similares al control, mientras que con el pretratamiento de IL-10 no se encuentra algún efecto. Más aún, el tratamiento solo con IL-10 por una hora incrementa 65% la expresión del ARNm de IL-8. El tratamiento con IL-4 no mostró ningún cambio.

Resultados similares a la expresión se encontraron en los estudios de secreción al medio de cultivo de la quimiocina. La figura 2 muestra que el tratamiento con Ac incrementa 2.2 veces la secreción basal de IL-8, mientras que la secreción de IL-8 permanece en los valores control cuando las células son pretratadas por una hora con IL-4. El pretratamiento con IL-10 no disminuyó la secreción causada por el Ac. El tratamiento solo con IL-10 incrementó 2 veces la secreción basal de la quimiocina.

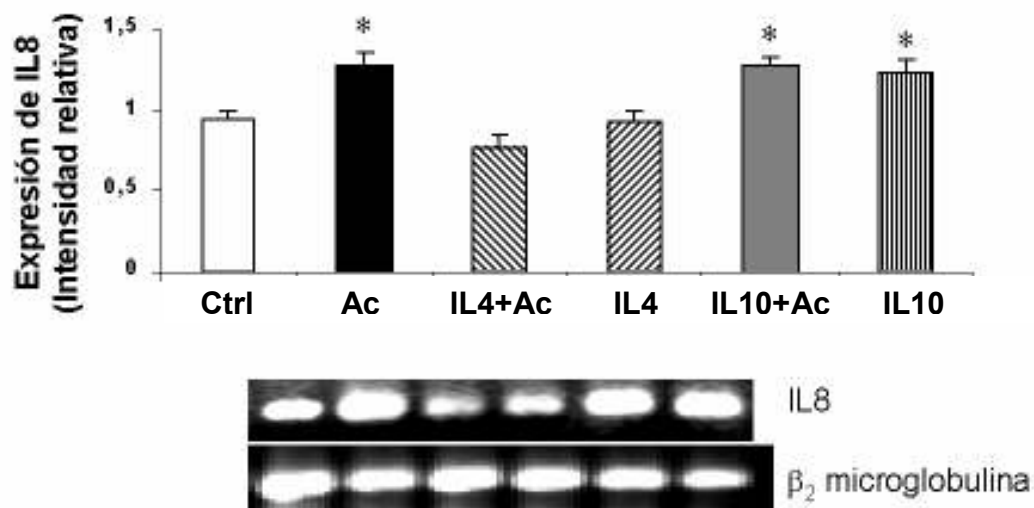


Figura 1. Expresión de IL-8 en células HepG2. Las células fueron tratadas por una hora con 80 $\mu$ M de Ac, 10 ng/ml de IL-4 o IL10, o pretratadas durante una hora con 10 ng/ml de IL4 o IL-10 y luego tratadas por una hora con 80 $\mu$ M de Ac. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes llevados al cabo por triplicado. \* Diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

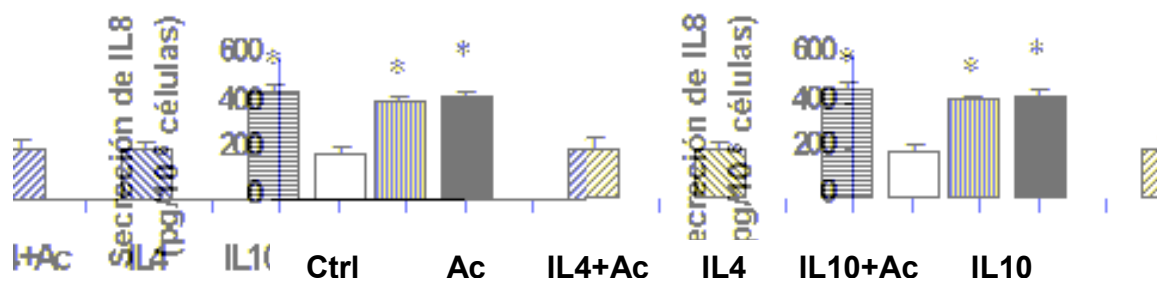


Figura 2. Secreción de IL-8 al medio de cultivo de las células HepG2. Las células fueron tratadas por 18 horas con 80 $\mu$ M de Ac, 10 ng/ml de IL-4 o IL10, o pretratadas durante una hora con 10 ng/ml de IL4 o IL-10 y luego tratadas por 18 hora con 80 $\mu$ M de Ac. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes llevados al cabo por triplicado. \* Diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )



Con la finalidad de evaluar la especificidad del efecto de la IL-4 sobre la regulación de la expresión de la IL-8, se pretrataron a las células HepG2 con 10 ng/ml de IL-4 por una hora y posteriormente se trataron por una hora con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  o 1  $\mu$ g/ml de LPS, especies que se conocen como inductoras de la expresión de IL-8. En la figura 3 se muestra que tanto el tratamiento con el LPS como el TNF- $\alpha$  incrementan la expresión en un 23% y en un 21% respectivamente, mientras que el pretratamiento por una hora con IL-4 previene la expresión de la IL-8 en un 69% y 55% respectivamente comparado con las células tratadas con LPS y TNF- $\alpha$ .

Dado que la expresión de la IL-8 está controlada fuertemente por el NF- $\kappa$ B, se realizaron estudios de retardo (EMSA) con la finalidad de conocer el nivel de activación de este factor de transcripción bajo los tratamientos que se han venido estudiando. La figura 4 muestra que el Ac incrementa 1.9 veces la activación basal, del NF- $\kappa$ B mientras que el pretratamiento con la IL-4 previene dicho incremento. El pretratamiento con la IL-10 no previno la activación, más aún, siguiendo el patrón de comportamiento que se ha mostrado en la expresión y secreción de IL-8, la IL-10 incrementa por si sola 1.8 veces la activación basal del NF- $\kappa$ B.

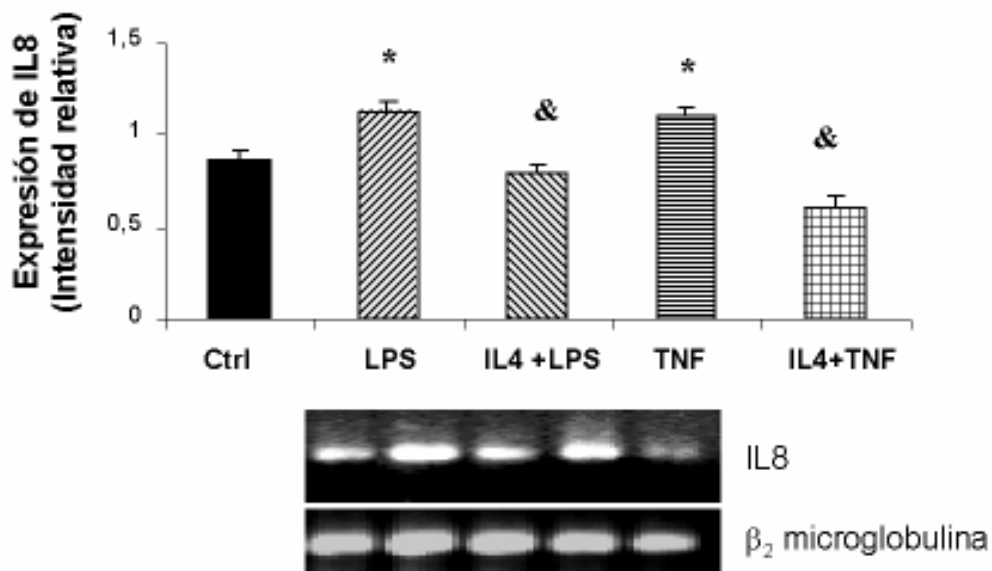


Figura 3. Expresión de IL-8 en células HepG2. Las células fueron tratadas por una hora con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  o 1 $\mu$ g/ml de LPS o pretratadas durante una hora con 10 ng/ml de IL4 y luego tratadas por una hora con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  o 1 $\mu$ g/ml de LPS. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes llevados al cabo por triplicado. \* Diferencia significativa con respecto al control. & Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con el LPS o con el TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ).

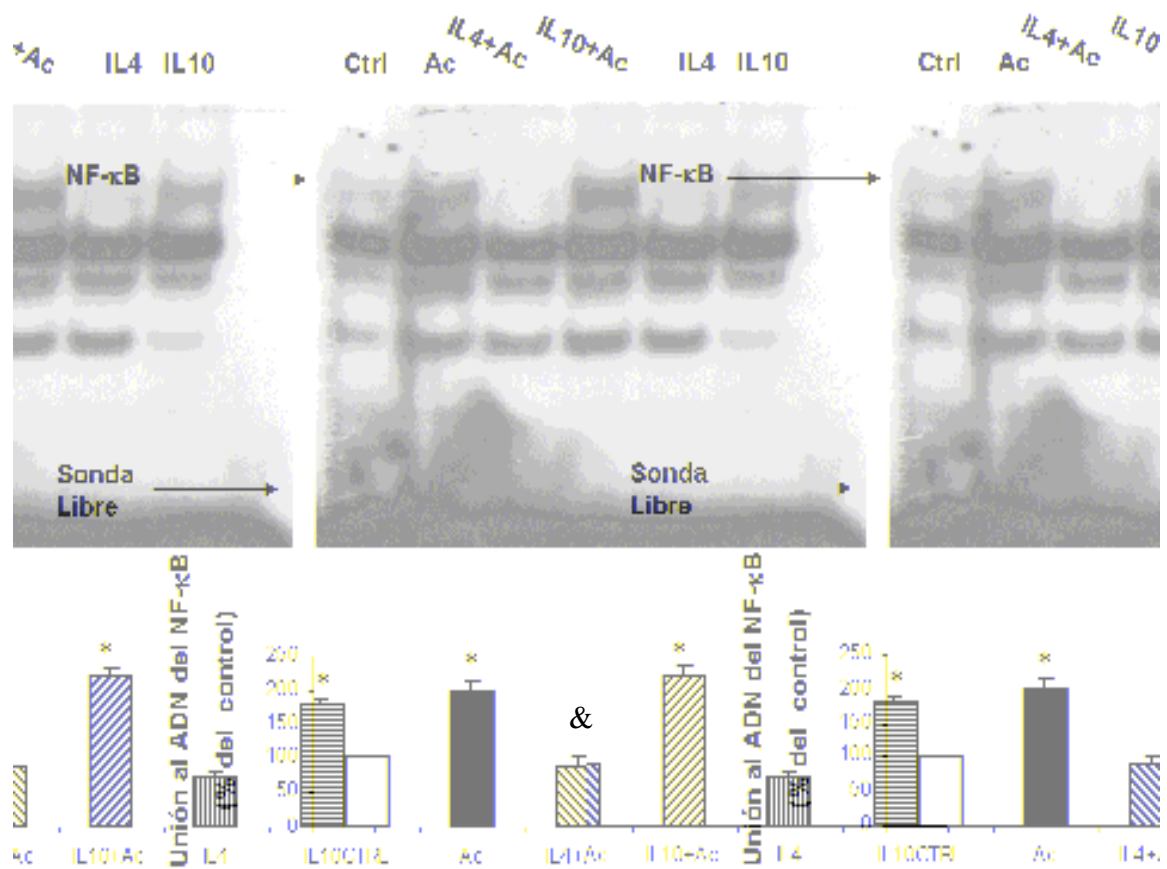


Figura 4. Activación del NF- $\kappa$ B en las células HepG2. Los extractos nucleares se aislaron de células tratadas con 80 $\mu$ M de Ac, o 10 ng/ml de IL-4 e IL-10 o de células pretratadas por una hora con 10 ng/ml de IL-4 o IL-10 y luego tratadas con Ac por 2 h. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes. \* Diferencia significativa con respecto al control. & Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con Ac ( $p < 0.05$ ).

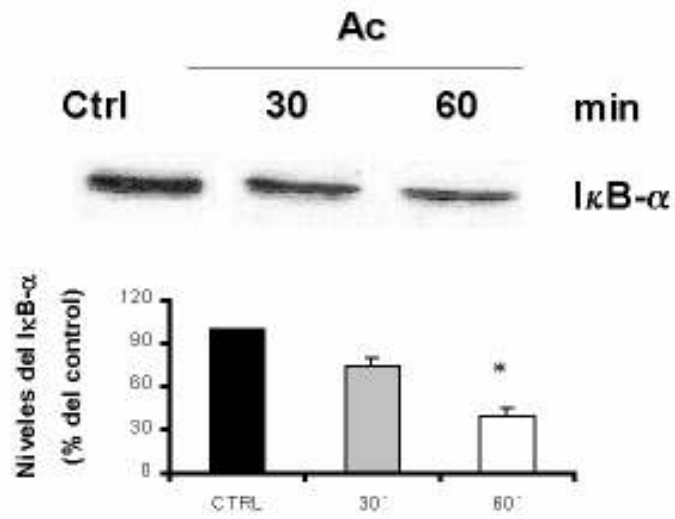
La degradación del I $\kappa$ B por el proteosoma 26S, que sigue a la fosforilación, forma parte de la ruta principal de activación del NF- $\kappa$ B, por lo que decidimos analizar el estado que guardan las dos isoformas principales del inhibidor el I $\kappa$ B $\alpha$  y el I $\kappa$ B $\beta$  por medio de la técnica de Western blot.

La figura 5A y 5B muestran que tanto el Ac como la IL-10 inducen la degradación del I $\kappa$ B- $\alpha$ , mientras que el pretratamiento con la IL-4 previno la degradación del inhibidor (Figura 5C). Estos datos concuerdan con los resultados observados en la figura 4.

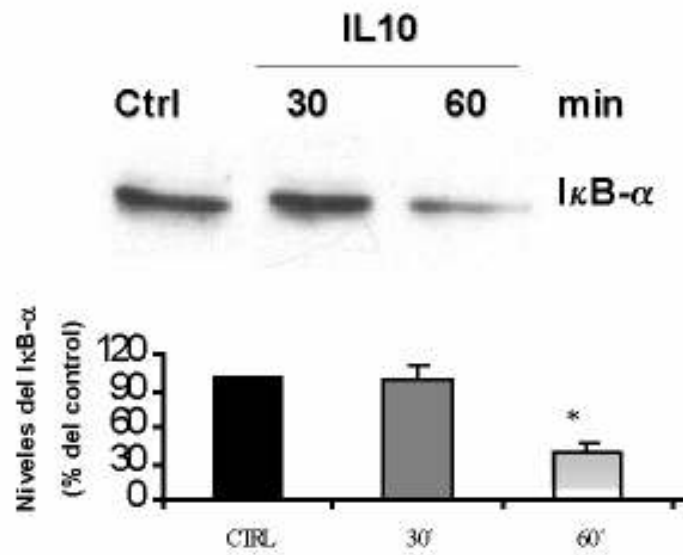
De la misma forma se realizaron estudios por Western blot del estado del I $\kappa$ B- $\beta$ . No se encontró cambio alguno en las células tratadas con Ac o con IL-10, lo que sugiere que en la ruta de activación del NF- $\kappa$ B causada por el Ac o por la IL-10, no está participando I $\kappa$ B- $\beta$ .

Otro factor de transcripción importante en el control de la expresión de IL-8 es la AP-1, sobre todo es importante para la expresión constitutiva de la quimiocina en células HepG2 (Iguchi, 2000). Se realizó un ensayo de retardo con la finalidad de conocer el estado de activación de la AP-1 causado por el Ac y la IL-10. Como se puede observar en la figura 6 el Ac incrementa 2.2 veces la activación basal de la AP-1, el pretratamiento con IL-4 previene la activación. El pretratamiento con IL-10 falló en la prevención de la activación de la AP-1. El tratamiento solo con IL-10 incrementó 1.7 veces la activación basal de de AP-1.

**A**



**B**



C

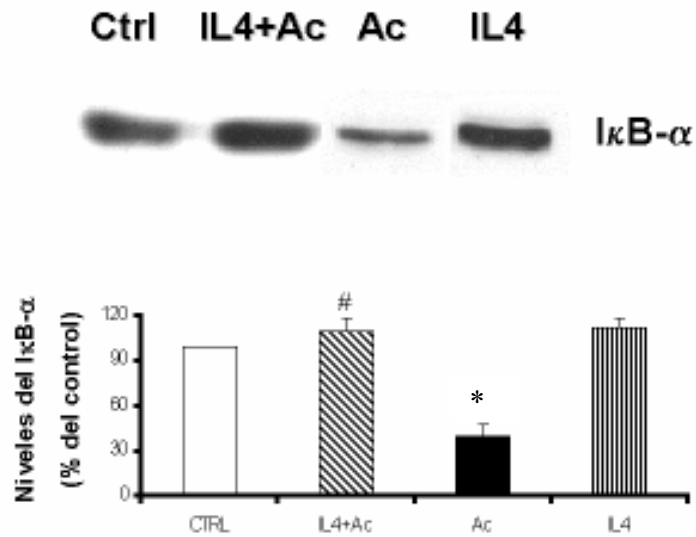


Figura 5. Análisis por Western blot de los niveles del IκB-α en células HepG2. Las células HepG2 se incubaron con (A) 80μM de Ac por 30 y 60 min. o con (B) 10 ng/ml de IL-10 por 30 y 60 min., y (C) pretratadas durante una hora con 10 ng/ml de IL-4 y luego tratadas con 80μM de Ac. Los extractos celulares se prepararon para los estudios por Western blot. Los valores representan el promedio (± E.E.) de al menos 3 experimentos independientes. \* Diferencia significativa con respecto al control. # Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con Ac (p< 0.05).

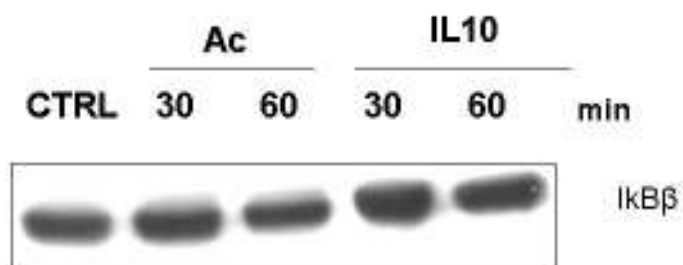


Figura 6. Análisis por Western blot de los niveles del IκB-β en células HepG2. Las células HepG2 se incubaron con 80μM de Ac por 30 y 60 min o con 10 ng/ml de IL-10 por 30 y 60 min. Imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes.

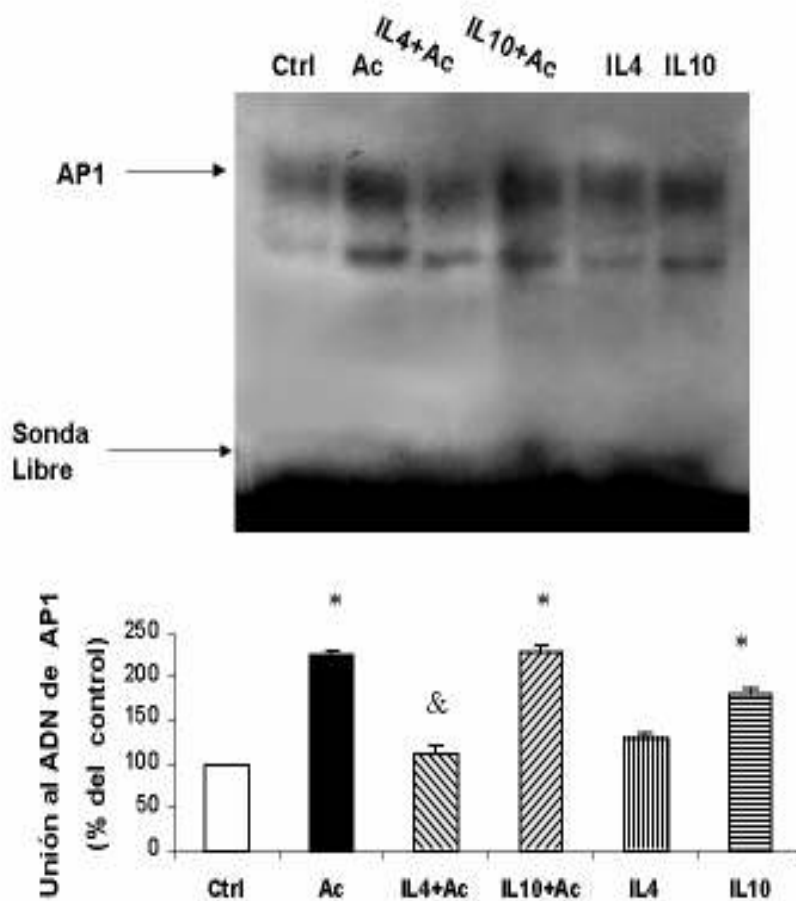


Figura 7. Activación de AP-1 en las células HepG2. Los extractos nucleares se aislaron de células tratadas con 80 $\mu$ M de Ac, o 10 ng/ml de IL-4 e IL-10 o de células pretratadas por una hora con 10 ng/ml de IL-4 o IL-10 y luego tratadas con Ac por 2 h. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes. \* Diferencia significativa con respecto al control. & Diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ).



Con la finalidad de comprobar la participación directa del NF- $\kappa$ B en la expresión de IL-8 mediada por la IL-10, se pretrataron células HepG2 por una hora con 10  $\mu$ g/ml de TPCK, un inhibidor de la activación del NF- $\kappa$ B y posteriormente se Agregó Ac para tener una concentración inicial de 80 $\mu$ M.

La figura 8 muestra que el pretratamientos con TPCK disminuye drásticamente la expresión de la quimiocina mediada por IL-10. Este dato sugiere que la producción de IL-8 está dirigida por la activación del NF- $\kappa$ B y que la sobreexpresión de IL-8 ocasionada por la IL-10 está mediada por la activación de este factor.

Se sabe que las líneas celulares de origen tumoral son más sensibles a la activación del NF- $\kappa$ B lo que explica la resistencia que presentan ante estímulos apoptóticos como son los tratamientos con agentes quimioterapéuticos o con radio terapia (Paris et al, 2002).

Con la finalidad de conocer si el efecto de la IL-10 es específico para las células HepG2 debido a su origen tumoral, realizamos ensayos de retardo en células WRL68. La figura 8 muestra que los pretratamientos tanto de IL-4 como de IL-10 previenen la activación del NF- $\kappa$ B ocasionada por el Ac, así el efecto anti-inflamatorio de la IL-4 es común tanto para las células HepG2 como para las células WRL68, mientras que la IL-10 despliega un efecto anti-inflamatorio selectivo en las células WRL68, pero no en las células HepG2.

Con la finalidad de sustentar con más evidencia la selectividad de efecto anti-inflamatorio de IL-10, se realizó un análisis por Western blot del estado del

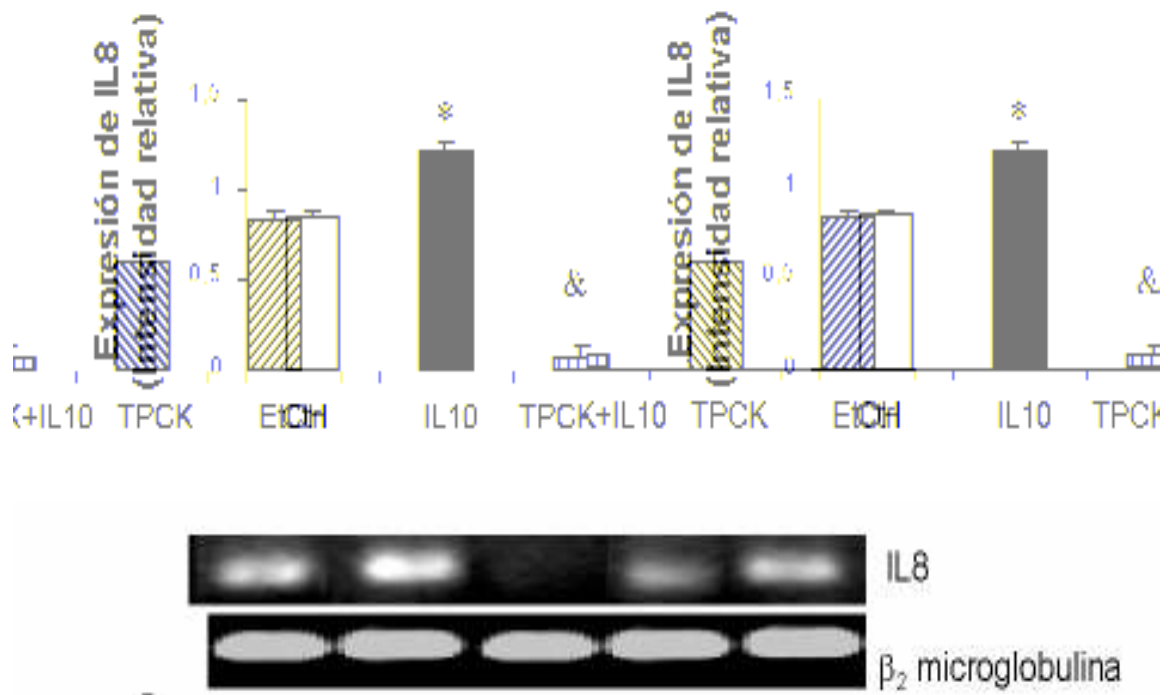


Figura 8. Expresión de IL-8 en células HepG2. Las células fueron tratadas por una hora con TPCK y luego tratadas por una hora con 80 $\mu$ M de Ac. EtOH, etanol al 75% como vehículo del TPCK. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes llevados al cabo por triplicado. \* Diferencia significativa con respecto al control. & Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con IL-10 ( $p < 0.05$ )

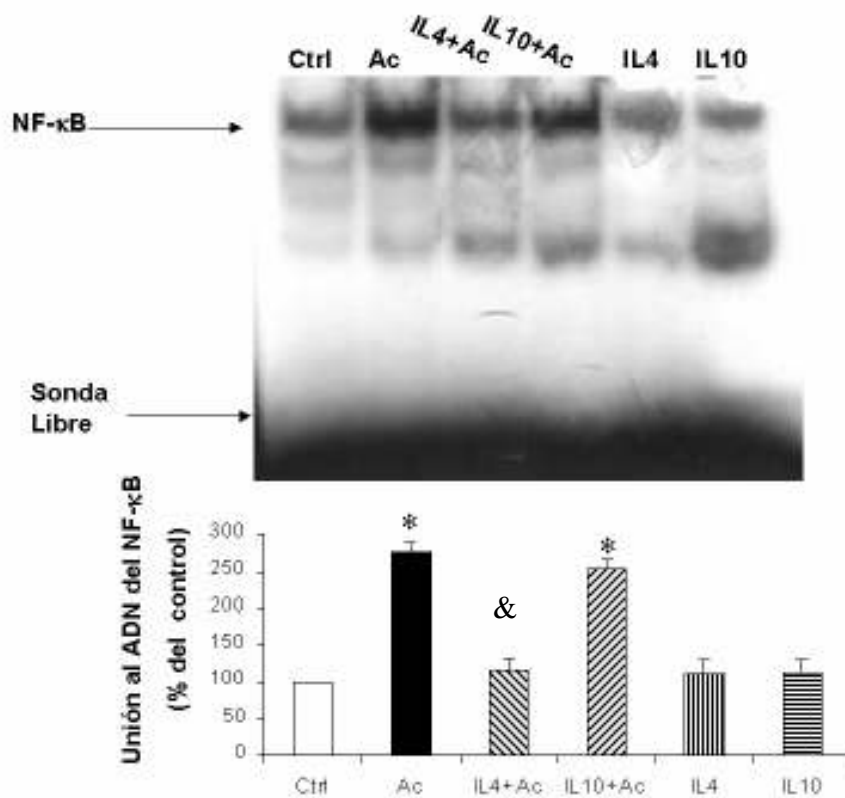


Figura 9. Activación del NF- $\kappa$ B en las células WRL68. Los extractos nucleares se aislaron de células tratadas con 80 $\mu$ M de Ac, o 10 ng/ml de IL-4 e IL-10 o de células pretratadas por una hora con 10 ng/ml de IL-4 o IL-10 y luego tratadas con Ac por 2 h. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes. \* Diferencia significativa con respecto al control. & Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con Ac ( $p < 0.05$ ).

I $\kappa$ B- $\alpha$  en cultivos primarios de hepatocitos de rata tratados con 10 ng/ml de IL-10 recombinante de rata.

En la figura 10 se puede ver el resultado de un estudio en el tiempo del estado que guarda el I $\kappa$ B- $\alpha$  tras 30,60,90,120,180 y 240 minutos de tratamiento con la IL-10.

No se observa cambio alguno, lo que sugiere que la IL-10 no presenta el efecto pro-inflamatorio que tiene en las células HepG2.

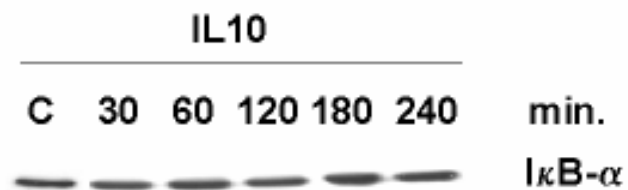


Figura 10. Análisis por Western blot de los niveles del IκB-α en hepatocitos de rata. Las células se incubaron con 10 ng/ml de IL-10 recombinante de rata por 30, 60, 120, 180 y 240 min. Los extractos celulares se prepararon para los estudios por Western blot. Los valores representan el promedio ( $\pm$  E.E.) de al menos 3 experimentos independientes.

## VI DISCUSIÓN

Previamente reportamos que el Ac y no el EtOH induce la expresión y secreción de la IL-8 en células HepG2, sugiriendo que es necesario el metabolismo del EtOH para desencadenar una respuesta inflamatoria.

En el presente estudio, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de algunas citocinas consideradas como anti-inflamatorias, la IL-4 y la IL-10, en la producción de la IL-8 en células HepG2 tratadas con Ac.

Existen resultados controversiales sobre el efecto anti-inflamatorio de la IL-4 y de la IL-10 sobre la producción de IL-8, principalmente en células de origen inmunológico. El efecto es diferente dependiendo del tipo celular del que se trate. Marie y cols. (2000) reportaron que ambas citocinas inhiben la producción de IL-8 en células sanguíneas. En contraste, en células del estroma de la médula ósea estimuladas con suero fetal bovino, no se observó efecto alguno de la IL-4 o IL-10 en la producción de IL-8 cuando se agregaron en concentraciones de 10 ng/ml, sin embargo concentraciones 10 veces más elevadas generaron la secreción de la quimiocina (Denizot, 1999). Estos datos sugieren claramente que el efecto de la IL-4 y de la IL-10 sobre la expresión de IL-8 depende del tipo de celular y de la concentración usada.

En el presente trabajo, demostramos una vez más que el Ac induce la expresión y secreción de IL-8 en cultivos de células HepG2. El pretratamiento con IL-4 previno la producción de IL-8 inducida por el Ac. En contraste, el pretratamiento con IL-10 no tuvo tal efecto, sino que la IL-10 por si sola incrementó

la producción de IL-8. Este efecto puede explicarse por la habilidad de la IL-10 de activar al NF- $\kappa$ B, que como es sabido controla la expresión de la IL-8.

La región regulatoria 5' del gene de IL-8 contiene varios elementos potenciales de regulación de la transcripción. Entre éstos se han descrito en repetidas ocasiones secuencias consenso para los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y la AP-1 (Sugita 1998; Roebuck, 1999). El Ac puede activar ambos factores de transcripción por un mecanismo independiente de estrés oxidativo (Román, 2000).

Sobre la base de lo anterior, decidimos explorar el efecto de la IL-4 y de la IL-10 en la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 en células tratadas con Ac. El pretratamiento con IL-4 disminuyó a valores control la activación inducida por el Ac de ambos factores de transcripción. Sin embargo, el pretratamiento con IL-10 no disminuye la activación de NF- $\kappa$ B y de AP-1. Mas aún, el tratamiento solo con IL-10 incrementa la activación de los dos factores de manera similar a como la hace el Ac.

Se han encontrado resultados similares en células T CD8, las cuales cuando son tratadas con IL-10 incrementan la activación de NF- $\kappa$ B y de AP-1 (Hurme, 1994).

En la activación del NF- $\kappa$ B están involucrados múltiples fenómenos moleculares. La degradación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B asociada al dímero del factor de transcripción permite la translocación al núcleo de las subunidades

competentes y su subsiguiente unión a sitios específicos en los promotores de los genes blancos. Acorde a esto, observamos que tanto el Ac como la IL-10 inducen la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  en las células HepG2, mientras que el pretratamiento con IL-4 mantuvo los niveles del I $\kappa$ B- $\alpha$  a pesar del tratamiento con Ac.

Gouzdek y colaboradores (200) reportan una respuesta diferencial de citocinas anti-inflamatorias en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Concentraciones similares de la IL-4 y la IL-13 incrementan la síntesis de IL-6 en cultivos de células endoteliales de vena umbilical, efecto que no se observó con la IL-10. En células HepG2 la IL-4 y la IL-13, pero no la IL-10, inhiben la síntesis de haptoglobina inducida por IL-6 (Gusdek, 2000), la respuesta diferencial de las citocinas anti-inflamatorias se observada tanto en los niveles de expresión como de secreción de las proteínas estudiadas en el estudio de Gusdek y cols, puede reflejar la especificidad de las rutas de señalización y de expresión génica.

Así mismo se ha observado que la IL-4 y IL-10 regula negativamente la producción de otras citocinas y factores de crecimiento como la IL-6 y el TNF- $\alpha$  en células mononucleares (Wigmore, 1998)

El efecto de la IL-4 en la fisiología del hepatocito no está del todo comprendida. Se han hecho algunas aproximaciones en caracterizar la función del receptor para IL-4 y su cascada de señalización en células de hepatoma (Chuang, 1996). Previamente reportamos que la producción de IL-8 inducida por el Ac en



células HepG2 es un proceso en el que interviene el efecto autocrino del TNF- $\alpha$ . (Gómez-Quiroz, 2003). Manna y cols. (1998) explican la base molecular de la supresión de la respuesta celular mediada por el TNF- $\alpha$  causada por la IL-4, ya que reportan una disminución en los receptores funcionales del TNF- $\alpha$ . Este efecto causado por la IL-4 no fue específico de un tipo celular, ya que la disminución de los receptores ocurrió en diversos tipos celulares epiteliales, así como en células T.

De lo anterior sugerimos que la IL-4 pudiera tener el mismo efecto sobre las células HepG2, disminuyendo la producción de IL-8 mediada por el TNF- $\alpha$ .

El Ac tiene la habilidad, como ya se ha descrito, de activar a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Román, 2000). Esto explica los valores obtenidos en el presente trabajo con respecto a la producción de IL-8 inducida por el Ac y el efecto del pretratamiento de IL-4. La producción de la quimiocina al menos en las células HepG2 tratadas con Ac es un proceso dependiente del efecto autócrino del TNF- $\alpha$ .

Se ha reportado que la IL-10 puede tener un efecto dual, actuando como una citocina pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, principalmente en poblaciones celulares del sistema inmunológico (Mocellin, 2003). Los datos presentados en este trabajo muestran que la IL-10 incrementó la activación de los factores de transcripción de manera significativa en las células HepG2. Con la finalidad de establecer si este efecto está restringido al origen de las células HepG2 (hepatoma), se realizaron algunos experimentos en una línea celular proveniente

de hígado fetal humano, las células WRL-68, y en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Las células WRL-68 pretratadas con IL-4 y luego tratadas con Ac presentaron el mismo efecto en la activación del NF- $\kappa$ B que el observado en las células HepG2. Sin embargo hubo diferencia con respecto al efecto presentado por la IL-10, ya que no indujo la activación del NF- $\kappa$ B, contrario a lo que se observó con las células HepG2.

En el cultivo primario de hepatocitos de rata estudiamos el nivel de degradación del I $\kappa$ B- $\alpha$  por Western blot. Observamos que la IL-10 no ejerce efecto alguno sobre la degradación del inhibidor, resultado contrario al que se obtuvo en las células HepG2.

Este dato, puede explicar, en parte, la resistencia a la apoptosis que presentan diversas líneas celulares derivadas de tumores, como las de hepatoblastoma.

La IL-10 está implicada en la inmunodeficiencia que presentan los pacientes con cáncer. La presencia de esta citocina en suero puede indicar una baja inmunidad anti-tumoral y un pobre pronóstico de recuperación en pacientes con carcinoma hepatocelular (Hatori, 2003).

El incremento de la IL-10 en pacientes con sarcoma óseo está correlacionado con una pobre recuperación del paciente (Rutkowski, 2003) y en cáncer de tiroides la producción autocrina de IL-10, incluso de IL-4, están relacionadas con la progresión del tumor y la resistencia a la quimioterapia a través de la sobrerregulación de las proteínas anti-apoptósicas (Stassi, 2003).

El hepatocito *in vivo* no es una entidad funcional aislada, depende en mucho de la secreción de citocinas y factores de crecimiento provenientes de los diversos tipos celulares adyacentes como son las células de Kupffer, los monocitos, incluso, las células endoteliales.

Los receptores que tiene la capacidad de unir a tirosin cinasas, en muchos casos pueden unir proteínas accesorias, que a su vez, activan otras rutas de señalización, como las mediadas por las proteínas cinasas activadoras de mitosis (MAPK) o a las mediadas por la proteína cinasa B, también conocida como AKT, éstas rutas pueden conducir a la activación de genes que le confieren a la célula resistencia a la apoptosis, proliferación y migración, procesos claves en regeneración y cáncer (Schlessinger, 2000), es difícil asegurar que este fenómeno suceda con el receptor de IL-10, sin embargo, sugerimos que puede existir la posibilidad de que esto suceda en las células HepG2 tratadas con la IL-10.

## **VII CONCLUSIONES**

En conclusión podemos mencionar que el presente trabajo enfatiza la naturaleza pleiotrópica potencial de las citocinas así como el complejo mecanismo regulatorio que existe en el hígado.

En este estudio in Vitro se deja claro que la IL-4 puede prevenir la secreción de la IL-8 en células HepG2 tratadas con Ac, mientras que IL-10 no presenta dicho efecto. Más aún, la IL-10 por si sola incrementa la producción de IL-8 por un mecanismo dependiente de la sobreactivación de los factores nucleares NF-kB y AP1. Estos resultados están estrechamente relacionados con el origen de las células HepG2.

El papel multifacético de la IL-10 en el control de la comunicación celular en condiciones fisiológicas incluso patológicas, muestra nuevos horizontes para entender la evolución de un estado inflamatorio en la enfermedad hepática alcohólica.

La identificación de los mecanismos moleculares descritos en este trabajo podría facilitar otros estudios tendientes a comprender mejor la fisiopatología de procesos que ocurren en algunos tipos de cáncer.

## VII REFERENCIAS

Albano E, French SW, Ingelman-Sundberg M. Hidroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front.Biosci.* 1999; 4: d533-540.

Chomczynski, PA. Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 536-537.

Chuang LM, Tai, TY, Kahn RC. Signal transduction pathways for interleukin 4 and insulin in human hepatoma cells *J. Biochem* 1996; 120:111-116.

Colell A, García-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Marí M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernández-Checa J.C. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 1998; 115: 1541-1551.

Conti P., Kempuraj D, Frydas S, Kandere K, Boucher W, Letourneau R, Madhappan B, Sagimoto K, Christodoulou S, Theoharides TC. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, and IL-26. *Immunol Letters* 2003; 88:171-174.

Dalton T, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. 1999; 39:67-101.

Damme JV. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. En: *The cytokine handbook*, Thomson, A.W. Editor. Academic Press, 1994; 185-208.

Denizot Y, Besse A, Raheer S, Nachat R, Trimoreaou F, Praloran V, et al. Interleukin-4 (IL-4), but not IL-10, regulates the synthesis of IL-6, IL-8 and leukemia inhibitory factor by human bone marrow stromal cells. *BBA* 1999; 1449:83-92.

Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Fannin R, Montuschi P, Flood L, Luster MI. Cytokine expression in hepatocytes: Role of oxidant stress. *J Interferon Cytokine Res* 1998a; 18:629-638.

Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Wang S, Montuschi P, Flood L, Luster MI. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Tox Appl Pharma* 1998b; 151: 359-366.

Gomez-Quiroz L, Bucio L, Souza V, Escobar C, Farfán B, Hernandez E, Vargas, F, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz, MC. Interleukin 8 response and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde or lipopolysaccharide. *Hepatol Res* 2003; 26:134-141.

Gusdek A, Stalinska K, Guzik A, Koj A. Differential response of hematopoietic and non-hematopoietic cells to anti-inflammatory cytokines: IL-4, IL-13 and IL-10. *J. Physiol Pharmacol* 2000; 51:387-399.

Haddad JJ, Fahlman CS. Redox- and oxidant-mediated regulation of interleukin-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine? *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 163-76.

Harada K, Toyonaga A, Mitsuyama K, Sasaki E, Tanikawa, K. Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in rat experimental colitis. *Digestion*. 1994; 55:179-84.

Hattori E, Okumoto K, Adachi T, Takeda T, Ito J, Sugahara K, et al. Possible contribution of circulating interleukin-10 (IL-10) to anti-tumor immunity and prognosis in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003; 27:309-314.

Hill B, Schmidt J, Shedlofsky SI, Cohen DA. In vitro tumor necrosis factor cytotoxicity in HepG2 liver cells. *Hepatology* 1995; 21: 1114-1119.

Hurme M, Henttinen T, Karpelin M, Varkila K, Matikainen S. Effect of interleukin-10 on NF- $\kappa$ B and AP1 activities in interleukin-2 dependent CD8 T lymphoblasts. *Immunol Lett* 1994; 42:129-133.

Iguchi A, Kitajima I, Yamakuchi M. PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279:166-71.

Jayathilleke A, Shaw S. Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. *Alcohol* 1998; 16:119-123.

Li CP, Lee FY, Tsai YT, Lin HC, Lu RH, Hou MC, Wang SS, Lee SD. Plasma interleukin-8 levels in patients with post hepatic cirrhosis: relationship to severity of liver disease, portal hypertension and hyperdynamic circulation. *J. Gastroenterol. Hepatology*. 1996; 11: 635-640

Lieber CS. Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. *Ann. Med.* 1994; 26:325-330.

Lindley IJD. Interleukin-8. En: *Cytokines*, Academic Press 1998; 126-140.

Lluis JM, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology* 2003; 124:708-724.

Locati M, Murphy PM. Chemokines and chemokine receptors. Biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev. Med.* 1999; 50: 425-440.

Manna SK, Aggarwal BB. Interleukin-4 down-regulates both forms of tumor necrosis factor receptor and receptor mediated apoptosis, NF- $\kappa$ B, AP-1 and c-jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1999; 273: 33333-33341.

Marie C, Fitting C, Muret J, Payen D, Cavaillon UJM. Interleukin 8 production in whole blood assays: is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 1999; 12: 55-60.

Martínez-Brú C, Gómez C, Cortés M, Soriano G, Guarner C, Planella T, González-Sastre F. Ascitic fluid interleukin-8 to distinguish spontaneous bacterial peritonitis and sterile ascitis in cirrhotic patients. *Clin Chem* 1999; 45: 2027-2028.

Mocellin S, Panelli MC, Wang E. The dual role of IL-10 *Trends Immunol* 2003; 24: 36-43.



Roebuck KA. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon cytokine Res* 1999; 19:429-438.

Roman J, Colell A, Blasco C, Caballeria J, Parés A, Rodés J, Fernández-Checa JC. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HepG2 cells: Effect on transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B. *Hepatology* 1999; 30:1473-1480.

Roman J, Gimenez A, Lluís JM, Gassó M, Rubio M, Caballeria J, et al. Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells. *J Biol Chem* 2000; 275:14684-14690.

Rutkowski P, Kaminska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* 2003; 84:151-159.

Sheron N, Bird G, Koskinas J, Portmann B, Ceska M, Lindley I, Williams R. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology* 1993; 18: 41-46.

Shiratori Y, Takada H, Hikiba Y, Nakata R, Okano K, Komatsu Y, Niwa Y, Matsumura M, Shiina S, Omata M. Production of chemotactic factor, interleukin-8, from hepatocytes exposed to ethanol. *Hepatology* 1993; 18:1417-1482.

Simpson KS, Lukacs NW, Colleti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. *J hepatol* 1997; 27:1120-1132

Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, DiLiberto D, Patti M, et al. Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer Res* 2003; 63:6784-6790.

Sugita N, Kimura A, Matsuki Y. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolisaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation* 1998; 22:253-267.

Viña J, Hems R, Krebs HA. Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *J Biochem* 1978; 170:627-630.

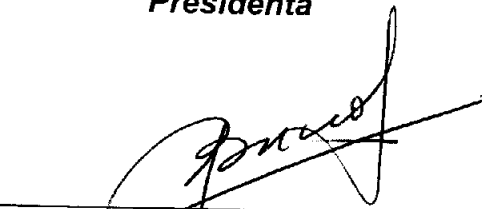
Wigmore SJ, Maingay JP, Fearon KC, O'Riordain MG, Ross JA. Effect of interleukin-4 on pro-inflammatory cytokine production and the acute phase response in healthy individuals and in patients with cancer or multiple organ failure. *Clin Sci* 1998; 95:347-354.

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobaron la presente tesis el día 16 de julio del 2004.



---

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz  
**Presidenta**



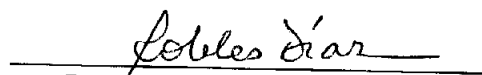
---

Dra. Leticia Bucio Ortiz  
**Secretaria**



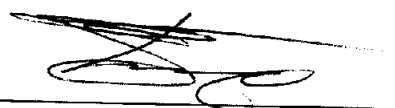
---

Dr. David Kershengbich Stalnikowicz  
**Vocal**



---

Dr. Guillermo Robles Díaz  
**Vocal**



---

Dra. María Teresa Corona Ortega  
**Vocal**