

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



EFEECTO DE PENTOXIFILINA EN LA EXPRESIÓN DE IL-6,
IL-1 β , Y TGF- β EN CELULAS ESTELARES CFSC-2G
TRATADAS CON ACETALDEHÍDO.

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
PRESENTA

Elizabeth Hernández Pérez

2003

El Doctorado En Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP 20-93.

Esta tesis forma parte del proyecto de investigación "Alteraciones producidas por células de origen hepático por distintos agentes tóxicos" apoyado por el CONACyT con el número de convenio 400200-525175

DE CUANTOS TRABAJOS ME TOME,
CUANTAS DIFICULTADES HUBE DE SUFRIR
CUANTAS VECES DESEPERE Y CUANTAS
OTRAS DESISTI Y EMPECE DE NUEVO.
POR EL EMPEÑO DE APRENDER, TESTIGO
ES MI CONCIENCIA

SOR JUANA INES DE LA CRUZ

RESUMEN

La fibrosis hepática es el resultado del depósito excesivo y desorganizado de los componentes de la matriz extracelular. Se considera que las células estelares juegan un papel principal en el desarrollo de la fibrosis hepática, debido a que son el principal tipo celular efector en la producción de los diferentes componentes de la matriz extracelular. En el presente trabajo se probó el efecto de la pentoxifilina (PTX), un derivado de metilxantina, en la inducción y la secreción de $\alpha_1(I)$ colágena, así como en la producción del ARNm del TGF- β , la IL-1 β , y la IL-6 en una línea celular hepática de rata (CFSC-2G) expuesta a acetaldehído. Las células estelares CFSC-2G fueron expuestas a acetaldehído 175 μ M durante 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con PTX 200 μ M. La secreción de colágena incrementó de manera significativa 2.6 veces con respecto a las células control. Las células expuestas a acetaldehído y tratadas con PTX disminuyeron la secreción de colágena a los valores de las células control, y disminuyeron la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena 15 %. Los ensayos realizados de RT-PCR para la determinación de la expresión del TGF- β y de IL-1 β , no mostraron diferencias significativas con el diseño experimental abordado. Mientras que la PTX disminuyó 32 % la expresión de IL-6 en células tratadas con acetaldehído. Las células CFSC-2G que fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal IL-6, no mostraron incremento en la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena. Las células estelares tratadas con acetaldehído mostraron un incremento significativo en la expresión del factor nuclear κ B (NF κ B), en tanto que las células tratadas con acetaldehído y PTX mostraron valores parecidos a los de las células control. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la PTX disminuye la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena en un mecanismo mediado por el bloqueo de la activación del (NF- κ B) el cual inhibe la expresión de IL-6.

ABSTRACT

Liver fibrosis is the common consequence of different liver diseases characterized by chronic liver tissue damage. Several studies have clearly shown that this process is the consequence of the chronic activation of extracellular matrix producing cells, particularly of hepatic stellate cells, leading to cell proliferation and increased deposition of extracellular matrix components. The effect of pentoxifylline (PTX), a methylxanthine derivative, on collagen induction and secretion and the production of mRNA cytokines; IL-6, IL-1 β and TGF- β in a rat hepatic stellate cell line (CFSC-2G) exposed to acetaldehyde was studied. CFSC-2G cells were treated with 175 μ M acetaldehyde for 24h. The cells were then exposed to a medium containing 200 μ M PTX. Collagen secretion, increased 2.6 times in acetaldehyde treated cells. Cells exposed to acetaldehyde and treated with PTX diminished collagen secretion to control values and decreased $\alpha_1(I)$ collagen mRNA by 15 %. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assays of TGF- β_1 and IL-1- β mRNA showed no variation in different experimental conditions. However, PTX induced a decrease of 32 % in IL-6 mRNA in acetaldehyde treated cells. CFSC-2G treated with anti IL-6 monoclonal antibody, 15 min before acetaldehyde was added, did not present an increase in $\alpha_1(I)$ collagen mRNA. EMSA assay showed that acetaldehyde increase NF- κ B activation, while PTX diminish NF- κ B activation to control values. Ours results show that PTX prevents the increase of $\alpha_1(I)$ collagen expression by inhibiting the activation of NF κ B and IL-6 induction in acetaldehyde treated cells.

INDICE

Indice	de	I
Figuras.....		
Indice de abreviaturas.....		II
Resumen (Español).....		III
Resumen (Inglés).....		IV
Capítulo 1.- Introducción.....		1
1.1.- Fibrosis Hepática.....		1
1.2.- Papel de citocinas y factores de crecimiento en la fibrosis hepática.....		1
1.3.- Células estelares y su papel en la fibrosis hepática.....		4
1.4.- Metabolismo del etanol.....		9
1.5.- Importancia del acetaldehído en la fibrosis hepática.....		10
1.6.- Estructura y organización del gen de colágena tipo I.....		11
1.7.- Enfermedad Hepática Alcohólica.....		12
1.8.- Terapia antifibrogénica.....		15
1.8.1.Pentoxifilina.....		17
1.9.- Modelo Celular.....		19
1.10.- Justificación		20
Objetivos.....		21
Hipótesis.....		21
Capítulo 2 Material y Métodos		22
2.1 Cultivo celular.....		22
2.2.Diseño Experimental.....		22
2.3 Viabilidad Celular.....		23
2.4.- Determinación de la secreción de colágena.....		24
2.5.- Aislamiento de RNA.....		24
2.6.- RT-PCR Para la determinación de $\alpha 1$ colágena, TGF- β , IL-6, IL-1- β		25
2.7.- Northern Bloth para α (I) colágena.....		27
2.8.- Preparación para extractos nucleares.....		28
2.9.-Ensayo	para	Movilidad 28
Electroforetica.....		
2.10.- Análisis de datos.....		29
3.- Capítulo 3 Resultados.....		30
3.1.- Viabilidad Celular.....		30
3.2.- Secreción de colágena.....		31
3.3.- Efecto de la PTX en la expresión de colágena.....		31
3.4.- Efecto de la PTX en la expresión de TGF- β IL-1- β e IL-6.....		35
3.5.- Efecto del anticuerpo monoclonal anti IL-6.....		43
3.6.- Efecto de la PTX en la expresión de α (I) colágena (3h).....		48
3.7.- Efecto de la PTX en la activación del NF κ B.....		49
Capítulo 4 Discusión.....		51
4.1.- Viabilidad de las células CFSC-2G en presencia de PTX.....		51
4.2.- Efecto del Ac en células CFSC-2G.....		52
4.3.- Efecto del Ac en la expresión de TGF- β , IL-1- β , IL-6.....		52
4.4.- Acción fibrogénica de IL-6.....		53

4.5.- Efecto de la PTX en la secreción y expresión de colágena en células CFSC-2G.....	54
4.6.- Efecto de la PTX sobre citocinas profibrogénicas TGF- β , e IL-6.....	56
4.7.- Acción Antifibrogénica de la PTX vía la regulación negativa de IL-6.....	57
4.8.- Efecto de PTX en la expresión de IL-1 β	59
4.9.- Efecto e la PTX en la activación del NF κ B.....	60
4.10.- Perspectivas.....	61
5.- Bibliografía.....	64
6.- Anexos	73

INTRODUCCIÓN

1.1.- FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es el resultado del depósito excesivo y desorganizado de muchos componentes de la matriz extracelular, de manera especial colágena de tipo I y III. Se ha sugerido que el incremento de colágena se debe a un desbalance entre el incremento de la producción de la proteína y la disminución relativa en su degradación. La fibrosis hepática representa la respuesta de cicatrización del hígado a diversos insultos debidos a enfermedades parasitarias, infecciones virales (principalmente hepatitis B y C), daño tóxico (principalmente por alcohol), desórdenes del sistema inmune (hepatitis activa autoinmune crónica y cirrosis biliar primaria), enfermedades poco frecuentes del hígado como hemocromatosis y enfermedad de Wilson's (Iredale 1998, Reeves y Friedman 2002).

Se considera a las células estelares como el principal tipo efector en el proceso de la fibrosis, debido a que este tipo celular en respuesta a un insulto sufre una transformación denominada "activación". El resultado de esta activación va dar como resultado que estas células produzcan diferentes proteínas de matriz extracelular principalmente colágena de tipo I (Pinzani y col 1998). Sin embargo, si bien es cierto que las células estelares se consideran el punto central en la fibrosis hepática, se necesita de la interrelación de los diferentes tipos celulares hepáticos para que se dé la respuesta que lleva al proceso fibrogénico.

1.2.- PAPEL DE CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Entre los numerosos factores que pueden regular la síntesis y/o la deposición de las proteínas de la matriz extracelular, se ha enfocado especial atención a las citocinas. Las citocinas son polipéptidos de bajo peso molecular que actúan como mediadores pleitrópicos en la fibrosis hepática, y pueden

contribuir de manera significativa a la regulación del balance homeostático, tanto en condiciones fisiológicas, como en estados y patológicos (Grignani y Maiolo 2000). Las citocinas son secretadas por diversos tipos celulares en el hígado y son consideradas como mediadores de la comunicación intercelular dentro del órgano. Se ha reportado que una variedad amplia de citocinas juega un papel importante en la fibrosis, incrementando la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Diehl 2000). Resulta difícil tipificar a las diferentes citocinas. Sin embargo se han descrito como citocinas pro-inflamatorias, citocinas fibrogénicas, citocinas mitogénicas, y citocinas antiinflamatorias.

Las que a continuación se mencionan, son las algunas de las principales citocinas involucradas en la fibrosis hepática.

El factor de crecimiento transformante (TGF- β), es la citocina más estudiada en el proceso de la fibrosis hepática. Diversos tipos celulares pueden secretar esta citocina incluyendo los hepatocitos, las células endoteliales y las células estelares. El TGF- β induce la síntesis de muchas proteínas de la matriz extracelular, como la colágena, la fibronectina, la laminina, representando así un papel importante en la fibrosis hepática (Ghoosh 2002). Matsouka y col (1990) reportan que esta citocina, modula la expresión de la colágena por un mecanismo postranscripcional. Diehl (2000) reporta que el TGF- β está involucrado en la regulación positiva de la colagenasa 1.

García-Trevijano y col (1999), demostraron que el TGF- β induce la acumulación de H₂O₂, y que este agente oxidante, está involucrado, a su vez de manera directa con la regulación positiva de α (I) colágena, en células estelares de rata.

La interleucina-6 (IL-6) es una citocina multifuncional y pleitrópica (Richards 1988; Wevers 1992). Se ha reportado que ejerce una acción fibrogénica. Greenwel (1993) indica que esta citocina puede modular la expresión de α (I) colágena. Además de que puede incrementar la expresión de α ₂

macroglobulina (Heinrich y col 1990, y Reyes-Romero 1993) y tejido inhibidor de metaloproteinasa 1 (TIMP-1) la cual es un agente importante en la regulación de la actividad de la colagenasa (Lotz 1991; Shuppan 2001).

Greenwel y col (1995) reportan que IL-6, producida durante la respuesta de fase aguda, juega un papel importante en fibrosis hepática, ya que induce la expresión de la colágena, la fibronectina, y el TGF- β en las células hepáticas estelares de rata.

Los efectos del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en la producción de colágena es controversial. Se ha sugerido que puede incrementar la producción de colágena en un mecanismo postrancricional en células estelares de rata (Weiner 1990). Greenwel y col (2000) indican además que el TNF- α tiene la capacidad de incrementar la expresión de metaloproteinasas en las células estelares, indicando que el TNF- α antagoniza con acciones fibrogénicas del TGF- β . Iraburu y col (2000) reportan que el TNF- α inhibe la expresión de α (I) colágena en células hepáticas estelares de rata. Los autores concluyen que esta inhibición es mediada por la translocación y unión nuclear de p20 C/EBP β y C/EBPdelta. En este sentido Hernández y col (2000) reportan que el TNF- α inhibe la expresión de α (I) colágena, en un mecanismo mediado por la disminución de la unión del TNF- α y el factor de transcripción SP₁.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), es una de las citocinas con poder mitogénico más importante para las células estelares de hígado en rata, ratón y en humanos. Recientes investigaciones indican que el PDGF puede también estar involucrado en el intercambio del Na⁺ / H⁺, ligando en consecuencia con un papel en el pH intracelular (Pinzani 2002).

El papel de la IL-1- β en la fibrosis hepática es controversial ya que mientras algunos autores consideran que induce la proliferación en células estelares, pero no tiene efectos sobre la expresión de colágena (Matsouka y col 1990), otros como Ghosh (2002) reportan que la IL-1 β inhibe la síntesis de la

procolágena, e indica que esta citocina regula la síntesis de la α (I) colágena en células estelares a un nivel posttranscripcional.

Sin embargo, la principal participación del TNF- α y la IL-1- β en la fibrosis hepática, es en su carácter de citocinas pro-inflamatorias. La respuesta de fase aguda es una reacción sistémica del organismo, a un estímulo inflamatorio no específico, que es acompañada por el incremento en la producción en una cascada de citocinas, que incluyen principalmente el TNF- α , la IL-1, y la IL-6, esta cascada de citocinas, iniciada aparentemente por TNF- α , es responsable de inducir cambios en la expresión de un juego de proteínas específicas denominadas proteínas de fase aguda. Nieto y col (2001) reportan que las células estelares de rata contribuyen a la respuesta de fase aguda, con el incremento en la expresión de la colágena α (I) y α (IV), así como el TIMP-1 y el TIMP-2

1.3.- CELULAS ESTELARES Y SU PAPEL EN LA FIBROSIS HEPÁTICA:

Las células estelares, fueron descritas por primera vez en 1876, pero fue hasta 1971, que se reconoce la importancia de estas células en la patogénesis de la fibrosis hepática, y desde entonces han sido objeto de estudio (Geerts 2001).

Las células estelares también son conocidas como células almacenadoras de grasa, células estrelladas, células de Ito, o lipocitos. En estado quiescente representan entre el 5 y el 8% del total del número de células en el hígado. Estas células tienen un papel cardinal en el almacenamiento de retinoides y son responsables de la liberación de éstos. Controlan también el recambio de la matriz extracelular, en el espacio de Disse a través de la secreción correcta de un número limitado de moléculas de matriz extracelular y por la liberación de metaloproteinasas, y sus inhibidores. Se sabe que estas células contribuyen al control del flujo sanguíneo a través de los capilares sinusoidales (Hautekeete y Geerts

1997, Flisiak 1997). También se consideran a estas células como fuentes importantes de factores quimioatrayentes que mantienen la homeostasis en el micro ambiente del sinusoides hepático (Flisiak 1997, Britton y Bacon, 1999; Geerts 2001).

Se ha establecido que durante una lesión al hígado, las células estelares sufren una "activación". El término "activación" se refiere a la transición del estado quiescente de las células estelares, las cuales son ricas en vitamina A, hacia un tipo celular denominado miofibroblasto, el cual es altamente proliferativo, fibrogénico, con actividad contráctil, y con una reducción en el contenido de la vitamina A.

Un daño progresivo al hígado, la activación de las células estelares y el depósito de la matriz extracelular, en el subendotelio del espacio de Disse (entre los hepatocitos y las células endoteliales) provocan una cascada de eventos que contribuyen a deteriorar la función hepática. Este proceso ha sido nombrado como capilarización del sinusoides (Pinzani, y Marra 2001, Gressner, y Bachem 1995) fig 1.

Friedman (1999; Eng y Friedman 2000) divide el proceso de activación en dos fases 1) Iniciación y 2) perpetuación (figura 2).

INICIACIÓN

La iniciación se refiere a los cambios primarios fenotípicos, situación que brinda mayor capacidad de respuesta a factores de crecimiento, incluyendo crecimiento y la producción de moléculas de matriz extracelular. Los factores de iniciación que disparan los cambios tempranos en las células estelares son principalmente parácrinos. El estímulo parácrino que inicia la activación de las células estelares, puede derivar de hepatocitos dañados, células Kupffer, y células endoteliales.

Por su parte las células endoteliales participan en el procesamiento de TGF- β_1 convirtiéndolo de la forma latente a la forma activa, a través de la activación de la plasmina (Okuno y col 1997). Con

respecto a la activación de las células de Kupffer, también participan de manera importante, se ha reportado que la infiltración de estas células, se correlaciona con marcadores de activación de células estelares (Hines y col 1993). Las células mononucleares, son una importante fuente de factores parácrinos, principalmente del PDGF, el TGF- β_1 y el factor de crecimiento epidermal (EGF).

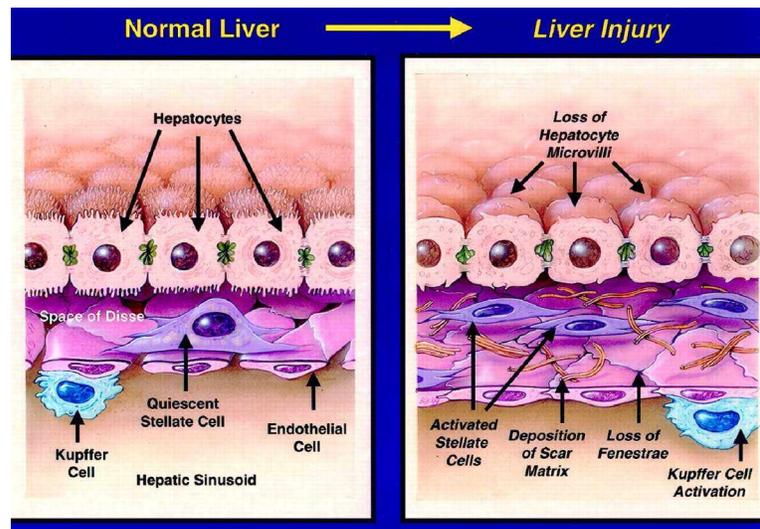


Fig 1.- Eventos del sinusoide durante la fibrosis del hígado, cambios en el espacio de Disse, en respuesta a una lesión, que incluye la respuesta celular, y la producción de la matriz extracelular. En este proceso se pierden los microvellosidades de los hepatocitos, repercutiendo en la función hepática. La activación de las células de Kupffer, contribuyen a la activación de las células estelares.

PERPETUACIÓN

La activación de las células estelares involucra al menos siete cambios en el comportamiento celular: la proliferación, la quimiotaxis, la fibrogénesis, la contractilidad, la degradación de la matriz extracelular, la pérdida de retinoides, quimiotrayentes de células mononucleares, y la liberación de citocinas. De manera directa o indirecta, el efecto neto de estos cambios, da como resultado el incremento de la matriz extracelular (Friedman 1999).

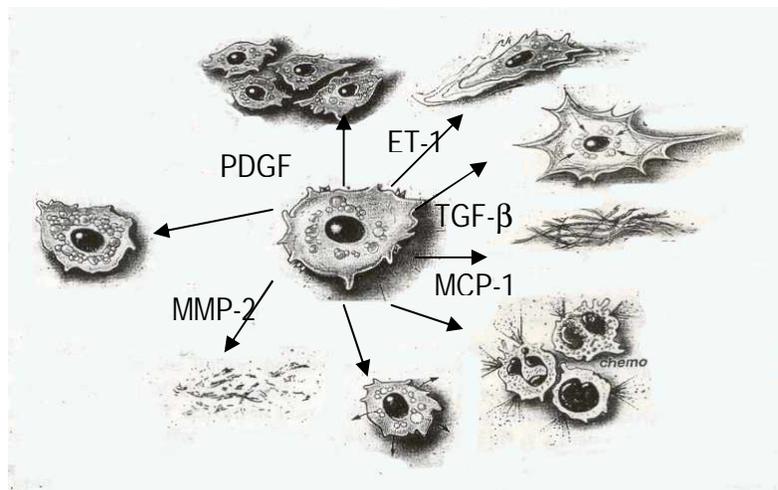


Fig 2.- Cambios fenotípicos durante la activación de las células estelares durante la fibrosis hepática, después de una lesión. Los principales cambios fenotípicos incluyen la proliferación la contractilidad, la fibrogénesis, la degradación de la matriz extracelular, la quimiotaxis, la pérdida de retinoides.

Por otra parte Gressner (1996) expone un modelo denominado mecanismo de cascada en tres fases, en donde propone la activación de las células estelares, que consiste en tres fases: la fase preinflamatoria, la fase inflamatoria y la fase postinflamatoria.

FASE 1) fase pre inflamatoria: en donde solo un daño ligero a los hepatocitos es suficiente para producir la liberación parácrina de factores que inducen la proliferación de células estelares. Además señala que el metabolismo de etanol por los hepatocitos, produce acetaldehído y lípido-peróxidos, los cuales estimulan la expresión génica de proteínas de la matriz extracelular, en las células estelares cercanas. Diversos autores han indicado al acetaldehído como un agente fibrogénico *per se*. Esto ocurre antes de que la segunda fase se haga efectiva.

FASE 2) fase inflamatoria, las citocinas provenientes de las células Kupffer activadas, ($TGF-\beta_1$, $TGF-\alpha$, $TNF\alpha$) así como de la desintegración de células plaquetarias ($TGF-\beta_1$, EGF, PDGF). La liberación de estas citocinas estimulan a las células estelares a proliferar y a transformarse a miofibroblastos. La activación de las células de Kupffer y la infiltración de células mononucleares es parcialmente iniciada por la fagocitosis del desecho celular. La activación de las células de Kupffer, puede a su vez inducir daño en los hepatocitos, por la liberación de proteasas o citocinas tóxicas ($TNF-\alpha$), y la liberación de radicales de oxígeno. En la fase inflamatoria $TGF-\beta$, acelera la transdiferenciación de células estelares a miofibroblastos y puede producir apoptosis en hepatocitos (Oberhammer y col 1991) y puede perpetuar el proceso fibrogénico, en un círculo vicioso (Gressner y Mannherz 1994).

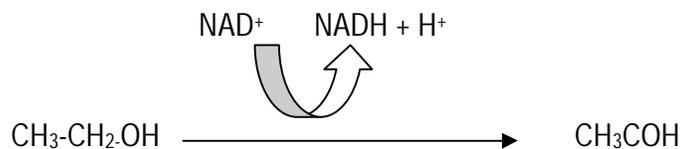
FASE 3) fase postinflamatoria, los miofibroblastos son estimulados en un brazo autócrino generado por $TGF-\beta_1$, $TGF-\alpha_1$, y FGF. Estos factores son expresados y secretados por los miofibroblastos. En combinación con una estimulación parácrina posterior de células estelares no activadas por los

miofibroblastos, la fase postinflamatoria contribuye a auto perpetuar la fibrogenesis aún cuando el insulto inicial haya cesado. (Gressner, 1995, Gressner 1996).

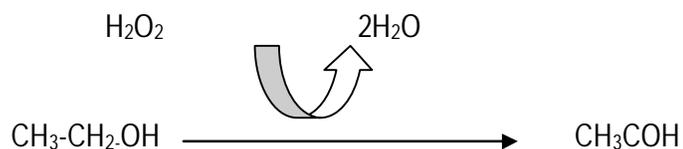
1.4.-METABOLISMO DEL ETANOL

El etanol es absorbido principalmente en el intestino donde es canalizado a través de la vena porta al hígado, antes de pasar al sistema circulatorio y al resto del cuerpo. El hígado es el principal órgano responsable de la eliminación y oxidación del alcohol ingerido. En el hígado existen tres sistemas capaces de llevar a acabo la oxidación del etanol (Riveros Rosas y col 1997).

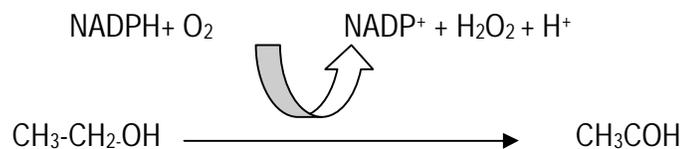
El primer sistema consiste de una serie de enzimas que conocidas genéricamente como alcohol deshidrogenesas (ADHs), las cuales se encuentran en el citosol de diferentes tejido, principalmente en el hígado. Estas enzimas promueven la oxidación del etanol a acetaldehído, acoplado esta oxidación con la reducción de nicotín adenín dinucleótuido (NAD^+) (Riveros Rosas y col 1997).



El segundo sistema se encuentra en los peroxisomas de las células hepáticas, en este sistema la oxidación de una molécula de etanol a acetaldehído es acoplada con la descomposición simultánea de una molécula de peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por la catalasa.



El tercero y último sistema oxidativo es llamado sistema oxidativo microsomal (microsomal etanol-oxidante) (MEOS), el cual se encuentra en el interior de los microsomas y requiere de la participación del citocromo P450 2E1. El citocromo P450 2E1 acopla etanol, NADPH y oxígeno, el resultado es la formación de una molécula de peróxido y la oxidación del etanol a acetaldehído (Riveros Rosas y col 1997).



Estos tres sistemas trabajan simultáneamente en presencia del etanol, aunque con diferentes actividades y afinidades.

1.5.- IMPORTANCIA DEL ACETALDEHÍDO EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Diversos reportes indican que el alcohol es una de las principales causas de la cirrosis, mientras que los problemas clínicos que son ocasionados por el alcohol han sido objetivo de numerosos estudios, los mecanismos moleculares que llevan al incremento de la α (I) colágena de las células estelares no han sido completamente clarificados (Brenner y Chojkier 1987, Cassini y col 1993, Svegliati y col 2001). El acetaldehído, producto del metabolismo oxidativo del etanol, es un metabolito altamente reactivo y se ha reportado que juega un papel patogénico en la enfermedad hepática alcohólica (Román y col 2000). Se ha demostrado que el acetaldehído, y no el etanol induce el incremento (2.5 veces) en la expresión

de α (I) colágena en fibroblastos 3T3 (Brenner y Chojkier 1987). Estudios posteriores indican que el incremento en la expresión de α (I) colágena en células estelares es debido al acetaldehído (Casini y col 1991). Estas observaciones indican que el acetaldehído incrementa el gen de la α (I) colágena a nivel transcripcional. Sin embargo estos resultados no excluyen la posibilidad de que otros mecanismos puedan estar involucrados en la regulación del gen α (I) colágena. Stefanovic y col (1997) reportan una regulación postranscripcional. Estos resultados sugieren que en el incremento de la expresión de α (I) colágena, en células estelares activadas, pueden estar involucrados mecanismos transcripcionales y postranscripcionales (Chen 2000). Diversos reportes indican que el acetaldehído es responsable, al menos parcialmente del incremento en la expresión de α (I) colágena, en la fibrosis inducida por alcohol (Brenner 1987, Cassini 1993).

El acetaldehído se ha asociado con la producción de acetatos, la formación de aductos, y los cambios en el estado redox de las células. La contribución de estos factores en conjunto llevan al incremento de la fibrosis hepática, por mecanismos que no han sido completamente dilucidados. Chen y Davis (2000) han reportado que las células estelares de rata estimuladas con acetaldehído, incrementan la expresión de α (I) colágena, y proponen el mecanismo de señalización, en donde el acetaldehído activa JNK1,2 el cual fosforila a c-Jun, y se incrementa la activación del factor nuclear AP-1, resultando en una regulación positiva de α (I) colágena (Roman 2000).

1.6.- ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GEN DE COLÁGENA TIPO I

Los espacios extracelulares en los tejidos están formados por la matriz extracelular, la cual está compuesta por proteoglucanos, como la decorina y la fibromodulina; proteínas fibrosas como la colágena, la elastina y la fibrilina; moléculas de adhesión como la fibronectina y la laminina y los

diferentes tipos de metaloproteinasas. Todas estas proteínas juegan un papel importante en la señalización celular y actividades celulares (Raghow 1994).

Los diferentes tipos de colágena, representan las principales proteínas fibrosas en la matriz extracelular. Se han identificado entre 19 y 20 tipos de colágena. La naturaleza molecular y las funciones de cada una de éstas ya han sido descritas. La colágena tipo I es el producto de dos genes $\alpha 1$ (I) y $\alpha 2$ (I), los cuales en el humano están localizados en el cromosoma número 17 y 7 respectivamente (Miller 1988). Las cadenas de polipéptidos de pro $\alpha 1$ (I) y $\alpha 2$ (I), son sintetizadas por los fibroblastos y los osteoblastos y entran al retículo endoplasmático en donde residuos específicos de lisina y prolina son hidroxilados para formar hidroxiprolina e hidroxilisina respectivamente, las cuales ayudan a las cadenas de pro- α a combinarse con otras cadenas mediante enlaces de hidrógeno y forman la estructura de colágena de triple hélice. Las procolágenas son secretadas por los fibroblastos a través del cuerpo de Golgi, en el espacio extracelular en donde los propéptidos de la terminal amino y la terminal carboxilo son cortados por proteasas específicas (Ghosh 2002).

La transcripción de la colágena es controlada de manera tejido específico. Este control involucra diversos elementos. Se han identificado diferentes factores de transcripción, los cuales actúan como promotores y regulan de manera positiva los genes de $\alpha 1$ (I) y $\alpha 2$ (I). Entre estos se conocen la participación del factor nuclear proteína activadora-1 (AP-1), el factor nuclear- κ B (NF κ B) y el factor nuclear-1 (NF-1) (Rossi y col 1998, Kouba y col 1999).

1.7.- ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHOLICA

El alcohol induce un espectro amplio de cambios metabólicos, morfológicos, y clínicos en el hígado. Una de las principales formas de daño por ingesta crónica de alcohol, es el desarrollo de la fibrosis

hepática, la cual se caracteriza por un incremento extraordinario, y redistribución de los componentes de la matriz extracelular, entre ellos la colágena, los proteoglicanos y las glucoproteínas. Aún cuando se considera que la enfermedad hepática alcohólica, presenta un índice de morbilidad y mortalidad alto, los mecanismos moleculares responsables de la hepatotoxicidad del alcohol no han sido completamente caracterizados (Thurman 1998).

Se sabe que la ingesta crónica de alcohol estimula el consumo de oxígeno hepático y causa el hígado graso, la hepatomegalia, la fibrosis y posteriormente la cirrosis (Clemens 1995, Thurman 1998). En la enfermedad hepática alcohólica, están involucrados diferentes tipos celulares, como los hepatocitos, las células endoteliales, las células de Kupffer, los neutrófilos y los monocitos y las células estelares. La respuesta y la participación orquestada de todos estos tipos celulares, dan como resultado la progresión de la enfermedad hepática alcohólica (Greesner y Althaus 1998).

Diversos reportes indican la participación de las células de Kupffer en esta patología debido a su condición de macrófagos. La capacidad de las células de Kupffer para eliminar y detoxificar agentes exógenos y sustancias endógenas (como toxinas de bacterias) es una función fisiológica importante. Diversos reportes han mostrado que las células de Kupffer producen mediadores que pueden estimular el metabolismo del alcohol (Bradford 1993; Kamimura y col 1995). Se ha sugerido que la cascada de eventos que lleva a la hepatotoxicidad inducida por el alcohol es iniciada por un incremento en la liberación de endotoxinas como el lipopolisacárido (LPS). El LPS forma parte integral de la pared de bacterias Gram negativas en el intestino, y son potentes inductores de la inflamación, debido a los mediadores tóxicos que liberan. Bajo condiciones normales, cantidades pequeñas de endotoxina pueden atravesar la barrera de la mucosa, pasar a la circulación portal y ser rápidamente detoxificadas por las células de Kupffer. Sin embargo, los niveles de endotoxina se presentan elevados en consumos crónicos de alcohol, probablemente como resultado de la alteración de la función gastrointestinal,

incluyendo la proliferación de la flora intestinal. Como resultado se presenta un incremento de la permeabilidad del intestino, y se reduce la capacidad fagocítica de las células de Kupffer (Jarvelainen y col 1999).

Para que el receptor reconozca al LPS, se requiere que se una a la proteína unidora del LPS (LBP), la cual es secretada por los hepatocitos. El complejo que se forma con el LPS-LBP tiene una gran afinidad por el receptor CD14, localizado en las células de Kupffer. El CD14 es una glucoproteína de membrana expresada principalmente por monocitos y por macrófagos, incluyendo las células de Kupffer. La unión del complejo LPS-LBP al receptor CD14 inicia un proceso que lleva a la liberación de citocinas, como el TNF- α . La liberación de estas citocinas se considera un paso clave en la patogénesis de la enfermedad alcohólica del hígado porque dispara eventos inflamatorios. Se ha reportado que la ingesta crónica de alcohol provoca el incremento en la expresión de CD14 y la producción de diversas citocinas (Jarvelainen y col 1999). A este respecto se han reportado estudios en modelos animales de enfermedad hepática alcohólica, que muestran una sobreexpresión de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6, y se considera como un evento crítico en la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado en diferentes estudios que la neutralización del TNF- α , atenúa la inflamación y la necrosis causada por la ingesta crónica del etanol (Román y col 2000). Sin embargo diversos reportes indican que TNF- α inhibe la síntesis de colágena tipo I. La explicación para esta acción es abordada desde distintas posiciones: el TNF- α tiene la capacidad de incrementar la expresión de metaloproteinasas en células estelares y además antagoniza con las acciones fibrogénicas del TGF- β (Iraburu y col 2000, Greenwel y col 2000).

Con respecto a las células estelares, las cuales son activadas por las citocinas y los factores de crecimiento que son liberados por células endoteliales y las células de Kupffer, Gillis y col (1997)

reportan que ratas intoxicadas con etanol, provocan un incremento de células estelares en el espacio de Disse, que resulta en un incremento de colágena de tipo IV, seguida por la capilarización del sinusoides de la membrana basal de las células endoteliales (Takagashi y col 1991). La activación de las células estelares lleva al depósito de una gran variedad de proteínas de la matriz extracelular, secretadas por las mismas células estelares. Entre estas proteínas está el ácido hialurónico, el cual se encuentra incrementado en la sangre durante la fibrosis hepática. El ácido hialurónico es normalmente eliminado por las células endoteliales. Sin embargo en la enfermedad hepática alcohólica, las células endoteliales no son capaces de clarificar el ácido hialurónico (French 2000).

1.8.- TERAPIA ANTIFIBROTICA

En la medida que ha avanzado el estudio de la fibrosis hepática, se han incrementado las estrategias para establecer una terapia antifibrogénica. El objetivo de las terapias antifibrogénicas es que sean seguras, efectivas, y de preferencia órgano-específicas. Así, han surgido diversas clases de compuestos que se han utilizado en un intento de controlar la fibrosis hepática.

La activación de las células estelares resulta un atractivo blanco para el desarrollo de estrategias en terapia antifibrótica. Estas estrategias incluyen

a) Sanar la enfermedad para prevenir daño.

El camino más efectivo para eliminar la fibrosis hepática es eliminar la causa primaria que ocasiona la enfermedad. Esto incluye la abstinencia en el caso de que se trate de enfermedad alcohólica hepática, remover el exceso de cobre, o de fierro en hemocromatosis, o en la enfermedad de Wilson's respectivamente. La eliminación de HBV o HCV en la hepatitis crónica viral. La erradicación de organismos en esquistosomiasis, y la descompresión en la obstrucción del conducto (Safadi y Friedman 2002).

b) Reducción de la inflamación y respuesta inmune

Un gran número de agentes presentan actividad anti-inflamatoria, y pueden eliminar a la vez el estímulo que produce la activación de las células estelares. Entre estos los corticoesteroides han sido utilizados por décadas en diversas enfermedades hepáticas (Niki y col 1996). El uso de agentes antagonistas a TNF- α han sido empleados como agentes antiinflamatorios, esta estrategia ha mostrado tener buenos resultados en la enfermedad de Crohn's. También se ha reportado la neutralización de citocinas antiinflamatorias como la IL-1 (Manzini y col 1994).

c) Inhibición de la activación de las células estelares

La reducción de la activación de las células estelares es una estrategia atractiva, tomando en cuenta que este tipo celular se considera el principal efector de la producción de la matriz extracelular. La aproximación más práctica en este sentido es la reducción del estrés oxidativo, el cual es un estímulo importante para la activación de las células estelares. Los agentes antioxidantes incluyendo el alfa-tocoferol (vitamina E) suprimen la fibrogénesis (Pietrangello y col 1995). También se ha reportado el uso de N-acetilcisteína como agente antioxidante en el bloqueo de la activación de las células estelares en estudios *in vitro* (Kawada y col 1998). El uso de ciertas citocinas como el interferón- γ (IFN- γ), y el factor de crecimiento de hepatocito (HGF), han mostrado efectos en la inhibición de la activación de las células estelares, en modelos animales de fibrosis hepática (Ueki y col 1999; Wu 2000).

e) Neutralizar la respuesta a las células estelares

En este rubro se agrupan agentes antiproliferativos, antifibrogénicos, anticontractiles. En los últimos años se ha reportado un avance significativo en el desarrollo de agentes antiproliferativos, como antagonistas de receptores de ciertas citocinas como el PDGF. Como agente antifibrogénico de las células estelares se ha reportado a la pentoxifilina. En este sentido se han desarrollado agentes que

inhiben la síntesis de la colágena tal es el caso del H-EO77; o agentes que regulan de manera negativa la expresión de TIPM's, así como agentes que incrementen la síntesis de colagenasas (Salgado y col 2000).

Dentro de la terapia antifibrogénica se ha sugerido a la pentoxifilina debido a su capacidad para modular diferentes citocinas. Así, se ha reportado que la pentoxifilina puede controlar la fibrosis hepática debido a la acción antiinflamatoria, y antiproliferativa de las células estelares (Rossignol 1988; Peterson 1993; Windmeir y Gressner 1996, Pinzani 1996; Windmeir y Gressner 1997; Raetsch y col 2002). Sin embargo el mecanismo de acción de este fármaco sigue siendo punto de controversia.

1.8.1.- PENTOXIFILINA

La pentoxifilina (PTX), es una xantina trimetilada, usada ampliamente en desórdenes vasculares, debido a los efectos favorables que ejerce en la deformabilidad de eritrocitos, y sus propiedades vasodilatadoras periféricas. Como cualquier otra metilxantina, PTX es un inhibidor de las fosfodiesterasas, lo que ocasiona un incremento intracelular del AMPc, esta acción conduce a una mayor actividad de cinasas, como la PKC y la PKA las cuales fosforilan a diversas proteínas blanco. Esta respuesta conduce a la disminución en la expresión y efectos del TNF- α (Berman y col 1992; Biswas y col 1994; Gantner 1997).

En la última década se ha reportado que la PTX, puede ejercer una acción benéfica en la fibrosis hepática (Windmeir y Gressner 1997; Raetsch y col 2002).

Lee y col (1997) reportan que la pentoxifilina ejerce un efecto benéfico en la fibrosis hepática, mediante el bloqueo de la activación de las células estelares hepáticas de rata, interfiriendo con la cascada del estrés oxidativo y la activación del NF- κ B. Los autores indican que este mecanismo es independiente de la inhibición de fosfodiesterasas y el incremento de AMPc mediado por el bloqueo de la activación de

las células estelares. En este sentido, diversos reportes (Desmoliere y col 1999) indican que la pentoxifilina retarda la activación de las células estelares. Windmeier y Gressner (1996), reportan que el fármaco retarda la transdiferenciación y la proliferación de las células estelares, de forma dosis dependiente, así como una disminución en la liberación de la fibronectina. Resultados semejantes son reportados por Praux y col (1997) en donde concluyen que la pentoxifilina ejerce un efecto antifibrótico, ésta acción es explicada, por la reducción en la proliferación de las células estelares hepáticas humanas que en consecuencia disminuye la expresión y secreción de colágena (I) y (II).

Insbrucker y Peterson (1998) reportan en un estudio *in vitro* que la pentoxifilina modula la síntesis de la colágena en los miofibroblastos, mediante la inhibición del PDGF.

Diversos autores han ubicado a la pentoxifilina como un agente antifibrogénico, en este sentido Romanelli y col (1997), indican que esta acción es ejercida por el incremento de metaloproteinasa I, y no como un efecto sobre la disminución en la síntesis de la colágena.

Raetsch y col (2002) en un modelo animal de inducción de fibrosis por ligadura del conducto biliar, reportan que la pentoxifilina ejerce una acción antifibrogénica, mediante la disminución en la expresión de dos citocinas fibrogénicas, el TGF- β , y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), lo cual va a provocar la disminución en la expresión de procolágena (III). Los autores concluyen que sin embargo la disminución en la expresión de procolágena y el efecto benéfico de la pentoxifilina se ve minimizado debido a que en modelos animales éste fármaco produce paralelamente el incremento en TIMP-1.

Existen reportes que ubican a la pentoxifilina como un agente antiinflamatorio. Diferentes metilxantinas tienen un efecto antiinflamatorio, el cual se explica por la inhibición de fosfodiesterasas, que a su vez provoca el incremento de AMPc, y en consecuencia la inhibición de TNF- α (Berman y col 1992) Semmler y col 1993, Samlaska y col 1994, Mandel 1995, Entzian y col 1998). La acción antiinflamatoria

de la pentoxifilina además de la modulación del TNF- α , también es ejercida por la modulación de la IL-6 y de la IL-1 (Lefebvre y col 1996, Gantner y col 1997, Sampaio y col 1998).

1.9.- MODELO CELULAR

La evaluación directa de los efectos que produce un agente hepatotóxico como el acetaldehído en la producción de las citocinas, así como la acción de un fármaco, son difíciles de evaluar en un modelo animal. Esto se debe en parte a la presencia de los diferentes sistemas homeostáticos. Es por ello que estudios con estos objetivos se facilitan en sistemas de cultivo celular *in vitro*. Entre ellos, las líneas celulares han ofrecido grandes ventajas como modelo alternativo para evaluar algunos mecanismos de toxicidad. Los estudios de citotoxicidad basados en estos modelos pueden proveer información acerca de la potencia y mecanismos de acción de agentes xenobióticos con un mayor número de parámetros cuidadosamente controlados, en un menor tiempo y con la reducción de los costos (Porquet y col 1992). La importancia de las células estelares en la fibrosis hepática, ya ha sido descrita en este capítulo. Greenwel y col (1991) desarrollaron una línea celular que facilita los estudios en este campo de investigación. La línea celular CFSC-2G, fue obtenida de células de hígado de rata en donde se indujo cirrosis con tetracloruro de carbono (CCl₄). La línea celular fue obtenida después de una inmortalización espontánea en cultivo. Los autores analizaron distintos parámetros entre ellos la expresión de diferentes tipos de colágena (I, III, y IV) la fibronectina, la laminina, así como la expresión del TGF- β y la IL-6. Los resultados indican que esta línea celular tiene la capacidad de expresar las citocinas y factores de crecimiento mencionadas, y de los diferentes tipos de colágenas que estudiaron, sólo la de tipo IV no es expresada por esta línea celular. Esta línea celular presenta las características morfológicas de las células estelares "activadas". Cabe mencionar que estas características son observadas después de

que el cultivo celular ha sido 3 veces cosechado. Diversos estudios han sido desarrollados con la línea celular CFSC-2G con buenos resultados, indicando que estas células son una herramienta útil para el estudio de la alteración y regulación de la matriz extracelular en células estelares (Rojkind y col 1995, Greenwel y col 1993). Fontana y col (1997) mencionan que el uso de las células CFSC-2G resulta un modelo útil en el desarrollo de un cocultivo, con cultivos primarios de hepatocitos, en el estudio de fibrosis hepática inducida por alcohol. Por otra parte la utilidad de las células estelares en el estudio de la fibrosis hepática ha sido ampliamente reportado sin embargo, el efecto fibrogénico en una línea de células estelares hepáticas no podría ser observado dado que es en los hepatocitos en donde se lleva a cabo el metabolismo del etanol, por esta razón, se utiliza de manera directa el acetaldehído el cual es el primer metabolito del etanol.

1.10 .-Justificación

En México los índices de morbilidad y mortalidad debidas a la enfermedad hepática alcohólica, son altos y los mecanismos responsables de la hepatotoxicidad debida al alcohol no han sido completamente caracterizados. Entender estos mecanismos es importante para poder delinear una terapia antifibrógena. Además reportes del uso de la PTX en protocolos médicos experimentales han señalado una mejoría en pacientes con enfermedad hepática alcohólica debido a su efecto en la modulación del TNF- α (Akriviadis y col 2000). Sin embargo la participación de otras citocinas involucradas de manera importante en la fibrosis no ha sido documentada. En base a esto consideramos importante estudiar el efecto de la pentoxifilina en la expresión de la IL-6, la IL-1 β y del TGF- β en células estelares hepáticas tratadas con acetaldehído.



OBJETIVOS

Evaluar el efecto de la pentoxifilina en la inducción y secreción de α (I) colágena y citocinas inducidas por acetaldehído en células estelares de rata CFSC-2G.

Particulares

- Determinar el efecto de acetaldehído sobre la expresión de TGF- β , la IL-6, y la IL-1- β en células estelares de rata CFSC-2G
- Determinar el efecto de acetaldehído sobre la secreción y expresión de α (I) colágena en células estelares de rata CFSC-2G
- Determinar el efecto de PTX en la inducción y secreción de α (I) colágena en células estelares de rata CFSC-2G
- Determinar el efecto de PTX sobre el NF κ B de células estelares de rata CFSC-2G pretratadas con acetaldehído.

HIPÓTESIS

La pentoxifilina va a ejercer un efecto benéfico en células CFSC-2G pretratadas con acetaldehído, modulando de manera negativa la expresión de α (I) colágena, mediante el control de la expresión de la IL-6; la IL-1- β y el TGF- β .

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- CULTIVO CELULAR

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con la línea celular hepática de rata CFSC-2G, la cual fue obtenida y donada por el doctor Marcos Rojkind (Hospital Walter Reed, Washington D.C. USA). Las células fueron cultivadas en medio mínimo esencial (MEM), (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal (HyClone), aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100µg/ml). Las células fueron cultivadas en una incubadora a 37° C en botellas de plástico para cultivo (Nunc) en una atmósfera 5% CO₂/95% aire, humificada a saturación. El medio fue reemplazado dos veces por semana y las células fueron sembradas semanalmente en una relación de 1:3.

2.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Las células CFSC-2G fueron sembradas y 24 h después, el medio fue reemplazado por un medio sin suero, el cual contenía acetaldehído 175µM y se mantuvieron durante 24h. El medio conteniendo acetaldehído siempre fue preparado en el momento de la incubación. Cuando las células fueron expuestas a acetaldehído, las botellas fueron selladas con película parafilm, para evitar la evaporación. El medio con acetaldehído fue reemplazado por uno conteniendo pentoxifilina (Sigma) 200µM por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas dos veces con buffer de fosfatos (PBS), y se despegaron de la botella de cultivo con un gendarme de goma para la obtención de ARNm. El medio de cultivo fue centrifugado y guardado y las células fueron mantenidas a -70°C. Las células control fueron sembradas al mismo tiempo que las células tratadas, y fueron mantenidas bajo las mismas condiciones pero sin la adición de Ac o PTX. en la figura 3 se muestra un diagrama del diseño experimental.

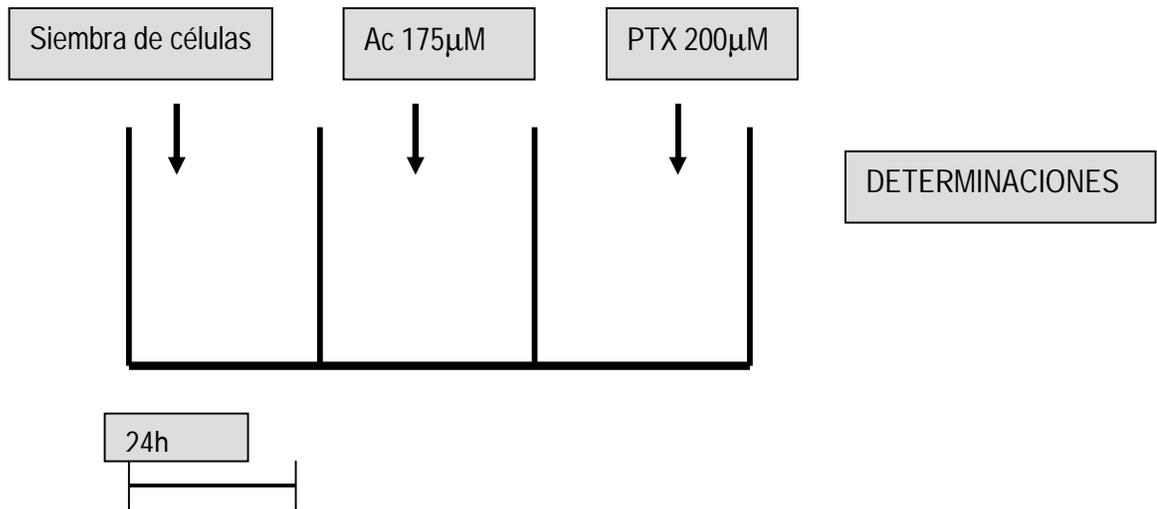


Figura 3.- Diagrama de diseño experimental. acetaldehído (Ac), pentoxifilina (PTX).

2.3.- VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular fue determinada por el método de MTT, el cual es un método que determina la funcionalidad celular y es sensible y cuantitativo. Se basa en la determinación de la actividad de la deshidrogenasa succínica mitocondrial en células vivas. El método convierte el sustrato soluble amarillo 3-(4,5, dimethylthiazol-2-yl) 2-5 difenil tetrazolium bromido (MTT) a un producto azul oscuro denominado formazan. 100 000 células fueron sembradas en cajas de Petri, 24h después el medio fue cambiado por uno sin suero conteniendo diferentes concentraciones de PTX: 80,100, 150, 170 y 200 µM, durante 24h, con la finalidad de elegir una concentración adecuada. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se les agregó una solución de 0.5mg/ml de MTT en PBS a pH 7.5, se incubaron durante 3h a 37° C y 90% de humedad. Terminado el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS y se les agregaron 500 µl de una solución de HCl 0.04N en 2-isopropanol, durante 15 min para disolver el formazán. El cambio de absorbancia se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro. La

funcionalidad se determinó como el porcentaje del cambio de extinción del MTT respecto a las células control (Denizot 1986).

2.4.- DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE COLAGENA

La determinación de la colágena secretada fue determinada por el método de Woessner (1961). Los medios de cultivo fueron hidrolizados con la adición de HCl a una concentración final de 6N. Las muestras fueron selladas al vacío en ampollitas pirex e hidrolizadas por 24 h a 110°C. Las ampollitas se rompieron y el contenido se evaporó y lavó con agua hasta tener un pH neutro, con un volumen final de 2 ml. La oxidación de la hidroxiprolina se inició con la adición de 100 µl de cloramina T. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 20 min. La cloramina T que no reaccionó fue consumida con la adición de ácido perclórico 6N, y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente se añadieron 100 µl de solución de p-dimetilaminobenzaldehído, y las muestras fueron incubadas durante 20 min a 60° C en un baño de agua. Las muestras se enfriaron en agua y la absorbancia de la solución fue determinada espectrofotométricamente a 557 nm. Los valores de hidroxiprolina fueron determinados directamente de una curva estándar.

2.5.- AISLAMIENTO DE ARN

La extracción de ARN total de las células CFSC-2G se realizó empleando la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). Se sembraron 1×10^6 células por cada tratamiento, y terminado el tiempo de incubación fijado en el diseño experimental, se les agregó 1 ml de Trizol y se levantaron con un gendarme de goma estéril. El homogenado se depositó en tubos Ependorff en donde se les dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se les agregó 0.2 ml de cloroformo y se agitó el

tubo por 15 sec. Las muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (superior) y se le agregó 0.5 ml de isopropanol, se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron nuevamente a 12 000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue decantado y el precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado (ARN total) obtenido fue secado al vacío. La pastilla de ARN obtenida fue resuspendida en una solución de dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1 % o agua libre de RNAasas.

Finalmente se cuantificó el RNA por espectrofotometría. Se leyó la absorbancia de la muestra a 260 nm.

La determinación de ARN fue determinada mediante la siguiente relación:

Concentración de ARN= (ID.O₂₆₀) (40µg/ml de ARN) (factor de dilución).

2.6.- RT-PCR PARA LA DETERMINACION DE α 1 COLAGENA, TGF- β , IL-6 e IL-1- β

Un total de 1.5 µg de ARN fue utilizado para la reacción de transcripción reversa con 0.5 µg de oligo dT 16 (Perkin Elmer), 10mM de cada uno de los cuatro desoxinucleotidos trifosfatos, 25 mM de MgCl₂ 10 U de inhibidor de RNAsa y 50 U de transcriptasa reversa (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Con respecto a la reacción de cadena polimerasa (PCR) fue realizada en presencia de buffer de PCR, 25 mM MgCl₂, 5 U de ADN polimerasa (Amolitaq Polimerase, Perkin Elmer), 3 µl cADN y 20 pmol de cada uno de los oligos.

Los oligonucleótidos de cada una de las citocinas y $\alpha 1(I)$ colágena se detallan en la siguiente lista:

$\alpha 1(I)$ colágena

5'GAG TGA GGC CAC GCA TCA GCC GAA GCT AAC 3'

5'AAG AGG AGC AGG AGC CGG AGG TCC ACA AAG 3'

IL-6

5'TCA ATG AGG AGA CTT GCC TG 3'

5' GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC 3'

$\beta 2$ micro globulina

5' GAT GCT GCT TAC ATG TCT 3'

5 'CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC 3'

IL-1- β

5'GGA TAT GGA GCA ACA AGT GG 3'

5' ATG TAC CAG TTG GGG AAC TG 3'

Las condiciones de corrida para cada citocina y la $\alpha 1(I)$ colágena fueron las siguientes:

	CONDICIONES
$\alpha 1$ colágena	35 ciclos (94°C 1min 53°C 1min 72°C1min)
IL-6	35 ciclos (94°C 1min 55°C 1min 72°C1min)
IL-1 β	35 ciclos (94°C 1min 57°C 1min 72°C1min)
TGF- β	35 ciclos (94°C 1min 57°C 1min 72°C1min)
$\beta 2\mu$ globulina	35 ciclos (94°C 1min 53°C 1min 72°C1min)

Tabla 1.- condiciones de PCR para $\alpha 1$ colágena, IL-6, IL-1 β , TGF- β , y $\beta 2$ microglobulina

Los pesos de las citocinas, sonda interna y $\alpha 1(I)$ colágena son reportados en la siguiente tabla:

	PESO PARES DE BASES
COLÁGENA	291
IL-6	260
IL-1	263
TGF- β	267
$\beta_2\mu$ globulina	268

Tabla 2.- Peso de colágena, citocinas y sonda interna

De los productos obtenidos de PCR se tomaron 5 μ l para llevar a cabo una electroforesis, en geles de agarosa al 1 %, con 0.05 μ g/ml de bromuro de etidio. La expresión de ARNm fue cuantificada en un analizador de imágenes (Phosphor Imager Bio Rad).

2.7.- NORTHERN BLOT PARA $\alpha 1(I)$ COLAGENA

15 μ g del producto de RT-PCR de los diferentes tratamientos celulares fueron utilizados para el análisis por Northern Blot. Las muestras fueron expuestas a una electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles agarosa/formaldehído al 1% y transferidos a una membrana de nylon. La membrana fue prehibridada 5 h a 42°C en 5X de solución salina de citratos (SSC), 50 % formamida, 50mmol/L fosfato de potasio, y 1X de solución Denhardt's. El ADNc fue marcado con $\alpha^{32}\text{Pb}$ CTP e incubado toda la

noche en solución de hibridación (0.1% SDS, 5X SSC, 50 % formamida, 50 mmol/L fosfato de potasio, 1 X de solución Denhart's, y 12.5 % de sulfato dextrán) a 42 °C. La membrana fue lavada 3 veces con 2X SSC y 0.5% SDS a 65°C durante 15 min. La membrana fue analizada utilizando un phosphorimager, acompañado de un software Image Quant. La señal de $\alpha 1(I)$ colágena fue normalizada con gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

2.8.- PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES

Los extractos nucleares fueron preparados basados en la técnica de Román y col (2000).

Se sembraron 3×10^6 células CFSC-2G en cajas de Petri, después de 24 h las células fueron tratadas con acetaldehído, y acetaldehído-pentoxifilina durante tres horas. Después de este periodo de incubación, las células fueron lavadas con PBS, y fueron colectadas con un gendarme de goma. Posteriormente las células fueron resuspendidas en un buffer Hepes 10 mM, pH 7.8, conteniendo 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM dithiothreitol, and 0.5mM PMSF, y fueron mantenidas en hielo durante 15 min. Pasado este tiempo las células fueron lisadas con Nonidet P-40 (Sigma RT), y fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 30 s a 4°C. Los núcleos fueron resuspendidos en 100 μ l de buffer C 20 mM Hepes, 0.4 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM dithiothreitol, 1mM PMSF. Los extractos nucleares fueron incubados durante 15 min en hielo, finalmente se llevó a cabo una centrifugación a 14 000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue fraccionado y almacenado a -80°C.

2.9.- ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA EMSA

La activación del factor de transcripción NF- κ B fue llevada a cabo utilizando los nucleótidos 5' AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' la sonda fue marcada por T4 polinucleótido kinasa según la

descripción de García Ruiz, (1995), y Morales (1997). Para la reacción de unión se utilizaron 10 µg de extractos nucleares en buffer de incubación: (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 40mM NaCl, 1mM EDTA y 4% glicerol), 1µg de poly (dI-dC), y oligonucleótido marcado ($\gamma^{32}\text{P}$ ATP) con 30 000cpm. La mezcla fue corrida en una electroforesis, y el gel fue secado y se realizó una autoradiografía a -70°C durante toda la noche.

2.10.- ANÁLISIS DE DATOS

Los datos son presentados como el promedio de los valores individuales \pm la desviación estándar (D.E) de 3-4 experimentos independientes. La versión 7 del paquete SPSS fue utilizada para el análisis estadístico. Las comparaciones entre grupos (control vs acetaldehído; acetaldehído vs PTX) fueron realizadas por ANOVA seguida de una prueba de Tukey's para comparaciones múltiples. Una $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1.- VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular no fue disminuida en presencia de las diferentes concentraciones de PTX con la prueba de azul de tripano. Con respecto a los resultados obtenidos de la prueba de MTT indican que la función mitocondrial presenta tendencia a disminuir a partir de 150 μM , sin llegar a ser significativa. Mostrando valores significativos en la disminución con 200 μM de PTX (34%) Fig 4).

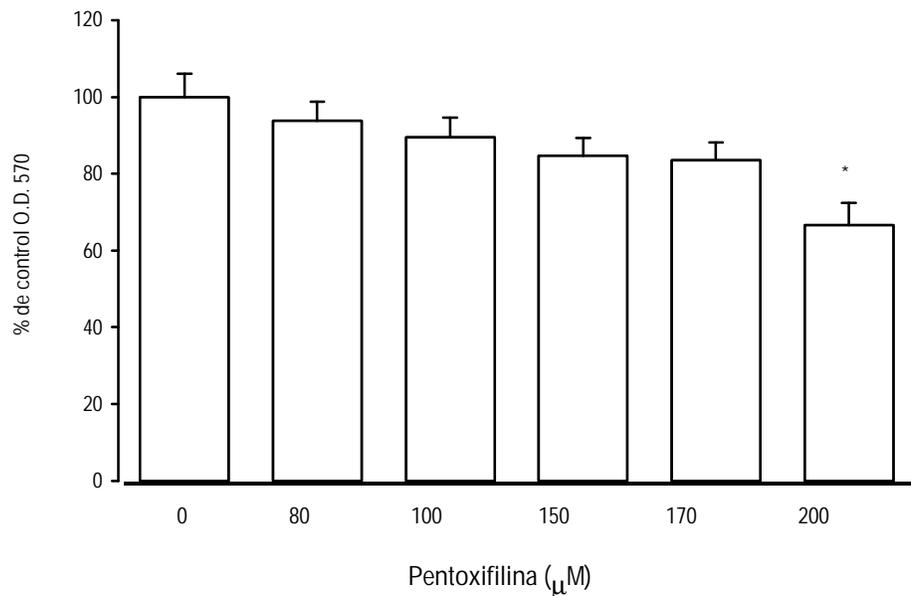


Figura 4) Viabilidad de la línea celular CFSC-2G en presencia de pentoxifilina (PTX). Las células fueron expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de PTX. El efecto citotóxico fue cuantificado por el ensayo de MTT. Los valores representan el promedio \pm DE de 4 experimentos independientes en duplicado. Diferencia significativa con respecto a células control *.

3.2.- SECRECION DE COLAGENA

En la figura 5 se muestran los resultados de la secreción de colágena de las células estelares tratadas con Ac y/o PTX. Las células que fueron expuestas a acetaldehído incrementaron 2.6 veces los niveles de colágena. En tanto que las células que se trataron con acetaldehído y después con PTX, disminuyeron significativamente los valores de secreción de colágena, presentando valores similares a los presentados por las células control. En tanto que las células expuestas a acetaldehído y posteriormente a medio normal mostraron una diferencia significativa con respecto a las células tratadas con Ac/PTX. Esto indica que la disminución en la secreción de colágena observada para células tratadas con Ac/PTX se debe expresamente a la acción de PTX y no a un efecto de recuperación de las células después de retirar el medio con acetaldehído.

3.3.- EFECTO DE LA PTX EN LA EXPRESIÓN DE α_1 (I) COLAGENA

Con respecto a la expresión de α (I) colágena, los valores obtenidos para las células control y las células tratadas con acetaldehído, no presentaron ninguna diferencia a las 24 h de tratamiento. En tanto que las células expuestas a pentoxifilina registraron una disminución significativa con respecto al control. Un comportamiento parecido se obtuvo para las células tratadas con acetaldehído y posteriormente a pentoxifilina, indicando que este fármaco disminuye la expresión de α (I) colágena en células CFSC-2G. Las células tratadas con acetaldehído y posteriormente con medio, registraron diferencia significativa con respecto a las células tratadas con Ac-PTX (Fig 6).

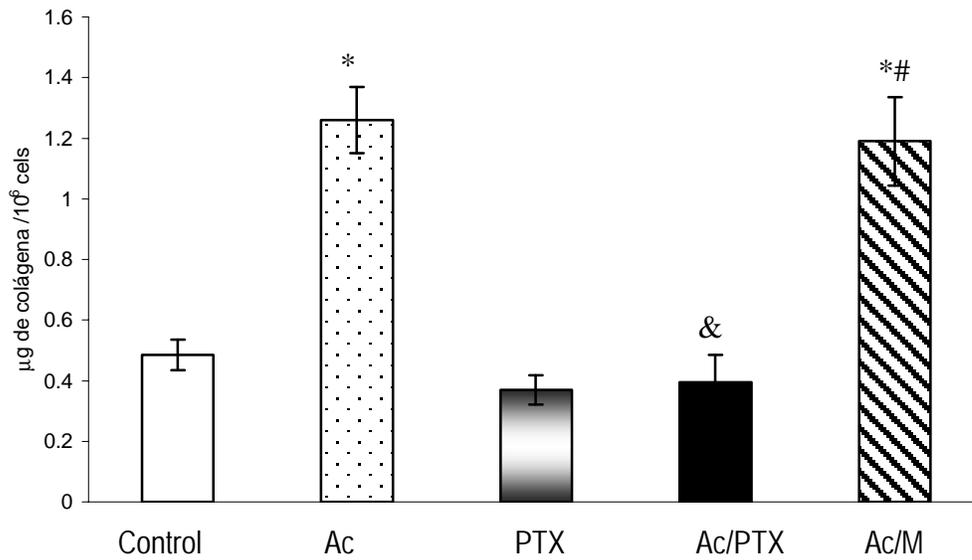
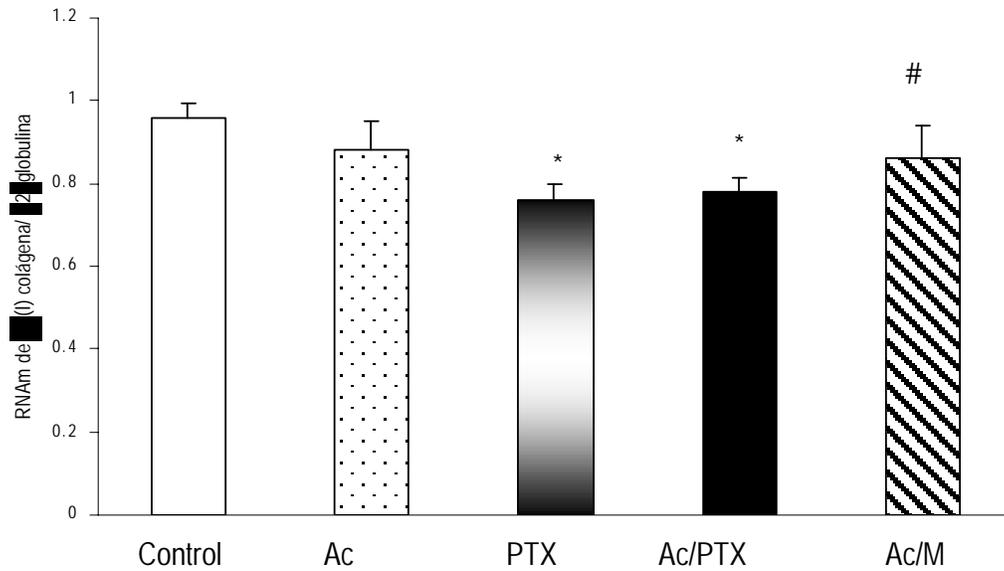


Fig 5 .- Efecto de pentoxifilina (PTX) en la secreción de colágena inducida por acetaldehído (Ac) en células CFSC-2G. Las células fueron sembradas y 24 h después el medio (M) fue cambiado por uno conteniendo acetaldehído 175 µM. La secreción de colágena fue determinada. En células tratadas con acetaldehído, el medio fue reemplazado por uno conteniendo PTX 200µM, las células fueron incubadas por otras 24 h y la secreción de colágena fue determinada. Los valores representan el promedio \pm DE de 4 experimentos independientes en duplicado. Diferencia significativa con respecto a células control *, células tratadas con ac & o células tratadas con Ac-PTX #

A



B

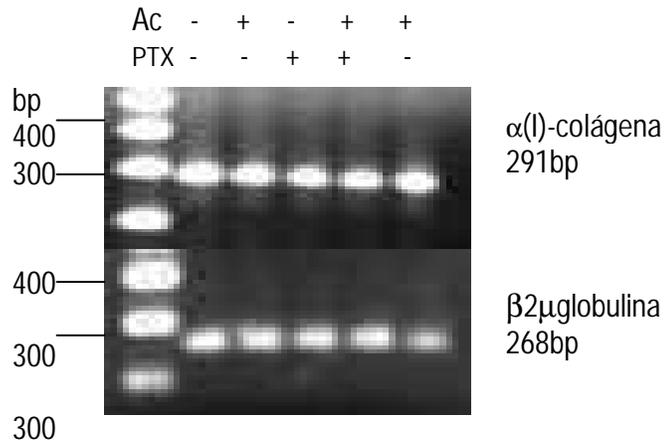
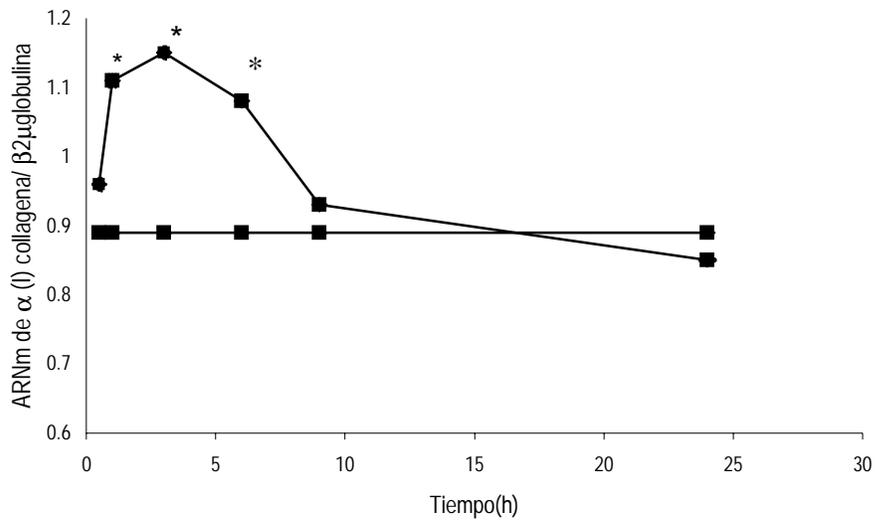


Fig 6.- Efecto de pentoxifilina (PTX) en la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena de células CFSC-2G expuestas a acetaldehído (Ac) Las células fueron sembradas y 24 h después el medio (M) fue cambiado por uno conteniendo Ac 175 μ M. La expresión fue determinada. En otras células tratadas con acetaldehído el medio fue reemplazado por uno conteniendo PTX 200 μ M, las células fueron incubadas por otras 24 h y la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena fue determinada. Los valores representan el promedio \pm D.E. de 4 experimentos independientes en duplicado. A) Diferencia significativa con respecto a células control* , células tratadas con Ac-PTX #. En B) se muestra un RT-PCR representativo.

En función de que no se observó diferencia alguna en la expresión de α (I) colágena a las 24 h de tratamiento, entre las células control y las células expuestas a acetaldehído por 24h, se realizó un barrido en tiempo de la expresión de α ₁(I) colágena de células expuestas a acetaldehído. En la figura 7 se muestran los resultados. Se observa que la máxima expresión de α ₁(I) colágena fue a la hora 3 con un incremento de 1.29 veces con respecto al control. A partir de esta hora la expresión disminuye, alcanzando los valores basales a la hora 9.

A



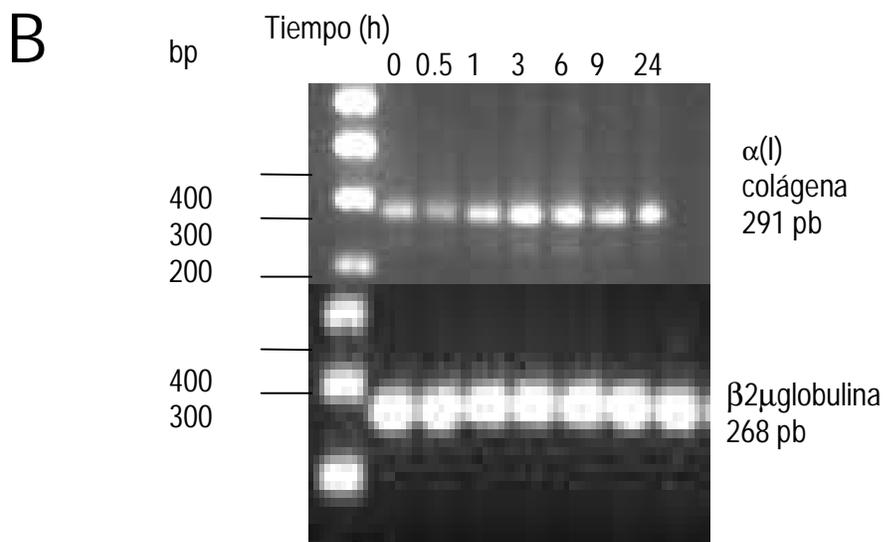


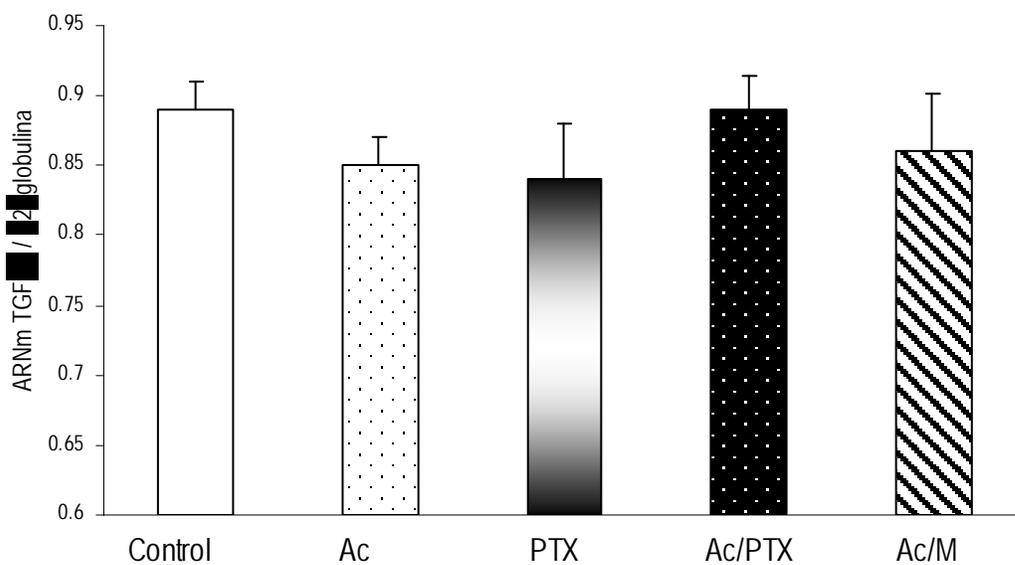
Figura 7.- Barrido en tiempo de la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena de células CFSC-2G expuestas a acetaldehído (Ac) Las células fueron sembradas y 24 h después el medio (M) fue cambiado por uno conteniendo Ac 175 μ M. la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena fue determinada a 0.5, 1, 3, 6, 9, y 24 h de exposición a acetaldehído. Los valores representan el promedio \pm D.E. de 3 experimentos independientes. A) Diferencia significativa con respecto a células control * RT PCR representativo se muestra en la figura B.

3.4.- EFECTO DE LA PENTOXIFILINA EN LA EXPRESIÓN DE TGF- β , IL-1 E IL-6

Los resultados obtenidos de las pruebas de RT-PCR de TGF- β muestran que no se encontró variación en la expresión de esta citocina, con las diferentes condiciones experimentales. Las células expuestas a acetaldehído, muestran una ligera disminución con respecto al control, sin embargo no llega a ser

significativa. Con respecto a las células expuestas a acetaldehído y posteriormente a pentoxifilina, no se registró ningún cambio (Fig. 8).

A



B

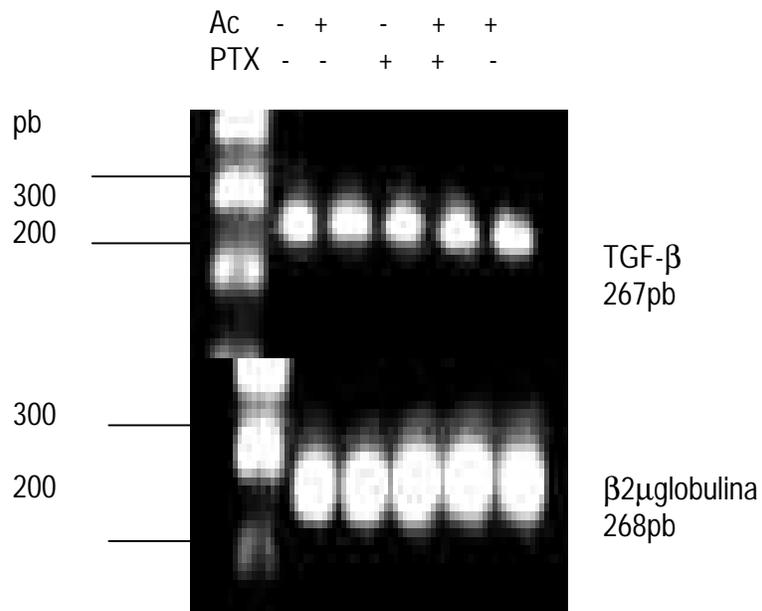
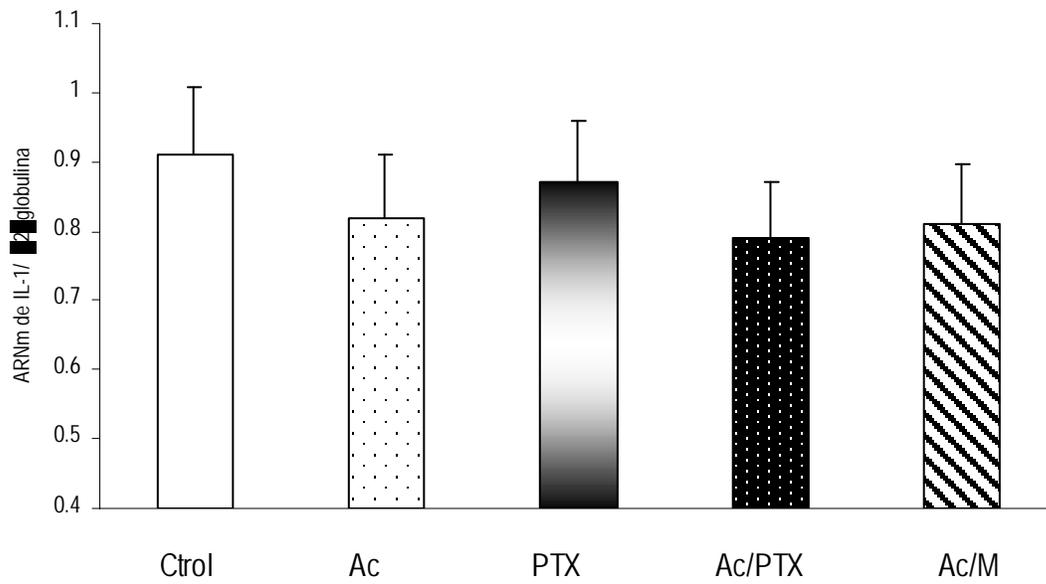


Fig. 8- Efecto de pentoxifilina (PTX) en la expresión de RNAm de TGF- β ₁ en células CFSC-2G tratadas con acetaldehído (Ac). Las células fueron sembradas y 24 h después el medio (M) fue cambiado por uno conteniendo Ac 175 μ M. La expresión de TGF- β ₁ fue determinada. En otras células tratadas con acetaldehído, el medio conteniendo Ac fue reemplazado por medio normal, o por uno conteniendo PTX 200 μ M, las células fueron incubadas por otras 24h y la expresión de mRNA TGF- β ₁ fue determinada. A) los valores representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. En la figura B se muestra un RT-PCR representativo.

Con respecto a la IL-1 β , no se registró ningún cambio en las células expuestas a acetaldehído por 24 h. En tanto que las células que fueron expuestas a acetaldehído y posteriormente a PTX, se observó una

ligera disminución, aunque ésta no llega a ser significativa. Así mismo no se observaron diferencias con respecto a las células tratadas con acetaldehído y posteriormente expuestas a medio sin suero (Fig. 9).

A



B

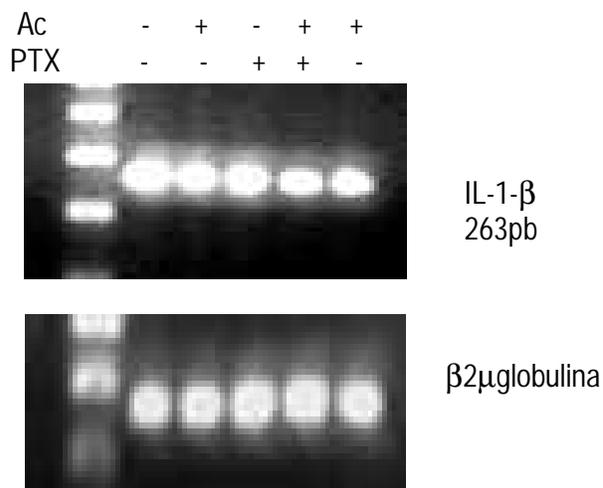
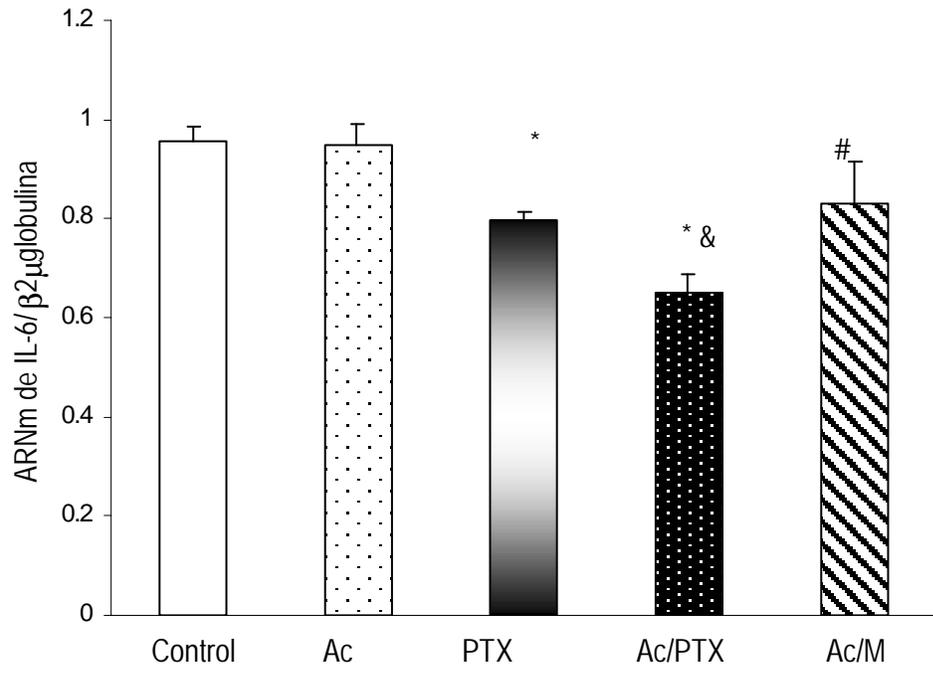


Fig. 9. - Efecto de pentoxifilina (PTX) en la expresión de RNAm de IL-1- β en células CFSC-2G tratadas con acetaldehído (Ac). Las células fueron sembradas y 24 h después el medio (M) fue cambiado por uno conteniendo Ac 175 μ M. La expresión de IL-1 fue determinada. En otras células tratadas con acetaldehído, el medio conteniendo Ac fue reemplazado por medio normal, o por uno conteniendo PTX 200 μ M, las células fueron incubadas por otras 24h y la expresión de mRNA IL-1- β fue determinada. A) los valores representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. En la figura B se muestra un RT-PCR representativo.

Con respecto a la expresión de IL-6, se observó que PTX induce una disminución del 32 % en las células que fueron tratadas con acetaldehído-PTX, en tanto que no se presentó ningún cambio con las células que fueron expuestas a acetaldehído. No fue detectada ninguna diferencia en las células que fueron expuestas a acetaldehído y después a medio normal (Fig. 10).

A



B

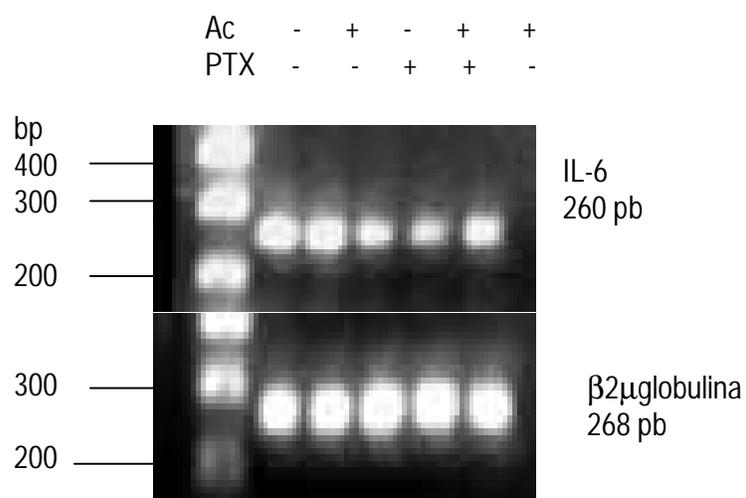
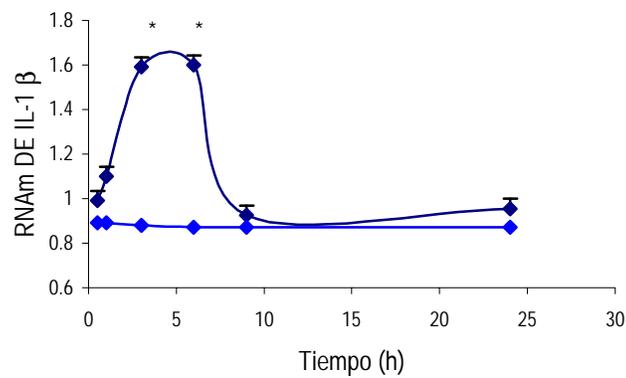


Fig. 10. - Efecto de pentoxifilina (PTX) en la expresión de RNAm de IL-6 en células CFSC-2G tratadas con acetaldehído (Ac). Las células fueron sembradas y 24 h después el medio (M) fue cambiado por uno conteniendo Ac 175 μ M. La expresión de IL-6 fue determinada. En otras células tratadas con acetaldehído, el medio conteniendo Ac fue reemplazado por medio normal, o por uno conteniendo PTX 200 μ M, las células fueron incubadas por otras 24h y la expresión de mRNA IL-6 fue determinada. A) los valores representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. En la figura B se muestra un RT-PCR representativo. Diferencia Significativa con respecto a las células control ^{*} o células tratadas con acetaldehído[#] o medio [#] ($p < 0.05$)

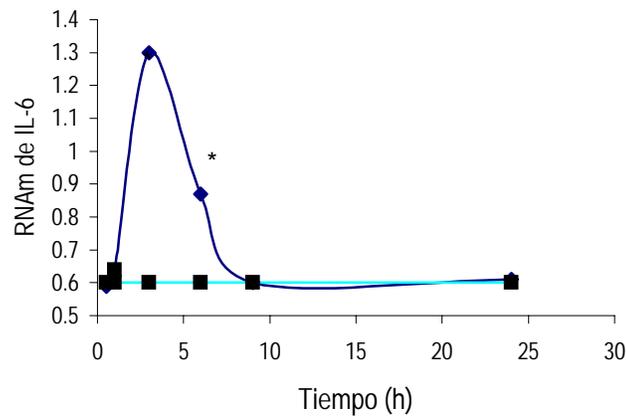
En función de que no se observó ninguna diferencia significativa a las 24h de tratamiento en la expresión de la IL-6, la IL-1- β , y el TGF- β , en las células que fueron expuestas a acetaldehído, se realizó un barrido en tiempo para detectar la expresión máxima alcanzada en células CFSC-2G estimuladas con acetaldehído (175 μ M). Los resultados obtenidos se reportan en la gráfica 11. Se observa que el acetaldehído incrementa la expresión de estas citocinas a tiempos cortos y cada citocina presenta un perfil de expresión específico. La expresión de las citocinas tuvo el siguiente

patrón: el nivel máximo de la expresión de IL-1- β tuvo lugar a la hora 3 con 1.42 veces con respecto al control, y a la hora 9 los valores regresan a los niveles parecidos de las células control. Con respecto a IL-6 se incrementa 2 veces con respecto al control a la hora 3. El máximo incremento para el TGF- β se registró a la hora 1 con 2.3 veces con respecto al control, como respuesta a la exposición a acetaldehído.

A



B



C

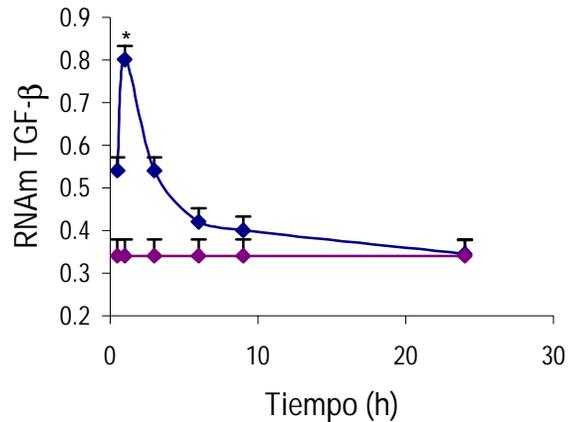


Figura 11. - Barrido en tiempo de la expresión de la expresión de la IL-1 β , la IL-6 y del TGF- β , en células CFSC-2G expuestas a acetaldehído (Ac). Las células fueron sembradas y 24 h después el medio fue cambiado por uno conteniendo Ac 175 μ M. La expresión de a 0.5, 1, 3, 6, 9, y 24 h de exposición a acetaldehído. Un control fue determinado a los mismos tiempos sin la presencia de Ac. Los valores representan el promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. Diferencia significativa con respecto a las células control *

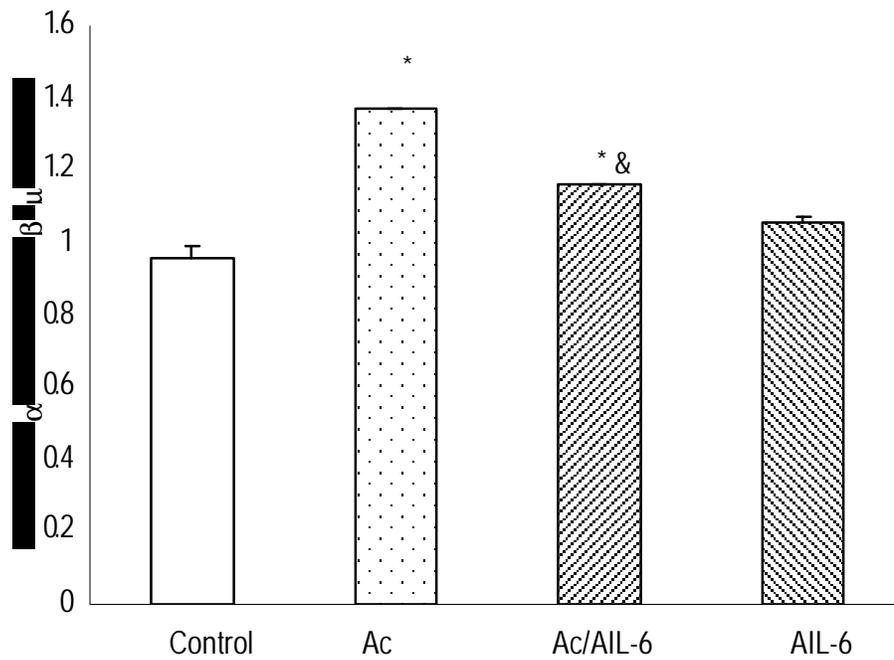
3.5.- EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI IL-6 EN LA EXPRESION DE $\alpha_1(I)$ COLAGENA

Para corroborar la participación de IL-6 en el incremento de la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena debido al tratamiento con acetaldehído, las células fueron expuestas a un anticuerpo monoclonal contra IL-6.

Las células CFSC-2G fueron tratadas con anti-IL-6 durante 15 min antes del tratamiento con acetaldehído. La expresión de $\alpha_1(I)$ colágena fue determinada 3 h después de exposición a Ac. En la Figura 12 se muestran estos resultados, las células que fueron tratadas con Ac y anticuerpo monoclonal anti IL-6 no mostraron incremento en la expresión de la $\alpha_1(I)$ colágena, en tanto que las células que

fueron tratadas con el anticuerpo, no muestran ningún efecto. Los datos obtenidos sugieren la participación de la IL-6 en el incremento de la $\alpha_1(I)$ colágena. Estos resultados fueron corroborados con un ensayo de Northern blot, y mostraron un efecto similar a la obtenida por RT-PCR (figura 13).

A



B

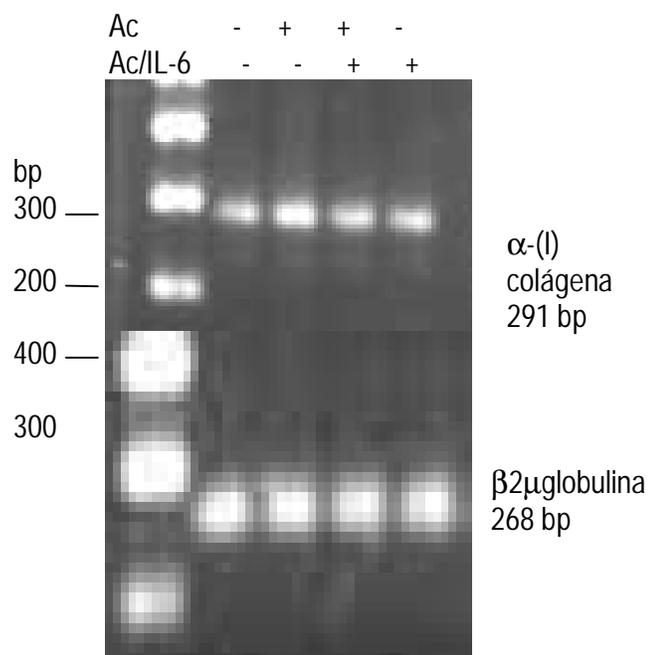
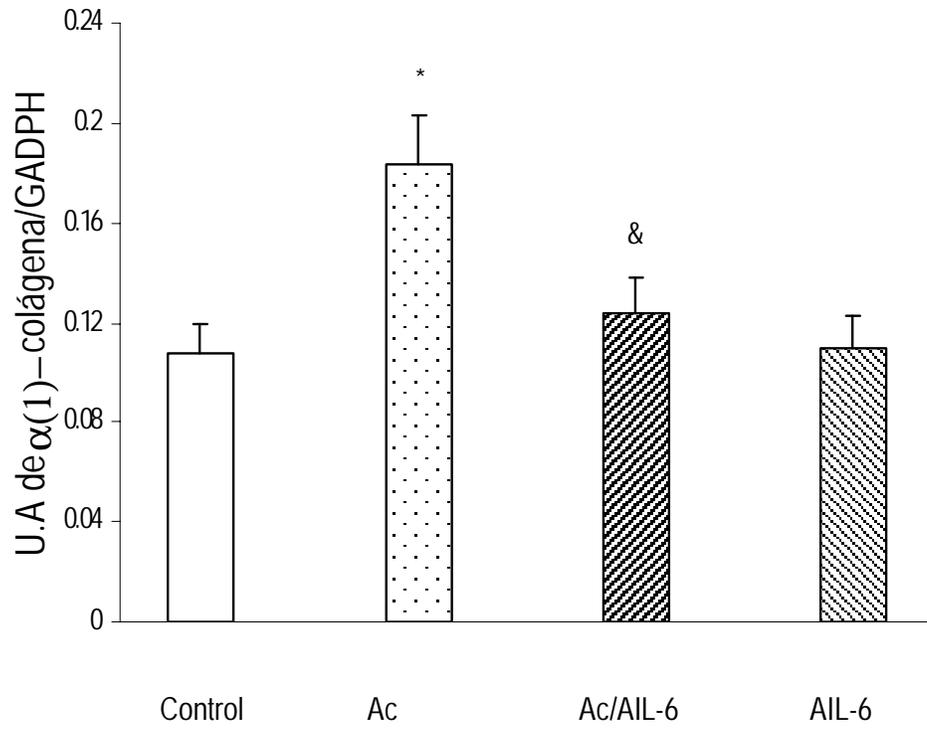


Fig. 12- Efecto del anticuerpo monoclonal anti-IL-6 en la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena mRNA de células CFSC-2G tratadas con acetaldehído (Ac). Las células fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal 15 min antes de exponer a las células a Ac (175 μ M). La expresión de $\alpha_1(I)$ colágena fue medida 3 h después del tratamiento. El anticuerpo monoclonal anti-IL-6 no produjo ningún efecto en la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena. En la gráfica A) se muestran los valores representativos \pm el promedio de la D.E. de tres experimentos independientes. Diferencia significativa con respecto al control * o células tratadas con acetaldehído & (p<0.05). Un RT-PCR representativo se muestra en la figura B.

A



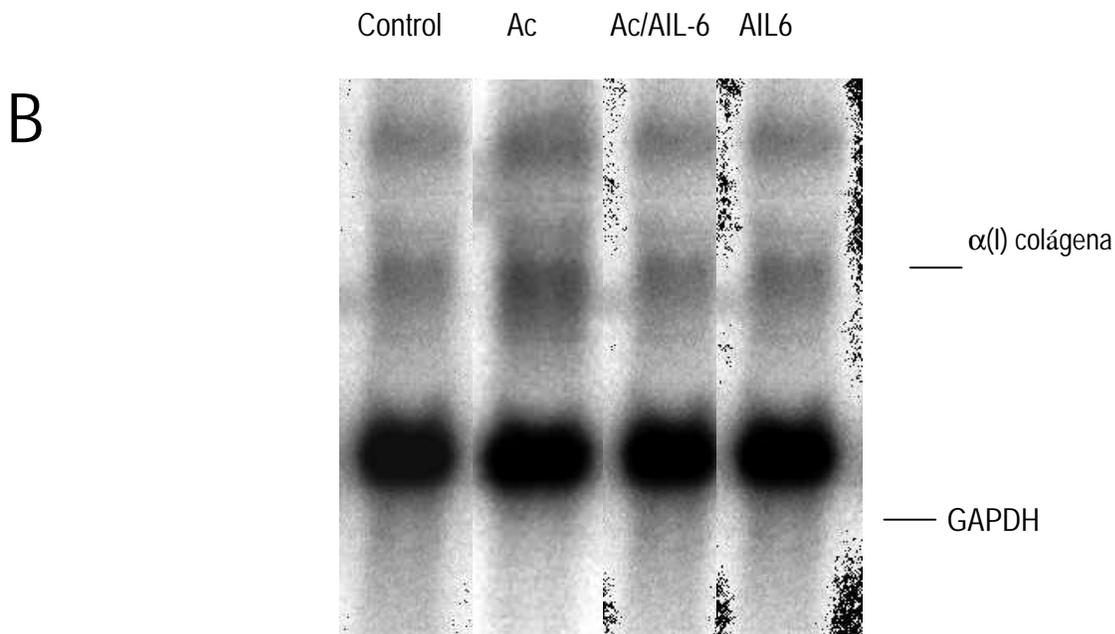


Fig. 13. - Northern Blot de el efecto del anticuerpo monoclonal anti-IL-6 en la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena mRNA de las células CFSC-2G tratadas con acetaldehído (Ac). Las células fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal 15 min antes de exponer a las células a Ac (175 μ M). La expresión de $\alpha_1(I)$ colágena fue medida 3 h después del tratamiento. El anticuerpo monoclonal anti-IL-6 monoclonal no produjo ningún efecto en la expresión de $\alpha_1(I)$ colágena. En la gráfica A) se muestran los valores representativos \pm el promedio de la DE de tres experimentos independientes. Diferencia significativa con respecto al control * o células tratadas con acetaldehído & ($p < 0.05$). Un Northern blot representativo se muestra en la figura B.

3.6.- EFECTO DE LA PENTOXIFILINA EN LA EXPRESIÓN DE α (I) COLÁGENA (3 HORAS)

Una vez que determinamos la acción fibrogénica de la IL-6, proseguimos a determinar la expresión de α (I) colágena durante tres horas, ya que a esta hora se reportó la máxima expresión de colágena en el tiempo en curso que determinamos previamente. Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo para las células tratadas con acetaldehído, las células tratadas con acetaldehído y PTX de manera simultánea se encontró una disminución significativa con respecto a las células tratadas con acetaldehído. Los resultados se muestran en la figura 14

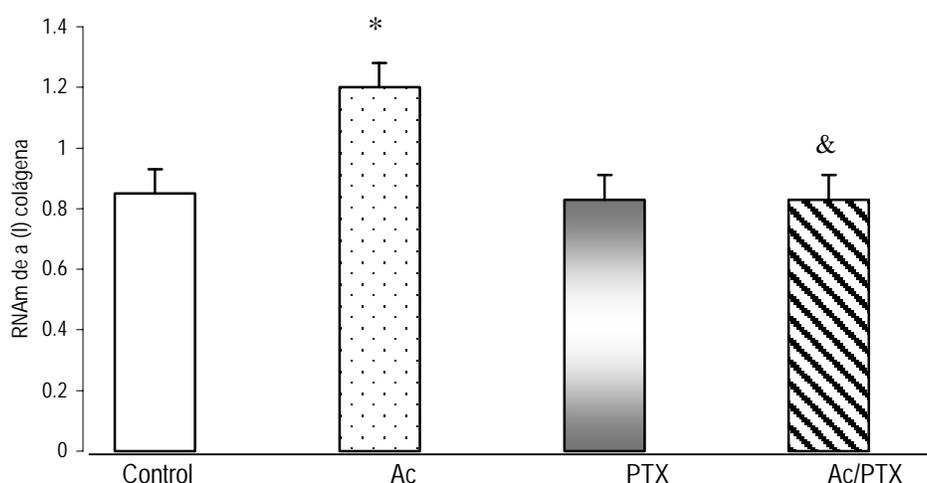


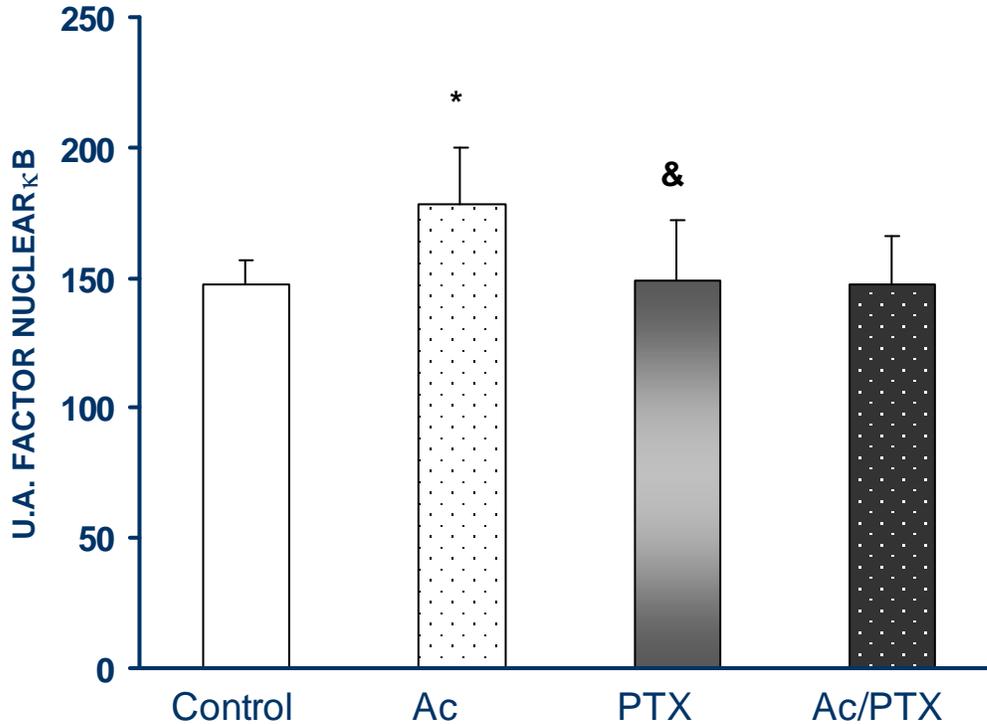
Fig 14.- Efecto de la pentoxifilina (PTX) en la expresión de α (I) colágena en células CFSC-2G tratadas con acetaldehído (Ac). Las células fueron sembradas y 24 h después el medio fue cambiado por uno conteniendo Ac (175 μ M) y PTX (200 μ M) de manera simultánea durante 3 h. Los valores representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes.

3.7.- EFECTO DE LA PENTOXIFILINA EN LA ACTIVACION DEL NF κ B

Diversos factores de transcripción están involucrados en la transcripción de la IL-6, entre ellos el factor nuclear κ B, por lo tanto consideramos importante evaluar su participación en este evento.

Los resultados obtenidos de la activación del factor nuclear, observamos que las células expuestas a Ac, se observa un incremento significativo en la activación del NF- κ B. En tanto que las células expuestas a Ac y PTX, se observa una disminución significativa en los valores del factor nuclear con respecto a las células tratadas con acetaldehído (fig 15).

A



CAPITULO 4

DISCUSIÓN

4.1- VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS CFSC-2G EN PRESENCIA DE PENTOXIFILINA

La pentoxifilina es una metilxantina. Su uso principal es destinado a trastornos vasculares. Sin embargo en los últimos años ha recibido atención en enfermedades de tipo inmunológico así como en la fibrosis hepática, debido a la capacidad de la PTX de modular la secreción y expresión de diferentes citocinas.

La concentración utilizada de este fármaco como agente reológico, en humanos es de hasta 1200 mg al día. La Food Drug Administration (FDA en Estados Unidos) considera esta concentración como una dosis relativamente segura y no se ha reportado ningún efecto adverso con esta concentración. La concentración utilizada para este trabajo fue elegida tomando en cuenta el criterio que no se disminuyera de manera significativa la viabilidad celular de modo que las funciones celulares no se vieran comprometidas. El valor que cumplía con este criterio fue el de 200 μ M. Esta concentración presentó una disminución significativa en la funcionalidad mitocondrial del 34 %, mientras que con el ensayo de azul de tripano se mantuvo una viabilidad del 100 %. La concentración elegida es similar a la dosis utilizada en enfermedades vasculares la cual no muestra efectos adversos en el paciente, con una vida media corta de 0.8-1.8h. Bianco y col (1991) reportan que incluso dosis mayores de hasta 2000 mg/día son bien toleradas. La pentoxifilina puede ser metabolizada hasta en 8 metabolitos más solubles, siendo el más importante por abundancia la hidroxipentoxifilina (HPTX), el cual puede alcanzar casi el doble de la concentración con respecto a la PTX. Algunos autores señalan que el efecto de la HPTX puede ser mayor que el de la PTX. Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que PTX sin necesidad de sufrir metabolismo puede ejercer efectos antifibrogénicos, los cuales podrían incrementarse en un modelo *in vivo* (Bianco y col 1991).

4.2.- EFECTO DEL ACETALDEHÍDO EN CÉLULAS CFSC-2G

Diversos autores consideran a las células estelares como el punto central en el proceso de la fibrosis hepática, debido a que estas células se consideran las principales productoras de proteínas de la matriz extracelular en esta patología incluyendo la α (I) colágena (Brenner y col 2000). Este evento es controlado de manera fina por diferentes citocinas, y se considera que a las células estelares como clave efectora de la respuesta fibrótica, ya que pueden actuar como la fuente principal y blanco de diferentes citocinas (Friedman 1999; Iredale 2001).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la secreción de la colágena puede ser detectada a las 24 h, en tanto que la expresión de la α (I) colágena en células CFSC-2G, estimuladas por Ac muestra un máximo incremento a la hora 3.

4.3.- EFECTO DE ACETALDEHÍDO EN LA EXPRESIÓN DE TGF- β IL-1 IL-6

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que como respuesta a la exposición a Ac, las células CFSC-2G, incrementan significativamente la expresión del TGF- β , la IL-1- β , y la IL-6. La determinación de la expresión a diferentes tiempos de las diferentes citocinas indicó que cada una de estas presenta un perfil específico, y que esta expresión es a tiempos cortos.

Es bien conocida la acción fibrogénica del TGF- β en células estelares, esta citocina se ubica dentro de la categoría de citocinas fibrogénicas, de tal manera que el incremento en la inducción de esta citocina, puede estar involucrado con la inducción de la colágena. Diversos autores consideran que existe una correlación entre la expresión de esta citocina y la fibrosis hepática (Tiggelman y col 1997, Bleser, y col 1997, Matsuoka y col 1988).

García Trevijano y col (1999), indican a esta citocina como reguladora de la expresión de la colágena en un mecanismo dependiente de peróxido de hidrógeno. El TGF- β es considerado también una citocina involucrada en el proceso de la activación de las células estelares (Tsukamoto y Lin 1995, Hellenbrand y col 1999, Dooley y col 2000)

4.4.- ACCION FIBROGENICA DE IL-6

Aún cuando se considera al Ac como un agente fibrogénico *per se*, numerosos mecanismos están involucrados en la alteración de la matriz extracelular, como resultado de una exposición a Ac. Entre estos mecanismos podemos mencionar el estrés oxidativo y la inducción de diversas citocinas con acción pro-fibrogénica entre las que se encuentran: el TGF, y la IL-6.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la acción fibrogénica del acetaldehído, en un mecanismo mediado por la IL-6, como se comprobó con los anticuerpos dirigidos contra la IL-6. Es importante considerar que la IL-6 puede no ser el único factor involucrado en el incremento de la expresión de la colágena, dado que como se observa en la gráfica 12, los valores de la expresión de colágena, no llegan a disminuir a los valores de las células control, esto hace presumir que en el modelo experimental utilizado, además de la IL-6 pueden estar involucrado otros agentes fibrogénicos.

Diversos reportes indican a la IL-6 junto con el TNF- α , y la IL-1- β como las principales citocinas que se secretan en un proceso inflamatorio (Heinrich 1990). Sin embargo la acción pro-fibrogénica de la IL-6 es poco documentada. Los datos obtenidos en el presente trabajo coinciden con los obtenidos por Grenwell (1995).

La expresión de la IL-1- β se incrementó como respuesta a la exposición a acetaldehído. Esta citocina es considerada como una citocina de fase aguda. Bajo las condiciones utilizadas en el presente trabajo

la IL-1- β , y la TGF- β , no parecen estar directamente relacionadas con el incremento de la colágena. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son una aportación a los ya publicados por diferentes autores con respecto a los beneficios de pentoxifilina en el campo de fibrosis hepática. La modulación de pentoxifilina sobre TNF- α era ya conocida, en tanto la participación de IL-6 no había sido abordada desde el punto de vista de una acción fibrogénica. Finalmente los resultados obtenidos permiten concluir que la pentoxifilina ejerce un efecto antifibrogénico, mediante la modulación de la IL-6, en las células estelares hepáticas en cultivo estimuladas con Ac.

4.5.- EFECTO DE PTX EN LA SECRECIÓN Y EXPRESIÓN DE COLÁGENA EN CÉLULAS CFSC-2G TRATADAS CON ACETALDEHÍDO

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que pentoxifilina 200 μ M disminuye la secreción y la expresión de la α (I) colágena en células CFSC-2G, tratadas con acetaldehído (175 μ M). La secreción de la colágena disminuyó hasta valores basales. Este resultado fue obtenido 24 h después de exponer las células con acetaldehído, y después de tratarlas durante 24 h con la PTX. Diversos reportes indican que la PTX disminuye la secreción de colágena. Romanelli y col (1997) reportan que la PTX provocó una disminución significativa en la secreción de colágena de manera dosis dependiente. Un resultado similar es reportado por Preaux y col (1997) en donde reportan una disminución en la secreción de la colágena en miofibroblastos tratados con la PTX.

Con respecto a la expresión de la colágena los resultados obtenidos indican que la PTX disminuye de manera significativa esta proteína. Diversos autores reportan el efecto antifibrogénico de PTX. Isbrucker y Peterson (1998) reportan que en la inducción de fibrosis hepática en puercos, mediante un compuesto denominado fósforo amarillo, la PTX disminuyó de manera significativa la expresión de α 1 (I) y α 1 (III)

colágena, en un mecanismo en donde está involucrado el PDGF. Raetsch y col (2002) reportan que la PTX disminuye de manera significativa la expresión y la secreción de la colágena, por medio de la regulación negativa del TGF- β 1 y del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) en un modelo animal en donde indujeron fibrosis por la ligadura del conducto biliar. Preaux y col (1997) reportan que en células estelares hepáticas humanas la PTX actúa como un potente agente antifibrótico, ya que disminuye de manera significativa la expresión de α 1 (I) y α 1 (III) colágena.

El efecto benéfico de la PTX reportado sobre la fibrosis hepática ha sido considerada desde diferentes puntos de vista: como agente antiinflamatorio, como agente antimitogénico, bloqueando la activación de células estelares, como agente antioxidante entre otros. La mayoría de estas acciones se llevan a cabo por la modulación de diferentes citocinas. Los trabajos más relevantes han comprobado que la PTX regula de manera negativa la expresión y secreción del TNF- α . Diversos reportes indican que la PTX ejerce su efecto antifibrogénico y antiinflamatorio disminuyendo la expresión del TNF- α (Semmler y col 1993, Refsum y col 1996, Navarro y col 1996; Eigler y col 1997; Windmeir y Gressner 1997, Sampaio y col 1997, Entzian y col 1998).

El estímulo en las células estelares hepáticas por acetaldehído desencadena una cascada de sucesos en los que participan una amplia red de citocinas. Estas citocinas inician una serie de eventos en el proceso fibrogénico. En este proceso el TNF- α participa de una manera importante, sin embargo es difícil considerar que sea la única citocina involucrada. Por lo que las diferentes acciones benéficas reportadas para la PTX, no deben de considerarse como una modulación exclusiva sobre el TNF- α . Sino más bien estas respuestas son el resultado de la suma de la acción de los múltiples factores que participan en la fibrosis hepática, en donde el TNF- α es sólo un factor de los muchos que participan en este complejo evento.

Dado que en la fibrosis hepática participa una amplia red de citocinas, y no únicamente el TNF- α , consideramos importante entonces, estudiar el efecto de otras citocinas que tienen un papel relevante en el desarrollo de la fibrosis hepática, como el TGF- β , la IL-6, y la IL-1- β .

4.6.- EFECTO DE PTX SOBRE CITOCINAS PRO-FIBROGENICAS :TGF- β e IL-6

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la PTX actúa como un agente antifibrogénico, ya que disminuye de manera significativa la secreción y la expresión de la α (I) colágena. Para conocer cómo está mediada la disminución de esta proteína, determinamos la expresión del TGF- β , la IL-6, y la IL-1- β en las células CFSC-2G expuestas a acetaldehído y tratadas con PTX.

El TGF- β , es una citocina pro-fibrogénica, existen diversos reportes sobre el efecto benéfico de la pentoxifilina en la fibrosis hepática, en donde este fármaco ejerce una regulación negativa sobre la expresión del TGF- β .

Sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo, no muestran cambio significativo alguno en la expresión de TGF- β en células CFSC-2G, pretratadas con Ac y posteriormente con PTX. Entzian y col (1997) reportan que la PTX a una concentración de 50 y 100 μ g/ml, disminuye la síntesis de colágena y los efectos de la fibrosis en fibroblastos de la pleura en pulmón humano. Este efecto antifibrogénico se explica mediante la disminución en la expresión del TGF- β . Aún cuando se ha reportado que el proceso de fibrosis es muy similar en diferentes órganos, la acción de la PTX en este modelo pleural tuvo resultados positivos con respecto al TGF- β . Mientras que los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la disminución observada de colágena, no es mediada a través del TGF- β .

Raetsch y col (2002) reportan que la PTX modula las citocinas fibrogénicas: el TGF- β y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) de manera negativa: en un modelo de rata en donde se indujo fibrosis secundaria por ligadura del conducto biliar. Los resultados obtenidos por los autores indican, que la pentoxifilina ejerce un efecto antifibrogénico, mediante la modulación de estas dos citocinas. Romanelli y col (1997) indican que en células estelares humanas, estimuladas con el TGF- β , la PTX ejerce un efecto antifibrótico. Los datos que reportan son una disminución significativa de la expresión del TGF- β , vía la PTX, aunque paralelo con este efecto la PTX provoca la disminución de la expresión del TIMP-1, los autores concluyen que en células estelares humanas la PTX ejerce un efecto antifibrogénico, sin embargo este efecto es mediado, por la degradación extracelular de colágena, más que por un efecto en la reducción de la síntesis de colágena (Romanelli y col 1997).

4.7.- ACCION ANTIFIBROGÉNICA DE PTX VÍA LA REGULACIÓN NEGATIVA DE IL-6

Las células tratadas con acetaldehído y pentoxifilina disminuyeron de manera significativa la expresión de la IL-6 en células CFSC-2G. Lotz y Guerne (1991) reportan a la IL-6 como una citocina profibrogénica y diversos autores ubican a la IL-6 como una citocina capaz de modular la expresión de colágena (Cassini y col 1991, Greenwel y col 1993, Pares y col 1994; Toda y col 2000). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la PTX regula de manera negativa la expresión de IL-6, por otra parte se comprobó la participación de IL-6 en el incremento de α (I) colágena, así los datos obtenidos concuerdan con los previamente reportados por los autores mencionados.

La acción antifibrogénica que se observó con el tratamiento de la PTX es atribuida en este modelo por la modulación de la IL-6. Esta modulación puede ser de una forma directa o indirecta. De manera directa implica que la PTX regule de manera negativa la expresión de la IL-6. El término indirecto se

refiere a que la PTX regule a una citocina, o factor de crecimiento, y que como resultado de ello se produzca la disminución de la expresión de la IL-6.

La IL-6 es una citocina con acción pleitrópica, de tal manera que esto puede implicar que puede haber más de una posibilidad para explicar la regulación negativa de PTX sobre la IL-6.

La acción que la PTX ejerce modulando el TNF- α es ampliamente conocida (Sampaio y col 1998, Shirin y col 1998, Entzian y col 1998). El TNF- α , junto con la IL-6, se consideran las principales citocinas que se producen durante un estímulo agudo, y son las responsables de muchas de las manifestaciones de la respuesta de fase aguda, incluyendo la producción de proteínas de fase aguda y la expresión de α (I) colágena por células estelares hepáticas (Gabay 1999).

Las alquilxantinas, incluyendo a la PTX son consideradas como inhibidores potentes de la producción de citocinas proinflamatorias especialmente el TNF- α (Han 1990, Mandel 1995), esto es explicado por el mecanismo de acción de la PTX: inhibiendo fosfodiesterasas, lo cual lleva a un incremento intracelular de los niveles de AMPc (Wodermann y col 1998, Pinzani y col 1998, Papadakis y col 2000).

Por otra parte la inflamación es el principal efecto fisiológico inducido por el TNF- α , y puede a su vez inducir citocinas proinflamatorias, entre ellas la IL-6. La pentoxifilina puede reducir la producción del TNF- α , y en consecuencia de la IL-6.

Natsume y col (1999) reportan que ratones deficientes en IL-6 tratados con CCl₄, presentaron un menor grado de fibrosis, comparados contra los ratones control.

Por otra parte, la PTX es también considerada como un agente antiinflamatorio (Refsum 1996; Sampaio y col 1988; Entzian y col 1998; Entzian y col 1998). Esta acción la produce modulando algunas citocinas, entre ellas IL-10 e IL-4. Estas son consideradas como las citocinas más importantes con propiedades anti-inflamatorias. La IL-10 ha recibido atención considerable debido a que es una citocina

anti-inflamatoria potente, en células estelares hepáticas. Diversos reportes indican que la IL-10 puede modular la fibrosis hepática *in vivo* así como *in vitro* (Moore y col 1993; Van Hogezaand y col 1997 Thompson y col 1998; Tsakamoto 1999).

Van Hogezaand (1997) reportó que la IL-10 regula de manera negativa la inflamación inhibiendo la producción de TNF- α , en macrófagos.

No resultaría difícil pensar que la PTX podría estar involucrada en la modulación de estas citocinas. Fuschimi y col (1998) demostró que la PTX incrementa de manera significativa la producción de la IL-4 y de la IL-10 en modelos animales. Más aún Donnelly y col (1993) reportaron que la producción de la IL-6 es inhibida por la IL-10 y la IL-4 (HOWARD Y COL 1992). En este sentido la disminución significativa de la IL-6, por la PTX, podría también regular de manera positiva el incremento de la IL-4 y la IL-10. Resultaría interesante medir la producción de estas citocinas, en nuestro modelo celular.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que la PTX disminuye la expresión de α (I) colágena, en un mecanismo mediado por la IL-6. Se ha reportado que la IL-6 disminuye la expresión de proteína cinasa c (PKC) en hígados de rata y de ratones (Hill y col 1991, Hill y McCallum 1992) y diversos reportes indican que la modulación de colágena esta mediada por PKC.

4.8.- EFECTO DE PENTOXIFILINA EN LA EXPRESIÓN DE IL-1- β

Los datos obtenidos en el presente trabajo en células CFSC-2G, estimuladas con Ac y PTX no mostraron diferencia significativa alguna con respecto a la expresión de IL-1 β . De tal manera que la disminución significativa de la α (I) colágena observada en este proyecto no es dirigida por la IL1 β . Sin embargo, existen reportes en donde la PTX modula a la IL-1 β : Voisin y col (1998), reportan que la PTX es capaz de disminuir la secreción de la IL-1 β , en un modelo animal, en donde las ratas fueron

estimuladas con *Escherichia coli*. Este efecto se lleva a cabo mediante la acción antiinflamatoria que ejerce PTX. Lefebvre y col (1996) reportan que la PTX modula la secreción de la IL-1 β de una manera dosis dependiente. Bajo las condiciones que nosotros utilizamos en este trabajo, no encontramos respuesta por la PTX, sin embargo cabe la posibilidad de que el efecto sea a tiempos más cortos. Resultaría interesante analizar el efecto de la PTX sobre la IL-1 β en un curso temporal.

4.9.- EFECTO DE LA PENTOXIFILINA EN EL FACTOR NUCLEAR κ B

Como resultado de exponer a las células estelares a acetaldehído encontramos un incremento significativo en la activación del factor nuclear κ B (NF κ B), diversos reportes indican que el Ac puede producir la translocación de este factor al núcleo.

Los resultados obtenidos indican que la PTX bloquea la activación del NF κ B según los datos obtenidos por la técnica de EMSA, y sugieren que la PTX bloquea la activación de NF κ B, y de manera consecuente detiene el incremento de la expresión de IL-6, lo que ocasiona la disminución de la expresión de α (I) colágena. Un modelo esquemático propuesto se indica en la fig 16. Se ha reportado que el mecanismo de acción de la pentoxifilina es debido a la inhibición de fosfodiesterasas, lo cual provoca el incremento del AMPc, esto conduce a una mayor actividad de cinasas, como la PKC y PKA las cuales fosforilan a diversas proteínas blanco. Esta respuesta conduce al decremento en la expresión y efectos del TNF- α (Friedman 2003).

El mecanismo de acción que nosotros proponemos mediante el bloqueo del NF κ B, es complementario al ya reportado. Dejando abierta la posibilidad de la existencia de otros mecanismos de acción de la PTX.

Chojkier y col (1997) reportan que la PTX previene los efectos de la fibrosis hepática bloqueando la activación de las células estelares de una manera independiente a la inhibición de fosfodiesterasas , interfiriendo con la activación del NFκB.

Tanto el TNF-α, como la IL-6 presentan un sitio promotor de reconocimiento a diferentes factores de transcripción entre ellos al NFκB. (Akira 1990, Matsuaka y col 1993, Papadakis y Targan 2000). Como ya se ha indicado, la PTX controla diferentes aspectos de la fibrosis hepática, mediante la modulación de TNF-α. Los resultados obtenidos en el presente trabajo complementan los ya reportados de la PTX, indicando un efecto antifibrogénico debido a la modulación de la IL-6, estos datos nos sugieren que esta modulación es mediante el bloqueo del NF-κB. Vanden y col (1999) reportan un efecto semejante, en donde se reprime la expresión de la IL-6 en un mecanismo mediado por el NF-κB, pero en este caso el agente utilizado es un glucocorticoide.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los reportados por Ichiyama y col (2001) los autores utilizan un análogo muy parecido a la pentoxifilina: la teofilina. Los autores estimulan células pulmonares con TNF- α, los resultados que los autores encuentran son que la teofilina suprime la expresión de citocinas proinflamatorias: el TNF- α, y la IL-6, en un mecanismo mediado por el bloqueo del NFκ B, resultado de la acción de la teofilina.

Finalmente, los datos obtenidos en el presente trabajo confirman a la pentoxifilina como un fármaco con propiedades antifibrogénicas, sin embargo son importantes estudios en humanos

4.10 PERSPECTIVAS

En la última década se documentó el efecto benéfico de la pentoxifilina en la fibrosis hepática, esta acción debida principalmente mediante la modulación del TNF-α. Los resultados obtenidos en el

presente trabajo contribuyen a definir el mecanismo de acción de la PTX, mediante la modulación de la IL-6. Estos datos ubican a este fármaco como un prometedor agente antifibrogénico en la fibrosis hepática. Además la concentración utilizada en el presente trabajo es semejante con la dosis terapéutica utilizada en problemas vasculares, en donde este valor se considera

Sin embargo es necesario analizar la relación que guarda la IL-6 con otras citocinas y proteínas, ya que en la cascada de respuesta generada por un estímulo no sólo participa la IL-6, sino una amplia red de citocinas y agentes que interaccionan en manera conjunta. Definir la relación que guardan otras citocinas con IL-6 y pentoxifilina, ayudará a clarificar el completo mecanismo de la PTX, y también a ampliar el conocimiento de la fibrosis hepática. Dentro de estos puntos a considerar del efecto de la PTX son:

- El efecto de la PTX en la inducción de metaloproteinasas.
- La participación de la PTX en la expresión de TIMPs Lotz y Guerne (1991) reportan que la IL-6 sobregula la expresión de TIMPs en fibroblastos..
- El efecto de la PTX en la expresión de citocinas antiinflamatorias como la IL-4 y de la IL-10
- La relación entre el TNF- α y la IL-6
- El efecto de PTX en PKC y su relación con α (I) colágena

BIBLIOGRAFIA

Akira S., Hirano T, Taga T., Kishimoto T (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF- α). *FASEB*; 4: 2860-2867.

Berman B., Wietzerhin J., Sanceau J., Merlin G., Duncan M (1992). Pentoxifylline inhibits certain constitutive and tumor necrosis factor α or induced activities of human normal dermal fibroblasts. *J Invest Derma* 98: 706-712.

Bianco J., Aplebaum F., Nemunairis J., Almgreen J., Andrews F., Ketner P., Shields A., and Singer J (1991) Phase I II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant related toxicities following bone marrow transplantation. *Blood* 78 1205-1211.

Biswas., D.K., Ahlers, C.M., Dezube, B.J., and Pardee, A.B (1994). Pentoxifylline and other protein kinase C inhibitors down-regulate HIV-LTR NF- κ B induced gene expression. *Mol. Med.* 1: 31-43.

Blese P., Niki T., Rogiers V., Geerts A (1997). Transforming growth factor β gene expression in normal and fibrotic rat liver. *Journal of Hepatology.* 26: 886-893.

Bradford, B., Misra U., Thurman R (1993). Kupffer cells are required for the swift increase in alcohol metabolism. *Res Commun. Subst. Abuse.* 14 1-6.

Brenner D., and Chojkier (1987). Acetaldehyde increases collagen gene transcription in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem* 262 17690-17695.

Brenner D., Waterboer T., Choi S., Lindquist J., Stefanovic B., Burchardt E., Yamauchi M., Gillan A, Rippe R (2000). New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 32 (1) 32-38.

Briton R., Bacon B (1999). Intracellular signaling pathways in stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res* 23 (5) 922-5.

Casini A., Galli G., Salzano R., Raptka C., and Sorrenti C (1993). Acetaldehyde protein adducts, but not lactate and pyruvate, stimulate gene transcription of collagen and fibronectin in hepatic fat storing cells. *J Hepatol* .19: 385-392.

Cassini A., Cunningham M., Rojkind M., Lieber C (1991). Acetaldehyde increases procollagen type I and fibroectin gene transcription in cultured rat fat storing cells through a protein synthesis dependent mechanism. *Hepatology* 13 758-765.

Chen A., Davis B (2000). The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde induced jun N terminal kinase dependent α I(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Molecular and Cellular Biology* 20 (8) 2828-2826.

Chommczynski P., and Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Clemens D., Halgard M., Miles R., Sorrel M., Tuma D (1995). Establishment of a recombinant hepatic cell line stably expressing alcohol dehydrogenase. *Archives of Biochemistry* 32 (2) 311-318.

Denizot F., Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival (1986). Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 89:271-277.

Desmouliere A., Xu G., Costa A., Yousef I., Gabbiani G., Tuchweber B (1999). Effect of pentoxifylline on early proliferation and phenotypic modulation of fibrogenic cells in two rat models of liver fibrosis and on cultured hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 30: 621-631.

Diehl A (2000). Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev.* 174: 160-171.

Donnelly R., Crofford, L.J., Freeman, S.L. (1993). Tissue-specific regulation of IL-6 production by IL-4. *J. Immunol.* 151: 5603-5612.

Dooley S., Delvoux B., Lahme B., Mangasser-Stephan K., Gressner (2000). Modulation of transforming Growth Factor β response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 31. 1094-1106.

Eigler A., Sinha B., Hartmann G., Endres S (1997). Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today.* 18: 487-492.

Eng F., Friedman S (2000). Fibrogenesis I New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol.* 279: G7-G11.

Entzian P. (1997). Pentoxifylline inhibits the fibrogenic activity of pleural effusions and transforming growth factor- β . *Mediators of inflammation* 6 119-126.

Entzian P., Bitter-Suermann, S., Burdon, D., Ernst, M, Schlaak M, Zabel P (1998). Differences in the anti-inflammatory effects of theophylline and pentoxifylline: important for the development of asthma therapy. *Allergy.* 53: 749-754.

Flisiak R (1997). Role of Ito cells in the liver function. *Pol J Pathol* 48 (3) 139-145.

Fontana L., Jerez D., Rojas-Valencia L., Solís Herruzo J., Greenwel P., Rojkind M. (1997). Ethanol induces the expression of $\alpha 1$ (I) procollagen mRNA in a co-culture system containing a liver stellate cell line and freshly isolated hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 61 674 1-10.

French S (2000). Mechanisms of alcoholic liver injury. *Can J Gastroenterol* 14 4: 327-332.

Friedman S a(1999). Stellate cell activation in alcoholic fibrosis- An overview. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. 23: 904-910.

Friedman SL.b. (1999). Cytokines and fibrogenesis. *Seminar Liver Dis*.19 (2) 129-140.

Friedman S (2003) Liver fibrosis from bench to bedside. *Journal of Hepatology* 38 s38-s53.

Gantner F., Kusters S., Wendel A., Hatzelmann A., Schudt C., Tiegs G (1997) Protection from T Cell Mediated murine liver failure by phosphodiesterase inhibitors. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*. 280 1 53-60.

García –Trevijano E., Iraburu M., Fontana L., Dominguez-Rosales J., Auster A., Covarruias-Pinedo A. Rojkind M (1999). Transforming growth factor beta 1 induces the expresión of alfa 1 procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP beta dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 29 3: 960-970.

Geerts A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminar Liver Dis* 21 (3) 311-315.

Ghosh A (2002). Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis . *Exp Biol Med* 227 (5) 301-314.

Gillis S., Nagy L (1997). Deposition of cellular fibronectin increases before stellate activation in rat liver during ethanol feeding. *Alcohol clin exp* 21 857-61.

Greenwel P., Schwartz M., Rosas M., Peyrol S., Grimaud J., Rojkind M (1991). Characterization of fat storing cell lines derived from normal and CCl₄ cirrhotic livers. *Laboratory Investigation* 65 (6) 644-653.

Greenwel P., Rubin J., Schwartz M., Hertzberg E., Rojkind M (1993). Liver fat storing cells clones obtained from a CCl₄ cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracelular matrix components, interleukin-6 and connexin 43. *Lab Invest*. 69: 210-216.

Greenwel P., Iraburu M., Reyes-Romero M., Meraz-Cruz N., Casado E., Soliz Herruzo J., Rojkind M (1995). Induction of an acute phase response in rats stimulates the expression of alpha 1(I) procollagen messenger ribonucleic acid in their libraries. Possible role of interleukin-6. *Lab Invest* 72(I) 83-91.

Greenwel P., Tanaka S., Penkov D., Zhang W., Olive M., Moll J., Vinson C., Liberto M., Ramirez F (2000). TNF- α inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/ enhancer binding proteins. *Mol Cell Biol* 20 (3) 912-8.

Gressner A., and Althaus M (1988). Effects of ethanol, acetaldehyde, and lactate on proteoglycan synthesis and proliferation of cultured rat liver fat storing cells. *Gastroenterology* 94, 797-807.

Gressner A., Mannherz H. (1994). Myofibroblast induce TGF beta mediated apoptosis of hepatocytes which increases their mitogenic potential for fat storing cells. *Hepatology* 20 291-297.

Gressner A., Bachem M (1995). Molecular Mechanism of liver fibrogenesis a homage to the role of activated fat storing cells. *Digestion*. 56: 335-346.

Gressner, A (1995). Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *Journal of Hepatology* 22: 28-36.

Gressner A (1996). Transdiferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney International* 49 (54) 39-45.

Grignani G., Maiolo A. (2000). Cytokines and hemostasis. *Haematologica*. 85: 965-972.

Han J., Thompson P., and Beutler B (1990). Dexamethasone and pentoxifylline Inhibit endotoxin-induced cachectin tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J. Exp. Med.* 172: 391-394.

Hautekeete M., Geerts A (1997). Hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch* 430:195-207.

Heinrich P., Castell J., Andus T (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* . 265: 621-636.

Hernández I., Torre P., Rey Campos J., García I., Sánchez JA., Muñoz R., Rippe RA., Muñoz T., Solis Herruzo JA. (2000). Collagen α 1(I) gene contains an element responsive to TNF- α located in the 5' untranslated region of its first exon. *DNA Cell Biol* 19 (6) 341-52.

Hill M., McCallum R (1991). Altered transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following endotoxin treatment. *J Clin Invest* 88: 811-816.

Hill M., McCallum R (1992). Identification of tumor necrosis factor as a transcriptional regulator of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene following endotoxin treatment of mice. *Infect Immun.* 60: 4040-4050.

Hines J., Johnson S., Burt A (1993). In vivo responses of macrophages and perisinusoidal cells to cholestatic liver injury. *Am J Pathol* 142: 511-518.

Hinze J., Grigoleit H., Rethy B (1976). Bioavailability and pharmacokinetics of pentoxifylline from a 400 mg tablet in man. *Pharmazie* 31: 160-171.

Howard and O'Garra A (1992). Biological properties of interleukin 10. *Immunol-Today*. 13, 198-200.

Ichiyama T., Hasegawa S., Matsubara T., Hayashi T., Furukawa S (2001). Theophylline inhibits NF kappa B activation and I kappa B alpha degradation in human pulmonary epithelial cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364 (6) 558-61.

Iraburo MJ., Dominguez-Rosales JA., Fontana L., Auster A., García Trevijano E., Covarrubias P., Rivas E., Greenwel P., Rojkind M (2000). Tumor necrosis factor α down regulates expresión of the α (I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p 20C/EPB β and C/EPB dependent mechanism. *Hepatology* 31 1086-1093.

Iredale J (2001) Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver.* 21 (3) 427-436.

Iredale J., Benyion R., Pickering (1998). Mechanism of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. clin. Invest* 102 538-549.

Isbrucker R., Peterson T (1988). Platelet-derived growth factor and pentoxifylline modulation of collagen synthesis in myofibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol.*149:120-126.

Jarvelainen H., Fang C., Ingelman-Sundberg M., Lindros K (1999). Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Hepatology* 29: 1503-1510.

Kamimura S and Hidekazu T (1995). Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology.* 21: 1304-1309.

Kawada N., Seki S., Inoe M., Kuroki T (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27 1265-1274.

Kouba D., Chung K., Nishiyama T., Vindevoghel L., Kon A Klement JF., Uitto J., Mauviel A (1999). A nuclear factor κ B mediates TNF- α inhibitory effects on α 2 (I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. *J Immunol* 162 4226-4234.

Lee K., Cottam H., Houghlum K., Wasson B., Carson D., Cholkier M (1997). Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. *Am J. Physiol.* 273:G1094-G1100.

Lefevre C., Diaw L., Cornillet P., Guenounou M (1996). Differential regulation of TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, TNF- β and IL-10 by pentoxifylline. *Int J Immunopharmacol.* 18 (12): 739-748.

Lotz M. and Guerne P (1991). Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J. Biol. Chem.* 266: 2017-2020.

Mandell G (1995). Cytokines, phagocytes, and pentoxifylline. *Journal of cardiovascular pharmacology* 25 20-22.

Manzini R., Bennedetti A., Jezequel A (1994). An interleukin-1 receptor antagonist decreases fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rat liver. *Virchows Arch* 424 25-31.

Matsouka M., Pham N., Tsakamoto H (1989) Differential effects of interleukin-1 α tumor necrosis - α and transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells. *Liver* 9 71-78.

Matsuoka M., Tsukamoto H (1990). Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by kuppfer cell derived transforming growth factor β : implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology*. 11: 5999-605.

Matsuoka T., Fujikawa K., Nishio Y., Mukaida N., Matsushima K., Kishimoto T (1993). Transcription factors NF-IL-6 and NF κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8 *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10193-10197.

Moore K., O Gaara A de Waal Malefyt., Viera P., Mosman T (1993). Interleukin 10. *Annu Rev Immunol*. 11: 165-90.

Natsume M., Tsuji H., Harada A., Akiyama M., Yano T., Ishikura H., Nakanishi I., Matsushima K., Kaneko S., Mukaida N (1999). Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6 deficient mice. *J Leukoc Biol*. 66 (4): 601-608.

Navarro J., Punzón M., Pizarro A., Fernández-Cruz E., Fresno M., Muñoz-Fernández, M (1996). Pentoxifylline inhibits acute HIV-1 replication in human T cells by a mechanism not involving inhibition of tumor necrosis factor synthesis or nuclear factor- κ B activation. *AIDS*. 10: 469-475.

Nieto N., Friedman S., Greenwel P., Cederbaum A (1996). CYP2E1 mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 30 (4): 987-996.

Nieto N., Domínguez R., Fontana L., Salazar A., Armendáriz-Borunda J., Greenwel P., Rojkind M (2001). Rat Hepatic stellate cells contribute the acute phase response with increased expresión of α 1(I) and α 1(IV) collagens tissue inhibitor of metalloproteínase-1 and matrix metralloproteinase-2 messenger RNAs. *Hepatology* 33:597-607.

Nikki T., Shuppan D., de Bleser P (1996). Dexamethasone alters messenger RNA levels but not synthesis of collagens, fibronectins, or laminin by cultured rat fat storing cells. *Hepatology* 23 1673-1681.

Oberhammer F., Bursch W., Parzefall W., Breit P., Erjver E., Stadler M., Sculte-Hermann R (1991). Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res* 51 2478-2485.

Okuno M., Moriwaki H., Imai S., Muto Y., Kawada N., Suzuki Y., Kojima S (1997) Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *Hepatology* 26: 913-921.

Papadakis K., Targan S (2000). Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 119 1148-1157.

Pares A., Potter J., Rennie L., Mezey E (1994). Acetaldehyde activates the promoter of the mouse alpha 2(I) collagen gene. *Hepatology* 19: 489-503.

Peterson T (1993). Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet-derived growth factor-driven proliferation of fibroblast. *Hepatology*. 17: 486-93.

Pietrangelo A., Borela F., Casalgrandi G (1995). Antioxidant activity of silybin in vivo during long term iron overload in rats. *Gastroenterology* 109 1941-1949.

Pinzani M., Marra F., Caligiuri A., DeFranco R., Gentilini A., Failli P., Gentilini P (1996). Inhibition by pentoxifylline of extracellular signal-regulated kinase activation by platelet-derived growth factor in hepatic stellate cells. *British J Pharmacol* .119: 1117-1124.

Pinzani M., Carloni F. (1998) Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 18 2-13

Pinzani M., Marra F. (2001) Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver* 21 (3) 397-416.

Pinzani M (2002) PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci*. 1 7 720-6.

Poli V., Cortese R (1988). Interleukin 6 induces a liver specific nuclear protein that binds to the promoter of acute-phase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* .86: 8202-8206.

Porquet D., Appel M., Fournier T., Bertaux O., Biou D., Feger J (1992) Evaluation of hepatotoxicological effects of a drug in an in vivo/ in vitro model. *Experimentia* 48 257-261.

Preaux A., Mallat A., Rosenbaum J., Zafrani E., Mavier P (1997). Pentoxifylline inhibits growth and collagen synthesis of cultured human hepatic myofibroblast like cells. *Hepatology*. 26 (2): 315-322.

Raetsch C., Jia J., Boigk G., Bauer M., Hahn EG., Riecken E., Schuppan D (2002) Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 50 241-247.

Raghow R (1994). The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis . *FASEBJ* 8 823 –831.

Ramadori G., Armbrust T (2001). Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol* 13 (7) 777-784.

Reeves H., Friedman (2002). Activation of stellate cells a key issue in liver fibrosis. *Front Biosc* 1 (7) 808-826.

Refsum S., Halliday M., Campbell G., McCaigue M., Rowlands RJ., Boston B (1996) Modulation of TNF- α and IL-6 in a peritonitis model using pentoxifylline. *Journal of Pediatric surgery* 31 928-931.

Reyes-Romero M., Greenwel P., Rjokind M (1993) Coordinated regulation of $\alpha 1$ (I) procollagen and $\alpha 2$ macroglobulin m RNAs in liver fat storing cells by IL-6 and tumor necrosis factor α . *Hepatology* 18 147.

Richards C (1988). Interleukin 6. *Cytokines* 87-108.

Rojkind M., Novkoff P., Greewel P., Rubin J., Rojas-Valencia L., Campos de Carvalho A., Stockert R., Spray D., Hertzberg EL., Wolkoff A. (1995). Characterization and functional studies on rat liver fat storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *American Journal of Hepatology* 146 6 1508-1520.

Rivero Rosas., Julian S., Piña E (1997). Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Archives of Medical Research.* 28 4 453-471.

Román J., Gimenez A., Lluís J., Gasso M., Rubio M., Caballeria J., Pares A., Rodes J., Fernández Checa J. (2000). Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF- κ B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 19 12 14684-14690.

Romanelli R., Caliguri A., Carloni V., De Franco R., Montalto P., Ceni E., Casini A., Gentilini P., Pinzani M (1997). Effect of pentoxifylline on the degradation of procollagen type I produced by human hepatic stellate cells in response to transforming growth factor-beta 1. *Br. J Pharmacol.* 122 (6): 1047-54.

Rossi P., Karsenty G., Roberts A., Roche N., Sporn M., de Crombrughe B (1998). A nuclear factor I binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor β . *Cell* 52 405-414.

Rossignol L., Plantavid M., Chap H., Douste-Blazy L. (1988). Effects of two methylxanthines, pentoxifylline and propentoxifylline, on arachidonic acid metabolism in platelets stimulated by thrombin. *Biochem Pharmacol.* 3229-3226.

Safadi R., Friedman S (2002) Hepatic Fibrosis Role of hepatic stellate cell activation. *Medscape Gastroenterology Journal* 4(4) 1-12.

Salgado S., García J., Vera (2000). Liver cirrhosis is reverted by urokinase- type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2 545-551.

Samlaska M., Winfield E (1994) Pentoxifylline. *J AM Acad Dermatol* 30 603-21.

Sampaio E., Morales M., Nery J., Santos A., Matos H., Sarno E (1998). Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro TNF- α production in lepromatous leprosy patients with erithema nodosum leprosum. Clin Exp Immunol 111 300-308.

Semmler J., Gebert U., Eisenhut T (1993). Xantine derivatives :comparison between suppression of TNF α production and inhibition of cAMP phosphodiesterase activity . Immunology 78 520-5.

Shirin H., Bruck R., Aeed H., Frenkel D., Kenet G., Zaidel L., Avni Y., Hallpern Z., Hershkovic R (1988). Pentoxifylline prevents concavalin A-induced hepatitis by reducing tumor necrosis factor α levels and inhibiting adhesion of T lymphocytes to extracellular matrix. Journal of Hepatology. 29: 60-67.

Shuppan D., Ruelh M., Somasundaram R., Hahn E (2001). Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis. 21 (3) 351-372.

Stefanovic B., Hellenbrand M., Holcik M., Briendl S., Liebhaber A and Brenner A (1997). Posttranscriptional regulation of collagen α 1(I) mRNA in hepatic stellate cells. Mol. Cell. Boil. 17 5201-5209.

Sullivan G., Casper H., Novik W., Mandell G. (1988). Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and TNF- α on neutrophil function by pentoxifylline. Infect Immun 56 1722-9.

Svegiatli-Baroni G., Saccomanno S., van Goor H, Jansen P, Benedetti A., Moshage H (2001). Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells . Liver 21; 1-12.

Takahashi H., Wang K., Jui L., Nanji A ., Mendenhall CS., French S(1991). Effect of dietary fat on Ito cell activation by chronic ethanol intake: A long term serial morphometric study on alcohol fed and control rats. Alcohol clin Exp Res 15 1060-1066.

Thompson K., Maltby J., Fallowfield J., McAulay M., Millward-Sadler H., Sheron N (1998). Interleukin 10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis Hepatology. 28: 1597-1606.

Thurman R (1998). Mechanisms of hepatic toxicity II. alcoholic liver injury involves activation of kupffer cells by endotoxin Am. J. Physiol 275 605-G611.

Tiggelman A., Linthorst C., Boer W., Brand H., Chamuleau R (1997) Transforming growth factor beta induced collagen synthesis by human liver myofibroblasts is inhibited by α 2 macroglobulin. Jpurnal of Hepatology 26 6 1220-8.

Toda K., Kumagai N., Tsuchimoto K., Inagaki H., Suzuki T., Autsakawa K., Saito H., Morizane T., Hibi T (2000). Induction of hepatic stellate cell proliferation by LPS stimulation blood mononuclear cells from patients with liver cihrrrosis. J Gastroenterol 35 214-220.

Tsukamoo H (1999) Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 23 5 911-6.

Ueki T., Kaneda Y., Tsutsui H (1999). Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 5 226-230.

Van Furth, A.M., Verhard-Seijmonsberger, E.M., Van Furth, R., and Lanermans, J (1997). Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF- α , IL-1 β and IL-10 by human leucocytes. *Immunology*. 91: 193-196.

Van Hogezaand R., Verspaget H (1997). New Therapies for inflammatory bowel disease: an update on chimeric anti. TNF alpha antibodies and IL-10 therapy. *Scand J Gastroenterol* 223:105-107.

Vanden B., Francesconi E., de Bosscher K., Resche R., Haegeman G (1999). Dissociated glucocorticoids with anti inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology* 56 797-806.

Voisin L., Breuille D., Ruot B., Rallie re C., Rambourdi F., Dalle M., Obled C (1988). Cytokine modulation by PTX differently affects specific acute phase proteins during sepsis in rats. *Am J. Physiol* 275: 1412-1419.

Weiner F., Grambrone M., Czaja M., Sha A., Amoni G., Takagashi S., Eghbalim Z (1990) Ito cell line expression and collagen regulation. *Hepatology* 11 111-17.

Wevers MD In: Kunkel Remicick DG eds. *Cytokines in Health and Diseases*. New York: Marcel Dekker (1992); 327-353.

Windmeier C., Gressner M (1996). Effect of pentoxifylline on the fibrogenic functions of cultured rat liver fat-storing cells and myofibroblasts. *Biochem Pharmacol* . 51: 577-584.

Windmeier C., Gressner A (1997). Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. *Gen Pharmacol*. 29 (2):181-96.

Woessner J (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein, samples containing small proportions of this amino acid. *Arch. Biochem Biophys*. 93:440-447.

Wordemann M., Fandrey J., and Jelkmann, W (1998). Tumor Necrosis Factor- α Production by human hepatoma cell line is resistant to drugs that are inhibitory to macrophages. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 18: 1069-1075.

Wu J., Zern M., (2000). Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 35 9 665-672.