



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Estudio *in vitro* del efecto que produce el IFC-305 en la liberación de ERO y ERN por las células de Kupffer activadas con LPS.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

Nuria Guerrero Celis

Dir. de Tesis: Dra. Victoria E. Chagoya Hazas

Asesor Interno: Dra. Ma. de Lourdes Mora García



México, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 305-Sur del Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas, gracias al apoyo del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) a través del Proyecto 312/2009 y al programa de ayudantes de investigador del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A mis Padres: Rosi y Pepe, los jefos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Chagoya por darme la oportunidad de formar parte de tan extraordinario proyecto.

Especialmente a la M. en C. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca por la guía y asesoría técnica de este trabajo, por el aprendizaje, pero sobre todo por su amistad.

A las técnicas académicas del laboratorio 305-sur del IFC:

Biol. Susana Vidrio Gómez

Dra. Mariana Domínguez López

Dra. Gabriela Velasco Loyden

A la M. en C. Lidia Martínez Pérez †, miembro del laboratorio.

Al laboratorista Jesús Salgado Cortés (Don Chucho) por su apoyo en el manejo de animales y materiales.

A mi compañero y amigo el M. en C. Jesús Rodríguez Aguilera por la asesoría en la elaboración de gráficos y por sus consejos tanto experimentales como personales.

A la Dra. Ma. Lourdes Mora García y a los miembros del jurado que revisaron y enriquecieron este trabajo:

M en B.E. Enrique Mendieta Márquez

Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez

Infinitamente a mis padres Rosalba Celis Manzo y José Manuel Guerrero Romero (los jefos) y a mis hermanos Talía, Rodrigo y Azul por su cariño, su apoyo y creer en mí.

A esas voces de mi conciencia, que son mis amigos, simplemente por estar ahí.

A la UNAM por ser mi casa.

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| ABREVIATURAS | 7 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.1. Células de Kupffer | 10 |
| 1.1.1 Origen de las células de Kupffer | 10 |
| 1.1.2 El Sinusoide Hepático | 10 |
| 1.1.3 Características Morfológicas de las células de Kupffer | 11 |
| 1.1.4 Características Funcionales de las células de Kupffer | 12 |
| 1.1.5 Activación y Subpoblaciones de las células de Kupffer | 13 |
| 1.2. Especies Reactivas de Nitrógeno y Oxígeno | 15 |
| 1.2.1. Especies Reactivas de Nitrógeno | 16 |
| 1.2. Óxido Nítrico Sintasa | 16 |
| 1.2.2. Especies Reactivas de Oxígeno | 19 |
| 1.2. La NADPH-oxidasa fagocítica | 20 |
| 2. ANTECEDENTES | 22 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 25 |
| 4. HIPOTESIS | 26 |
| 5. OBJETIVOS | 26 |
| 5.1. General | 26 |
| 5.2. Particulares | 26 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 27 |
| 7. RESULTADOS | 40 |
| 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 49 |
| 9. CONCLUSIONES | 53 |
| 10. PRESPECTIVAS | 54 |
| 11. REFERENCIAS | 55 |

RESUMEN

Las células de Kupffer (KC), son macrófagos residentes del hígado que desempeñan un papel crítico en la homeostasis en este órgano, estas células tienen la capacidad de eliminar bacterias, agentes infecciosos y pueden ser activadas por endotoxinas como LPS. Durante la activación con LPS las KC inician un proceso inflamatorio llevando a la expresión de las enzimas iNOS y NADPH-oxidasa, promoviendo la producción de óxido nítrico (NO) y anión superóxido (O_2^-), respectivamente, estas moléculas son las precursoras de la cascada de generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN) y especies reactivas de oxígeno (ERO). Se ha reportado que estos mediadores inflamatorios en cantidades excesivas pueden dañar directamente el tejido sosteniendo la inflamación, lo que resulta en múltiples hepatopatías, en las cuales el LPS está involucrado (Kolios *et al.*, 2006).

El fármaco IFC-305 (derivado de adenosina) se ha reportado con un efecto hepatoprotector sobre la reversión de cirrosis inducida por CCl_4 en un modelo de rata (Pérez Carreón *et al.*, 2010), además se ha descrito que el fármaco tiene un efecto sobre diversas estirpes celulares provenientes de cultivos primarios, en células estelares hepáticas inhibe su activación a un estadio miofibrogénico (Velasco Loyden *et al.*, 2010), en cultivo de hepatocitos se observó la inhibición de la apoptosis inducida por CCl_4 (Cabrales P. 2010). Los más recientes antecedentes muestran que el fármaco ejerce su efecto a nivel inmunológico disminuyendo la inflamación modulando la activación de las KC de un fenotipo M1 (inflamatorio) a uno M2 (antiinflamatorio) en el modelo cirrótico (Pérez Cabeza de Vaca, 2012).

En la búsqueda del mecanismo de acción del fármaco a nivel inmunológico se decidió explorar la respuesta que produce sobre las KC *in vitro*, el presente trabajo tiene como finalidad realizar un estudio de los efectos que produce el fármaco IFC-305 sobre la producción de ERO y ERN, comparado con los producidos por una activación con LPS. Como resultados se obtuvo que el fármaco IFC-305 en un cultivo primario de KC aisladas de hígado de rata, es capaz de modular la respuesta de una activación clásica con LPS reduciendo el estrés oxidante y nitrosante, a las 48 h de tratamiento se observó una disminución de la producción de NO (ERN), de la producción de ERO, así como una baja expresión de la enzima iNOS y de la subunidad p22 del complejo NADPH-oxidasa. Estos resultados demuestran que el IFC-305 regula la síntesis de ERO y ERN, modulando la respuesta inflamatoria de las KC *in vitro*.

ABSTRACT

The Kupffer cells (KC), are resident macrophages of the liver that play a critical role in body homeostasis, these cells have the ability to remove bacteria, infectious agents and can be activated by endotoxins such as LPS. During activation with LPS the KC initiate the inflammatory process that trigger to the expression of iNOS and NADPH oxidase enzymes, promoting the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), respectively, these molecules are precursors of the signaling pathway of reactive nitrogen species (RNS) and reactive oxygen species (ROS). It has been reported that in excessive amounts these inflammatory mediators can directly damage tissue holding inflammation, resulting in multiple liver disease, in which the LPS is involved (Kolios *et al.*, 2006).

The IFC-305 drug (adenosine derivative) has been reported a hepatoprotective effect on the reversion of cirrhosis induced by CCl₄ in a rat model (Pérez Carreón *et al.*, 2010) also described that the drug is effect on various cell lines derived from primary cultures in hepatic stellate cells inhibits their activation to a miofibrogenic stage (Velasco Loyden *et al.*, 2010), cultured hepatocyte induced apoptosis inhibition of CCl₄ was observed (Cabralés P. 2010). More recent history show that the drug exerts its effect in immune modulating decreasing inflammation KC activation phenotype of M1 (inflammatory) one M2 (anti-inflammatory) in the cirrhotic model (Pérez Cabeza de Vaca, 2012).

The serching mechanism of drug action in immune it was decided to explore the response produced on KC *in vitro*, this research aims to conduct a study of the effects produced by the IFC-305 drug on ROS production and RNA, compared to those produced by activation with LPS. As a result that the drug IFC-305 in a primary culture of KC isolated rat liver is able to modulate the response of a conventional activation with LPS reducing oxidative stress and nitrosating, at 48 h of treatment was observed one reduced production of NO (ERN) of ROS production and low expression of iNOS enzyme and the p22 subunit of the NADPH oxidase complex. These results demonstrate that the IFC-305 regulates the synthesis of ROS and RNS, modulating the inflammatory response KC *in vitro*.

ABREVIATURAS

7TMR: 7 transmembrane receptor, receptor de 7 pases transmembranales

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

C3: Receptor y fragmento específico de la cascada del complemento.

C5a: Factor de la cascada del complemento.

Ca²⁺: Calcio

CaM: Calmodulina

CCl₄: Tetracloruro de carbono.

CES: células endoteliales sinusoidales.

CNP: Células no parenquimales

CP: Células parenquimales

CMF-HBSS: Ca⁺² and Mg⁺² free Hank's balance saline solution, solución salina balanceada de Hank libre de Ca⁺² y Mg⁺².

DCFH-DA: Diclorofluorescína diacetato.

DEM: Desviación estándar de la media.

ED-2: Hibridoma específico para CD163 de rata.

EGF: Epidermal growth factor, factor de crecimiento epidermal.

ERN: Especie reactiva de nitrógeno.

ERO: Especie reactiva de oxígeno.

Fc: Fracción cristalizada, los complejos inmunes solubles interactúan con monocitos y macrófagos mediante esta región.

GBSS: Grey's balance saline solution, solución salina balanceada de Grey.

HBSS: Hank's balance saline solution, solución salina balanceada de Hank.

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

IL-#: Interleucina.

iNOS: Inducible nitric oxide synthase, óxido nítrico sintasa inducible.

INF-γ: Interferón gamma

KC: Kupffer cells, células de Kupffer.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LPS: Lipopolisacárido.

MIP-1α: Macrophage protein inflammatory 1-alpha, proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa.

MTT: Ensayo de la deshidrogenasa mitocondrial.

NADHP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO: Óxido nítrico.

NOS: Nitric oxide synthase, óxido nítrico sintasa.

O₂⁻: Anión superóxido.

PAMP's: Pathogens associated molecular patters, patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Phosphate buffer saline, solución salina amortiguadora de fosfatos

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino.

SN: Sobrenadante.

SRB: Sulforrodamina B.

TGF- β : Transform growth factor beta, factor de crecimiento transformante beta.

TLR: Toll like receptor, receptor tipo Toll.

TNF- α : Tumoral necrosis factor alpha, factor de necrosis tumoral alfa.

VEGF: Vascular endotelial growth factor, factor de crecimiento vascular endotelial.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la descripción de la fagocitosis por el Premio Nobel Élie Metchnikoff, quien propuso que la clave de la inmunidad era “estimular los fagocitos”; los macrófagos adquirieron gran relevancia al considerarse las principales células efectoras del sistema inmune [1].

Los macrófagos son células del sistema inmune encargadas de reconocer patrones moleculares altamente conservados presentes en patógenos, fagocitarlos y secretar mediadores de inflamación, actuando como una de las primeras defensas del organismo. También son capaces de atraer a otras células al sitio de daño y actuar como células presentadoras de antígenos contribuyendo al inicio de la respuesta inmune adaptativa [2, 3].

Los macrófagos se dividen comúnmente en subtipos basándose en su localización: Macrófagos residentes y circulantes. Los residentes son especializados en un tipo de tejido específico, incluidos los osteoclastos (hueso), macrófagos alveolares (pulmón), histiocitos (tejido conectivo intersticial), microglia (cerebro) y células de Kupffer (hígado). Los macrófagos circulantes son aquellos que patrullan todo el organismo, provenientes de monocitos que se originaron en la médula ósea y que se diferencian en el sitio de daño [4].

Los macrófagos residentes tienen un papel crítico en el inicio de la respuesta inmune innata en el tejido, dentro de la diversidad de estirpes celulares que participan en la respuesta inmune, las células de Kupffer, macrófagos residentes del hígado, constituyen del 80% al 90% de los macrófagos tisulares presentes en el cuerpo, desempeñan un papel fundamental en la homeostasis del hígado. Las células de Kupffer (KC, por su siglas en inglés) reciben el nombre del anatomista alemán Karl W. Von Kupffer, quien fue pionero en la identificación de las células sinusoidales [5].

1.1. Células de Kupffer

1.1.1 Origen de las células de Kupffer

En la actualidad es incierto el origen de estas células, existen 2 teorías que tratan de explicar su origen: la primera sugiere que proliferan de manera local, procedentes de una población de células hematopoyéticas que se alojó en el hígado durante el desarrollo embrionario; mientras que la segunda propone que proceden de monocitos circulantes que a su vez derivan de una célula madre hematopoyética, siendo incapaces de dividirse *in situ* [2, 6].

1.1.2. El Sinusoide Hepático

El sinusoide hepático es un sistema microvascular formado por diferentes tipos celulares altamente especializados. Las células del sinusoide hepático se dividen en células parenquimales (CP), hepatocitos que constituyen el 70% del volumen hepático, los cuales satisfacen las necesidades metabólicas y de desintoxicación; el volumen restante lo componen diferentes tipos celulares: células endoteliales, ovas, biliares, estelares, de Pit y células de Kupffer, que constituyen a las células no parenquimales (CNP). Los hepatocitos están dispuestos en hileras que conectan las diferentes zonas; el espacio entre hilera e hilera se le denomina sinusoide hepático, mientras que el espacio entre hilera y endotelio se le conoce como espacio de Disse [7] (**Fig.1**). Las KC representan el 35% del total de CNP (en el hígado de rata) [8] y aproximadamente 15% de las células totales en el hígado [9].

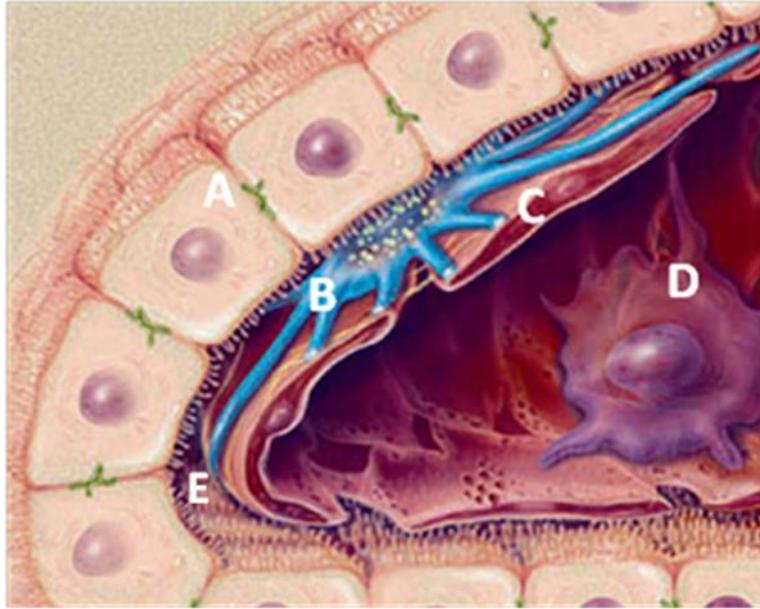


Fig.1. Representación de la distribución de las estirpes celulares existentes en el sinusoides hepático. A) Hileras de hepatocitos. B) Célula estelar. C) Célula endotelial. D) Célula de Kupffer. E) Espacio de Disse [8].

1.1.3. Características Morfológicas de las Células de Kupffer

Las KC forman parte de la unidad estructural funcional del hígado, se sitúan sobre las células endoteliales y emiten prolongaciones citoplasmáticas al espacio de Disse [5, 10], lo que les permite estar en contacto directo con los hepatocitos y las células estelares. Esta complejidad estructural, le confiere al hígado una gran importancia en múltiples procesos fisiológicos, atribuyéndole un papel esencial en el cuerpo [7].

La ultraestructura de KC muestra un contorno irregular pero de forma básicamente estrellada. La superficie celular presenta numerosos microvillis o lamelopodios e invaginaciones en forma de líneas onduladas que parecen estar implicadas en la endocitosis. El citoplasma es rico en diferentes vesículas intracitoplasmáticas, así como mitocondrias, un aparato de Golgi muy extenso, abundante retículo endoplasmático rugoso, y un conjunto de diferentes estructuras vacuolares y cuerpos densos que varían en forma, diámetro y densidad y que constituyen el desarrollado aparato lisosomal de la KC [5, 10].

Como parte de los componentes del citoesqueleto se encuentra un sistema muy activo de microfilamentos y microtúbulos de actina y miosina, así como filamentos de vimentina, que permiten el mantenimiento de la estructura celular y migración celular [2].

1.1.4. Características Funcionales de las Células de Kupffer

En condiciones normales las KC constituyen la población de macrófagos que en primer lugar entra en contacto con bacterias y partículas inmunorreactivas que llegan mediante la absorción de la circulación portal. Su capacidad para eliminar microorganismos, endotoxinas, células degeneradas, complejos inmunes y agentes tóxicos, les confiere un papel importante en los mecanismos de defensa del organismo [9]. También son capaces de actuar como células presentadoras de antígenos, activando a los linfocitos T, iniciando otros mecanismos dentro de la inmunidad adaptativa [3].

Estos macrófagos son los principales productores en el hígado de factores de crecimiento y mediadores biológicos [5, 9, 11], en consecuencia, están constantemente expuestos a factores inflamatorios que inducen un mecanismo de activación. Varias sustancias solubles son capaces de activar a las KC a través de la unión a receptores específicos en la membrana plasmática. Los activadores más importantes son los PAMS's (patrones moleculares asociados a patógenos), factores del complemento C3a y C5a, β -glicanos (derivados de bacterias y hongos) y el LPS (lipopolisacárido proveniente de las bacterias Gram-negativas) [8]. Una vez activadas las KC liberan diversos productos incluyendo citocinas, prostanoïdes, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno [12]. Estos estímulos regulan el fenotipo tanto de las mismas KC como de células vecinas [8, 13]. Sin embargo, la producción de grandes cantidades de estos mediadores como mecanismo de defensa puede tener un efecto colateral dañando tanto el mismo tejido como a tejidos adyacentes [14].

La endocitosis en las KC se puede llevar a cabo mediante 4 tipos de estructuras celulares: pseudópodos fagocíticos, vacuolas, vesículas de pinocitosis e invaginaciones. Estas células expresan receptores de Fc como C3 de manera que se unen específicamente a los inmunocomplejos y los fagocitan. También son capaces de reconocer y fagocitar glucoproteínas o glucoconjugados de oro coloidal, carbón o albúmina sérica bovina a través de un receptor de fructosa y galactosa específico de las KC [5].

1.1.5. Activación y Subpoblaciones de las KC

Las KC proporcionan un equilibrio entre la respuesta pro y antiinflamatoria, varios estudios sugieren que este balance se debe a la activación de los macrófagos, mediada por diferentes subpoblaciones, desarrollados en respuesta a las señales del microambiente. Se reconocen principalmente a los macrófagos M1, activados de forma clásica, por ejemplo mediante el LPS, presentan una actividad citotóxica y proinflamatoria; mientras que los macrófagos de tipo M2, participan en la regulación de los mecanismos antiinflamatorios y en la reparación del daño tisular [13, 15] (*Fig.2*).

La activación de macrófagos de fenotipo M1 se induce por medio de agonistas de receptores tipo Toll (TLR), que resulta en una respuesta inflamatoria caracterizada por la expresión de citocinas y quimiocinas inflamatorias, como: IL-1 β , IL-6, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), interferón gamma (IFN- γ) y proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP-1 α); además de la liberación de compuestos con actividad biológica tales como anión superóxido, óxido nítrico, prostaglandinas y leucotrienos. Los macrófagos M1 tienen actividades antiproliferativas y citotóxicas, las cuales son resultado de la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [16].

Varios estudios indican que las KC M1 contribuyen a la patogénesis de diferentes lesiones hepáticas por la producción de mediadores solubles inflamatorios debido a la interacción de las KC y LPS. Las principales patologías incluyen el hígado graso, enfermedad hepática alcohólica, la esteatopatitis no alcohólica, insuficiencia hepática después de la intoxicación con acetaminofén, de hierro y cobre, isquemia-reperfusión durante el trasplante, la fibrosis hepática inducida con tetracloruro de carbono (CCl₄) y lesión inducida por galactosamina [9, 11, 17, 18].

En contraste las KC M2 desempeñan un papel importante en la resolución de la inflamación a través de la liberación de citocinas antiinflamatorias tales como IL-4, IL-10, e IL-13. También contribuyen a la remodelación tisular y la angiogénesis sintetizando TGF-β, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de crecimiento epidermal (EGF) [13, 15].

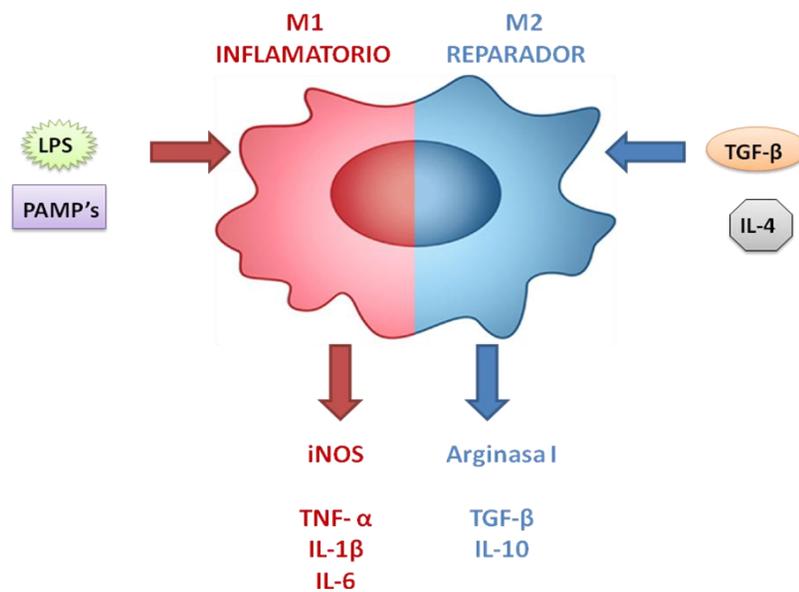


Fig.2. Comparación entre las dos vías de activación para los macrófagos. M1 vía clásica de activación por LPS (lipopolisacárido) o PAMP's (patrones moleculares asociados a patógenos), principal enzima de identificación iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), secretan citocinas inflamatorias, como: IL-1β, IL-6 y TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa). **M2** vía alternativa de activación principalmente por TGF-β (factor de crecimiento transformante beta) e IL-10, principal enzima de identificación es la Arginasa I, secretan citocinas como IL-10 y TGF-β. Modificado de [2, 19].

1.2. Especies Reactivas de Nitrógeno y Oxígeno

Se ha reportado que los mediadores inflamatorios en cantidades excesivas pueden dañar directamente el tejido y amplificar la respuesta inflamatoria. Algunos de los mediadores clave liberados por los macrófagos activados, que están implicados en la toxicidad son las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), moléculas necesarias para eliminar agentes infecciosos y partículas extrañas [20].

La actividad de estas ERO llevan a un desequilibrio del sistema oxidante/antioxidante, mientras que las especies reactivas de nitrógeno son causantes del estrés nitrosante del hígado, contribuyendo al establecimiento de la inflamación crónica (**Fig.3**).

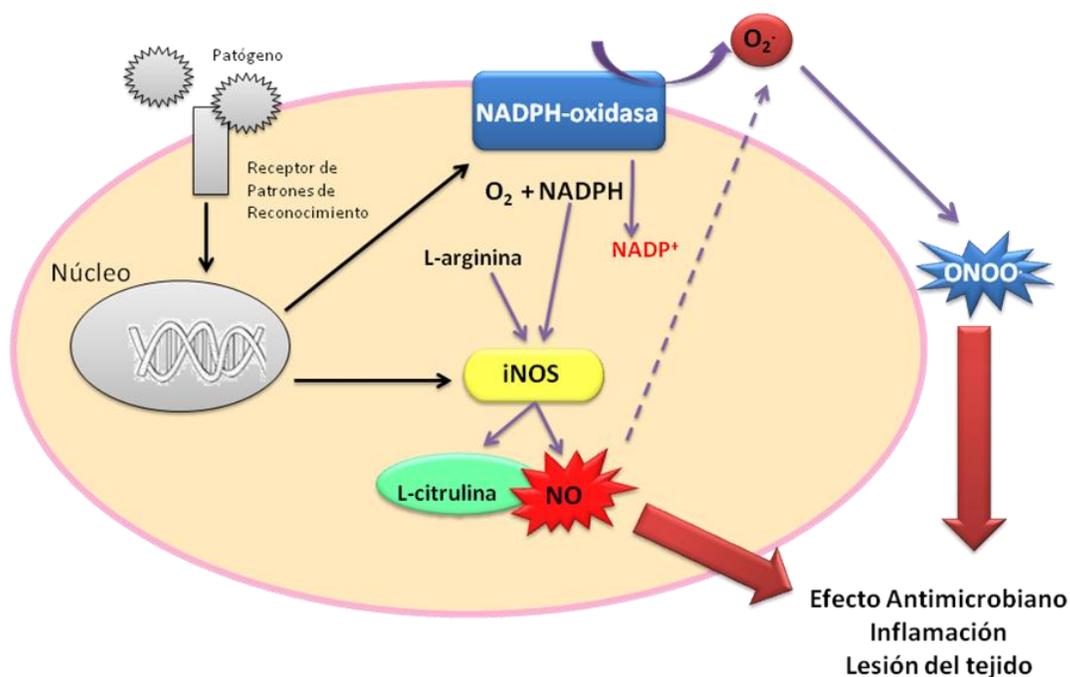


Fig.3. Mecanismo de producción de ERO y ERN en una célula de Kupffer. La reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) produce una molécula de NO y una de L-citrulina usando como cosustratos a L-arginina y NADPH. El NO puede reaccionar con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), producido por la NADPH-oxidasa, para producir especies reactivas de nitrógeno, ej. peroxinitrito (ONOO). Estos productos tienen un efecto antimicrobiano que deriva en un proceso inflamatorio produciendo lesión del tejido. Modificado de Abcam®.

1.2.1. Especies Reactivas de Nitrógeno

El óxido nítrico (NO), especie reactiva de nitrógeno (ERN), es una molécula mensajera muy importante en el organismo de los mamíferos. Posee múltiples blancos moleculares que lo involucran en diversos procesos fisiológicos y patológicos, como la regulación del tono vascular y flujo sanguíneo, contractilidad cardíaca, actúa en la respuesta inmune y como un neurotransmisor. En los mamíferos, el NO puede ser generado por tres isoformas diferentes de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): NOS1 (neuronal, nNOS), NOS2 (inducible, iNOS) y NOS3 (endotelial, eNOS) [21, 22].

1.2.1.1. Óxido Nítrico Sintasa

Las NOS funcionan en forma de homodímero, cada monómero consiste en dos regiones principales: un dominio oxigenasa N-terminal, que incluye un grupo prostético hemo, que pertenece a la clase de proteínas hemo tiolato, y un dominio C-terminal reductasa multidominio, homólogo a NADPH y otras flavoproteínas. Durante la activación de la enzima la región que entrelaza los dominios oxigenasa y reductasa contiene una secuencia de unión a calmodulina (CaM) (*Fig. 4*) [21].

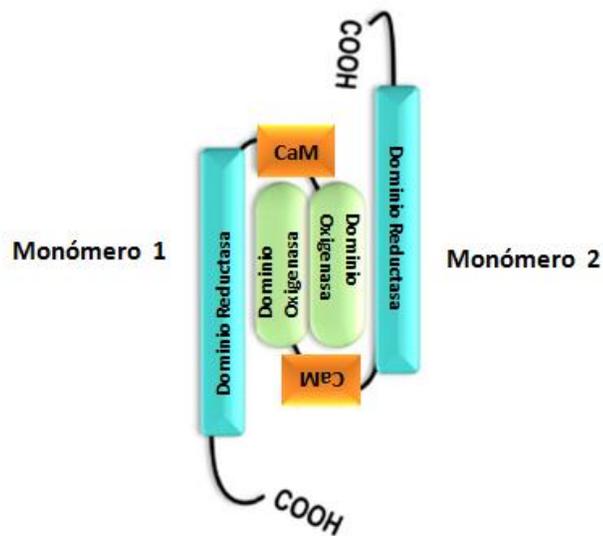


Fig. 4. Representación esquemática de la estructura de la óxido nítrico sintasa (NOS). Modificado de [23].

Las tres isoformas de NOS en mamíferos catalizan la producción de NO por la misma vía bioquímica, que consiste en dos reacciones secuenciales: NOS una vez inducida requiere de una molécula de L-arginina que se oxida para producir una molécula de NO y una de L-citrulina, se requiere de NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y oxígeno (O₂) como cosustratos [21, 24]. Según la reacción:



La nNOS es expresada en neuronas específicamente del sistema nervioso central y el NO producido en este sitio está implicado en la plasticidad sináptica, mientras que en el sistema nervioso periférico actúa como un neurotransmisor que media componentes relajantes de la peristalsis intestinal, vasodilatación, y la erección del pene. La inducción de la iNOS en células del sistema inmune, principalmente en macrófagos, es esencial para el control de bacterias intracelulares tales como *Mycobacterium tuberculosis* o el parásito *Leishmania*, sin embargo esta isoforma también puede regular diversos tipos de enfermedades, y el NO generado por esta isoforma regula diversos síntomas de la inflamación. El NO derivado de la eNOS actúa como vasodilatador endotelial fisiológico, pero también puede transmitir vasoprotección de varias maneras; el NO liberado hacia la luz vascular es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y la adhesión a la pared vascular, además de la protección de la trombosis, esto también evita la liberación de factores de crecimiento derivados de las plaquetas que estimulan la proliferación de músculo liso, el NO endotelial también controla la expresión de genes implicados en la aterogénesis (**Fig.5**) [21].

La iNOS se induce en los macrófagos por múltiples mecanismos, tales como la activación de las células por patógenos y agentes proinflamatorios, produciendo grandes cantidades de NO con respecto a las otras dos isoformas; puede generar hasta 1,000 veces más NO por períodos de hasta 5 días [25], que representa un inicio citotóxico importante en las células.

La diferencia más relevante de la iNOS con las otras isoformas de NOS es que se encuentra activa de forma independiente a las concentraciones de calcio (Ca²⁺) que existen en la

célula en reposo, lo que permite que iNOS esté activa de forma sostenida durante varios días. Las tres isoformas requieren CaM para su actividad, existe una diferencia en el dominio de unión de CaM entre las tres enzimas, nNOS y eNOS requieren concentraciones elevadas de Ca^{2+} para que se lleve a cabo la actividad catalítica, mientras que CaM se une a la iNOS con alta afinidad, incluso en ausencia de Ca^{2+} [14, 21]



Fig. 5. Características, funciones y localización de las isoformas de NOS. Panel de arriba nNOS (NOS1). Panel de en medio iNOS (NOS2). Panel de abajo. El eNOS (endotelial). Modificado de [21].

La producción de grandes cantidades de NO a través de la sobre regulación de la iNOS puede tener una variedad de efectos, que puede ser perjudicial o beneficioso dependiendo de la cantidad, la duración y el sitio anatómico de la síntesis. La producción de grandes cantidades de NO puede inhibir enzimas claves en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y el ciclo del ácido cítrico por nitrosilación de grupos reactivos, que son esenciales para la función catalítica de la enzima. El NO también puede tener propiedades

antiproliferativas mediante la inhibición de la síntesis de ADN a través de la inactivación de la enzima ribonucleótido reductasa. Estos mecanismos pueden explicar la efectos citotóxicos y citostáticos de NO derivado de macrófagos en las células tumorales y microorganismos [26].

El NO puede inhibir enzimas clave que contienen hierro en sus centros catalíticos debido a su afinidad a proteínas con hierro. Estas últimas incluyen conglomerados de enzimas dependientes de hierro-azufre que participan en el transporte mitocondrial de electrones (complejos I y II), la ribonucleótido reductasa (la enzima limitante de la velocidad en la replicación del ADN), y la cis-aconitasa (enzima clave en el ciclo del ácido cítrico). En altas concentraciones el NO puede interferir directamente con el ADN de las células y provocar rupturas y la fragmentación de la cadena [21].

En contraste, los efectos indirectos de NO son mediados por especies reactivas de óxido de nitrógeno derivados de las interacciones de NO con el oxígeno (O_2) o con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La interacción de NO con O_2 conduce a la auto-oxidación de NO y la formación de trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), que es un potente agente nitrosante. Se ha demostrado que N_2O_3 actúa como N-nitrosante de una variedad de blancos biológicos, tales como los compuestos de amino, para dar nitrosaminas potencialmente carcinogénicos. Esto puede contribuir a la asociación conocida entre la inflamación crónica y la transformación maligna [26].

Por otra parte, la S-nitrosación de ciertos tioles por N_2O_3 da lugar a aductos nitrosotiolados. Estos aductos se han considerado que desempeñan un papel clave en diversos procesos fisiológicos e inflamatorios, tales como la regulación del flujo sanguíneo, la inhibición de la adhesión de neutrófilos y la modulación de la producción de citocinas. Los S-nitrosotioles también pueden proporcionar un almacén de liberación lenta para el NO, extendiendo su vida media biológica [26].

Se sabe que NO y $O_2^{\cdot-}$ pueden interactuar rápidamente entre sí para producir un potente oxidante citotóxico, peroxinitrito ($ONOO^-$) [27]

1.2.2. Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son pequeñas moléculas derivadas del oxígeno, que pueden ser o no radicales libres. Las ERO producidas por los macrófagos son una de las defensas del sistema inmune contra patógenos, al igual que las ERN, esta producción de ERO es generalmente una cascada de reacciones que comienza con la formación de anión superóxido el cual puede interactuar con otras moléculas formando compuestos mucho más reactivos [28].

Las ERO producidas por macrófagos incluyen al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y ácido hipocloroso (HClO). Estas ERO se producen en grandes cantidades cuando los macrófagos son estimulados por agentes proinflamatorios. Este proceso, conocido como “explosión oxidativa” o “estallido respiratorio”, se caracteriza por el aumento en el consumo de O_2 , no asociado al transporte de electrones mitocondrial, si no por acción del sistema NADPH-oxidasa.

1.2.2.1. La NADPH-oxidasa fagocítica

La NADPH-oxidasa fagocítica (NOX2), es miembro de las proteínas transmembranales que transfiere un electrón a través de la membrana plasmática y reducen O_2 a $O_2^{\cdot-}$, la activación enzimática ocurre en respuesta a una amenaza infecciosa, es un complejo enzimático multicomponente que comprende seis proteínas. En las células en reposo la NADPH-oxidasa está inactiva debido a que sus componentes se distribuyen entre el citosol: $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ y Rac1/2, y en la membrana plasmática: $p22^{phox}$ y $gp91^{phox}$ (forman el heterodímero flavocitocromo b558). Cuando las células se activan, los componentes citosólicos migran a la membrana, donde se asocian con los componentes membranales para ensamblar la enzima catalíticamente activa. Durante la activación de la enzima, la fosforilación de la subunidad citosólica $p47^{phox}$ conduce a cambios conformacionales que permiten la interacción en regiones ricas en prolina de la subunidad $p22^{phox}$ [28], que lleva a

que la oxidasa catalice la transferencia de un electrón desde NADPH hacia el O₂ para la formación de O₂⁻ (**Fig. 6**) [29-31], como se muestra en la siguiente reacción:



En la reacción se liberan protones (H⁺) hacia el citosol, generando una despolarización de la membrana, el propio complejo enzimático permite la salida de protones hacia el lado extracelular, a su vez estos protones pueden interactuar con otras moléculas generando otras mucho más reactivas [32].

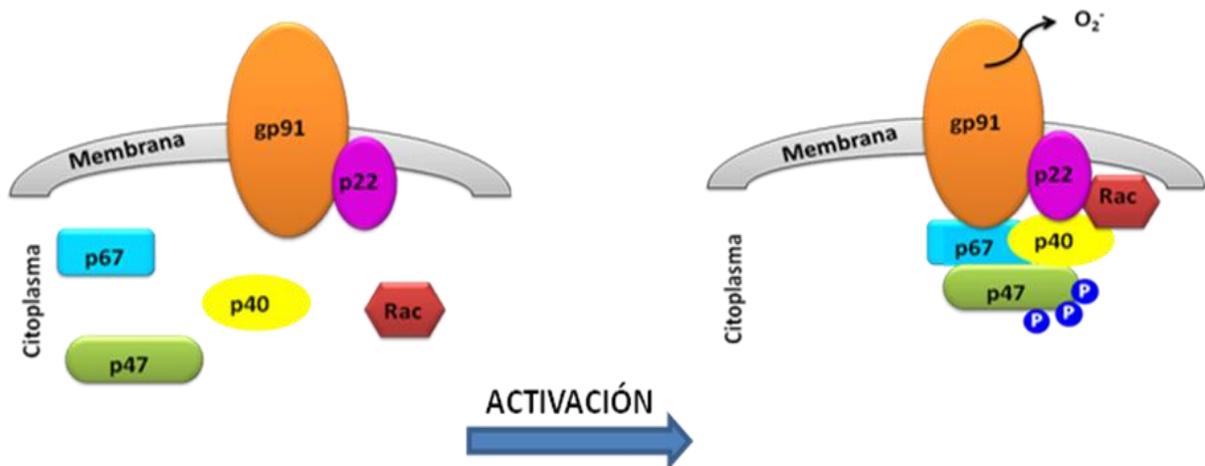


Fig.6. Sistema de la NADPH-oxidasa. Representación esquemática del sistema de la NADPH-oxidasa con sus componentes: gp91^{phox} y p22^{phox} membranales que forma el citocromo b558, y p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} en el citoplasma de los fagocitos. La activación se produce con la fosforilación de p47^{phox} seguido por el ensamblaje de todos los componentes con el citocromo b558, que reduce el oxígeno molecular (O₂) a superóxido (O₂⁻). **Modificado de [33, 34]**

Existen otros sistemas enzimáticos que producen ERO, incluyendo xantina-oxidasa, citocromo P450 y la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo esta producción se genera como subproducto de la actividad de estas enzimas, mientras que la NADPH-oxidasa produce ERO como función primaria [33]

2. ANTECEDENTES

En el laboratorio de la Dra. Chagoya se ha desarrollado el fármaco IFC-305 (PATENTE UNAM 207422), una sal derivada de adenosina (**Fig. 7**), que se ha reportado con un efecto hepatoprotector, así como en la reversión de cirrosis inducida por CCl₄ en un modelo de rata [35], actualmente se encuentra en fase clínica II y no se han observado eventos adversos a la dosis y condiciones administradas. Además se han reportado los mecanismos de acción del IFC-305 en cultivo primario de células estelares hepáticas inhibiendo su activación a miofibroblasto, manteniéndolas en un estado quiescente [36], así como en cultivo de hepatocitos observándose la inhibición de la apoptosis inducida por CCl₄ [37]. Recientemente se ha descrito su participación a nivel epigenético [38], en la regulación del ciclo celular [39], así como la modulación de la respuesta inmune en el estado de activación de las KC de un fenotipo M1 (activado clásicamente) a uno M2 (antiinflamatorio) por acción del IFC-305 en el modelo cirrótico [2]. Anteriormente el grupo de la Dra. Chagoya describió que la adenosina, que es la molécula base del fármaco, ejerce una acción protectora contra la peroxidación de lípidos producida por la administración aguda de CCl₄ en rata [40], describiendo que el efecto protector de la molécula de adenosina no es directa, sino más bien se relaciona con sus productos catabólicos, tales como el ácido úrico, el cual ha sido reconocido como un eliminador de radicales libres [41].

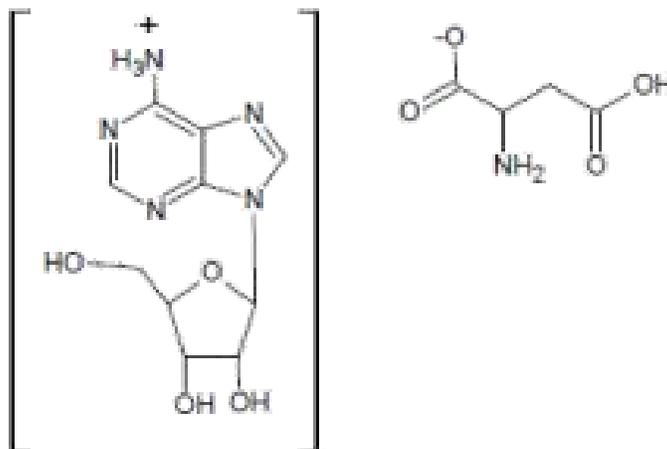


Fig. 7. Estructura del IFC-305. Aspartato de Adenosina PATENTE UNAM 207422

La adenosina es una molécula de señalización que se encuentra presente en el organismo humano de manera constitutiva tanto en la región intra como extracelular a muy baja concentración en condiciones fisiológicas. Sin embargo, sus niveles se incrementan dramáticamente durante el estrés metabólico y daño de la célula, en procesos que tienen lugar en condiciones de isquemia e hipoxia, y en los tejidos inflamados. Se genera adenosina extracelular de una amplia gama de respuestas de los tejidos que pueden ser generalmente vistos como protectores de órganos y por lo tanto, que median la restauración de la homeostasis [16].

Se sabe que la adenosina puede interactuar con todas las células a través de 4 distintos receptores: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, miembros de la familia de los 7TMR (receptores de 7 pases transmembranales) acoplados a proteínas G [2], tanto la afinidad a estos receptores como su activación varía dependiendo de la concentración de adenosina. También puede ejercer su efecto por medio de transportadores nucleosídicos que pueden ser de dos tipos: equilibradores (de difusión facilitada) y concentradores dependientes de Na⁺ (con gasto energético) [42] o ser metabolizada de manera exógena por nucleotidasas de membrana (ecto nucleotido-pirofosfatasas, ecto-5'-nucleotidasa) [43]. Las KC cuentan con los 4 receptores para adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃), recientemente se describió que A₁ y A₃ se expresan en bajos niveles en estas células [16].

Muchos enfoques terapéuticos se basan en la modulación de la señalización de adenosina en el sistema inmune. Estos incluyen compuestos farmacológicos que alteran la descomposición y la generación de agonistas y antagonistas de los diversos subtipos de receptores de adenosina [44].

En la búsqueda de compuestos para el tratamiento de las patologías hepáticas, se han desarrollado fármacos que tienen como blanco a las KC, ya que estas células tienen un papel importante en la fisiopatología hepática, fármacos que tienen como finalidad la inhibición de la ruta de biosíntesis de eicosanoides actuando como antiinflamatorios en modelos *in vivo* [45]. Recientemente se ha propuesto a la regulación de los estados de activación de las KC como uno de los blancos terapéuticos para el diseño de fármacos para

el tratamiento de la cirrosis [2]. Adicionalmente se sugiere que una depleción específica o inhibición de los macrófagos M1 se correlaciona con la protección contra la lesión hepática inducida por diversos hepatotóxicos [15].

3. JUSTIFICACIÓN

Basándose en los resultados obtenidos en el estudio realizado del efecto de la molécula de adenosina como protector de la peroxidación de lípidos y como antioxidante en el modelo *in vivo* [41], el presente trabajo tiene como finalidad la obtención de un cultivo primario de células de Kupffer y realizar en ellas un estudio de los efectos que produce el fármaco IFC-305 sobre la producción de ERO y ERN, comparado con los producidos por una activación clásica con LPS.

Actualmente, a pesar de los avances en el conocimiento de las enfermedades crónico-degenerativas del hígado, no existe un tratamiento eficaz para estos padecimientos y las estrategias terapéuticas están encaminadas al manejo paliativo. Es por ello que el fármaco IFC-305 representa una alternativa terapéutica para la cirrosis [7], y es relevante profundizar en su participación en la reversión de la cirrosis, la interacción con el hígado y sus células.

Como se mencionó anteriormente todas las estirpes celulares hepáticas tienen comunicación y relación entre sí, se sabe que muchas de las funciones hepáticas están reguladas por moléculas liberadas por NPC. Una de las estirpes celulares más trascendentales en la producción de mediadores biológicos son las KC.

Por tal motivo es importante que mediante los estudios *in vitro*, se logren determinar las modificaciones moleculares en cada estirpe celular, en particular de los macrófagos del hígado porque son esenciales para la protección del parénquima, además controlan la regeneración de los hepatocitos, forman parte de la respuesta inmune y antitumoral; como células presentadoras de antígenos y participando en la eliminación de células tumorales [46], también desempeñan un papel crucial en el metabolismo de lípidos, lipoproteínas, proteínas, aminos biogénicas y colágena [47]. Recientes estudios sugieren que los macrófagos también desempeñan un importante papel suprimiendo la inflamación e iniciando la reparación del tejido, se ha demostrado una función de las KC M2 como mediadoras de la reparación y la reversión del daño hepático [15].

4. HIPÓTESIS

El fármaco IFC-305 tiene la capacidad de regular la activación de las células de Kupffer *in vitro* inhibiendo la producción ERN y ERO derivadas de enzimas como la iNOS y la NADPH-oxidasa.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Estudiar el efecto del compuesto IFC-305 en cultivo primario de células de Kupffer aisladas de hígado de rata y comparar los cambios en la producción de ERN y ERO con los producidos por el LPS.

5.2. Particulares

1. Obtener cultivo primario de células de Kupffer aisladas de hígado de rata.
2. Determinar cambios en la viabilidad a diferentes dosis de IFC-305.
3. Detectar los niveles de NO y la actividad enzimática de la iNOS en cultivos de células de Kupffer tratados con LPS y/o IFC-305.
4. Detectar los niveles de ERO mediante el reactivo DCFH-DA.
5. Determinar la expresión de la subunidad p22 del complejo NADPH-oxidasa en cultivos de células de Kupffer tratados con LPS y/o IFC-305.

6. MATERIAL Y MÉTODO

Obtención del cultivo primario de células Kupffer

Se exploraron diversos procedimientos para el aislamiento y purificación de KC, con el fin de estandarizar el protocolo que se utilizaría en los experimentos *in vitro* empleando los métodos de digestión enzimática a través de una perfusión del órgano y un gradiente de densidad por centrifugación y elutriación por centrifugación, basados en los reportados anteriormente por M. Froh, *et al.* (2002) [48], V. Valatas *et al.* (2003) [49] y R. Pérez [comunicación personal].

Animales Experimentales

Se emplearon ratas Wistar macho con un peso de 350 g aproximadamente, obtenidos del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, el manejo de los animales fue apeándose a las guías institucionales de uso y manejo de animales de laboratorio. Los sujetos experimentales fueron anestesiados por una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (100mg/kg).

Aislamiento de Células de Kupffer

Se insertó una cánula (D.I. 1.19 mm, D.E. 1.70 mm, *Becton Dickinson* PE190) en la vena porta para la perfusión del hígado *in situ*; Primeramente se lava el órgano con una solución salina, posteriormente se lleva a cabo la digestión enzimática; variando la solución de lavado, el orden, la concentración, el tiempo y la velocidad de perfusión de las enzimas, según el protocolo utilizado. Se muestra una tabla donde se resume y compara los 3 protocolos empleados (*Tabla 1*).

| Protocoló | M. Froh, 2002 | V. Valatas, 2003 | R. Pérez, comunicación personal |
|-------------------------|--|---|---|
| Cantidad de Ratas | 2 | 2 | 2 |
| Perfusión | Lavado: CMF-HBSS 20 mL/min Digestión: Colagenasa 0.02% en 200 mL HBSS. | Lavado: CMF-HBSS 200 mL Digestión: Pronasa 0.2% 60 mL y Colagenasa 0.01% 225 mL en HBSS. | Lavado: GBSS 15 mL/min 10 min. Digestión: Colagenasa 0.02% en 100 mL GBSS. |
| Extirpar Hígado | Agitar el hígado hasta quedar en suspensión en 50 mL colagenasa 0.02% | Corta en trozos en 100 mL pronasa 0.03% y DNAsa 0.01% en HBSS | Cortar en trozos en 50 mL de colagenasa 0.01% |
| Incubación | | 30 min 37°C en agitación constante 200 rpm | 30 min 37°C en agitación constante 200 rpm |
| Filtrar | Malla Nylon | Malla Nylon | Malla Nylon |
| Suspensión | Centrifugación: 600 rpm 3 min (2 veces) Obtener SN centrifugar 1500 rpm 7min. El pellet se lleva al gradiente | Centrifugación: 600 rpm 7 min. El pellet se lleva al gradiente | Centrifugación: 500 rpm 5 min (2 veces) Obtener SN centrifugar 1700 rpm 5 min. El pellet se lleva al gradiente |
| Gradiente de Densidad | Percoll 50-25 % 15 min 2800 rpm. Se obtiene la interfase | Percoll 50-25% 15 min 3000 rpm. Se obtiene la interfase | Percoll 50-25% 20 min 3000 rpm. Se obtiene la interfase. |
| Elutriación | | ✓ 45-60 ml/min | |
| Purificación adherencia | 15min DMEM suplementado | 2h DMEM suplementado | 1 h DMEM suplementado |
| Rendimiento Obtenido | 30-40 x10 ⁶ células varios tipos celulares | 20-30x10 ⁶ células contaminación bacteriana | 20-30x10 ⁶ células varios tipos celulares |

Tabla 1. Comparación de 3 Protocolos para el Aislamiento de Células de Kupffer. Para la perfusión se utilizó buffers salinos a 37 °C, solución salina balanceada de Hank (HBSS), solución salina balanceada de Hank libre de Ca⁺² y Mg⁺² (CMF-HBSS), solución salina balanceada de Grey (GBSS), Pronasa Roche®, Colagenasa tipo IV Worthington®, DNAsa Roche®, Percoll Plus GE®. Las células se incubaron con medio de cultivo DMEM Gibco® suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) Gibco®, 0.2% gentamicina Gibco® y 10% antibiótico Gibco® en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Estandarización del Aislamiento de células Kupffer de rata

Poniendo en consideración que el método propuesto por Valatas V. (2003) se emplea la técnica de elutriación y ésta se realiza fuera de la esterilidad, el cultivo es propenso a contaminación bacteriana y/o fúngica, además de tener un bajo rendimiento respecto al descrito [49]. Mientras tanto los métodos propuestos por Froh M. (2002) y Pérez R. (2011) nos lleva a un cultivo contaminado con otras estirpes celulares no parenquimales. Es por ello que se propone un protocolo el cual se adecue a las necesidades del proyecto en cuestiones de pureza y de rendimiento, así como a las condiciones de nuestro laboratorio; una combinación y diversas modificaciones de los protocolos reportados anteriormente, detallado a continuación:

1. Se emplean 3 ratas macho Wistar de 300-350 g aproximadamente. La anestesia se realiza con pentobarbital sódico (100 mg/kg) vía intraperitoneal.
2. Se realiza la intervención en la que se expone la vena porta y se introduce una cánula y el hígado se perfunde *in situ* con solución salina balanceada de Hank libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} (CMF-HBSS) a un flujo de 15 mL/min 10 min a 37°C.
3. Se realiza una digestión enzimática perfundiendo Pronasa (Roche®) 30 mL al 0.2%, Colagenasa tipo IV (Worthington®) 120 mL al 0.01% en solución salina balanceada de Hank (HBSS) a 37°C.
4. Se extirpa el hígado, se coloca en una cápsula de porcelana junto con 50 mL de Pronasa 0.03% y DNAsa (Roche®) 0.01% en HBSS, el tejido se corta en trozos pequeños.
5. Se incuba durante 30 min a 37°C en agitación constante a 200 rpm.
6. En una malla de nylon se filtra el total de la solución con el tejido digerido.
7. Una vez obtenida la suspensión se centrifuga a 600 rpm durante 7 min a 4°C, se obtiene el sobrenadante (SN) y se conserva en frío, este paso se repite una vez más.
8. Se colectan y combinan los SN para generar un “pool” que se centrifuga a 1700 rpm por 7 min a 4°C, se descarta el SN y se conserva el pellet en hielo. Se combinan los pellets y se llevan a un gradiente de densidad.

Centrifugación en Gradiente de Densidad

Se realiza un gradiente discontinuo de Percoll, de acuerdo a lo reportado [50]. En tubos cónicos de plástico Falcon® de 15 mL se colocan dos fases de Percoll (Plus GE®) al 50% y 25%, en la última fase se colocan 4 mL de la suspensión celular, se centrifuga a 3000 rpm 15 min (sin freno) a 4°C. Se obtiene la interfase, se centrifuga a 1800 rpm x 10 min a 4°C y se realiza un lavado con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar las partículas de Percoll (*Fig.8*).

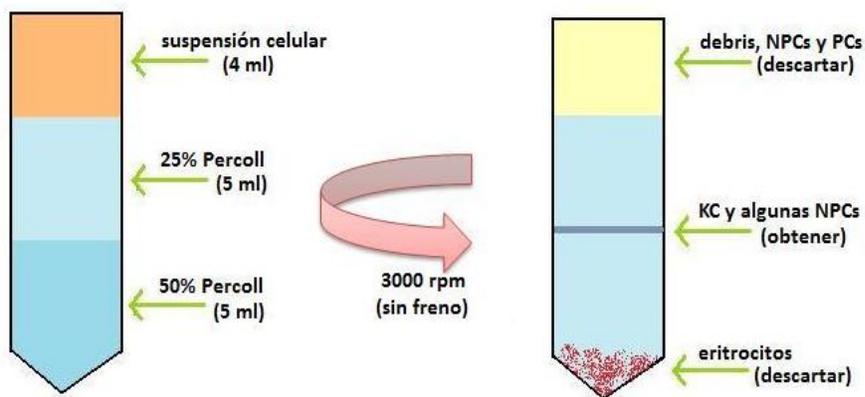


Fig.8.

Representación gráfica del gradiente de densidad con Percoll

Viabilidad y Conteo

El conteo de células se realizó con el método de exclusión con el colorante azul trepano en cámara de Neubauer. Este colorante permite diferenciar células viables (no teñidas) de las no viables (tenidos de azul) [51].

1. Se toman 5 μL de la suspensión de células y se colocan en un tubo cónico de plástico eppendorf® junto con 195 μL del azul tripano 0.4%
2. Se mezcla perfectamente y se coloca en la cámara de Neubauer
3. Al microscopio se cuentan las células de los 4 cuadrantes de la cámara y se determina el número de células de acuerdo a la dilución.

Purificación y Cultivo de Células de Kupffer

Mediante el método de adherencia se purifican las KC. Se siembran en placas de 6 pozos 3.5×10^6 células por pozo con medio de cultivo DMEM (Gibco®) 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco®), 0.2% gentamicina (Gibco®) y 10% antibiótico (Gibco®) en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C . Se reemplaza el medio de cultivo después de 30 min en donde se remueven las células no-adherentes (*Fig.9*).

Una vez obtenido el cultivo se deja en incubación en una atmósfera de 5% CO_2 a 37°C , durante 24 h.



Fig.9. Placas de cultivo de 6 pozos

Identificación de la Población

Sé identificó la población KC mediante el ensayo de inmunocitoquímica [5, 49], utilizando el anticuerpo ED-2 (santa cruz Biotechnology®) [1:500]. Empleando el kit *EnVision™ + System, HRP (DAB)*, Dako®.

Tratamientos *in vitro*

Se realizó una curva dosis-respuesta para el fármaco IFC-305, con una concentración que va de [0, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM y 5 mM]. Por medio de la tinción con SRB se caracterizaron cambios de viabilidad y citotoxicidad.

Una vez determinada la concentración óptima del fármaco IFC-305 que no afecte el número de células respecto al control, se adicionaron los siguientes tratamientos:

- Control (sin tratamiento).
- IFC-305
- LPS (Lipopolisacárido de *Escherichia coli*, Sigma Aldrich®) [1 μ g/mL], control positivo de activación clásica [49].
- IFC-305+LPS (al mismo tiempo)

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

Tinción con Sulforrodamina B

El método de tinción con sulforrodamina B (SRB) fue desarrollado para medir la citotoxicidad inducida por fármacos así como la proliferación celular, representa una alternativa al empleo del método de medición con MMT [52, 53].

1. Retirar medio de cultivo y adicionar a cada pozo 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 1 h a 4°C.
2. Lavar 5 veces con agua destilada y dejar secar.
3. Adicionar 700 μ L de SRB (Sigma-Aldrich®), al 0.4% en ácido acético, incubar durante 30 min a temperatura ambiente.

4. Lavar 5 veces con ácido acético 1%, dejar secar.
5. Adicionar 400 μ L de Tris Base [10 mM] pH=10.5, se deja en agitación suave durante 5 min.
6. Recolectar lo solubilizado y leer en un espectrofotómetro a 564 nm.

Detección de Lactato deshidrogenasa

El ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) es un método para determinar la integridad de la membrana celular en función de la cantidad de LDH citoplasmática liberada en el medio de cultivo, el cual se determinó por medio del kit *In vitro toxicology assay lactate dehydrogenase based* (Sigma-Aldrich®). Se utilizó como control Tritón X-100 (Sigma-Aldrich®) 1% en un pozo.

1. Tomar 200 μ L de SN y adicionar el doble del volumen de *LDH assay mix* (400 μ L)
2. Incubar durante 30 min.
3. Agregar ácido clorhídrico (HCL) [1N] 1/10 volumen.
4. Leer en un espectrofotómetro a 490nm y 690nm.

El resultado se determina por diferencia de absorbancia entre las longitudes de onda 490nm y 690nm.

Detección de Óxido Nítrico

La prueba de Griess es un método el cual permite la cuantificación indirecta de NO a través de sus principales metabolitos, es decir nitritos y nitratos. Se detectó NO en sobrenadantes de las KC espectrofotométricamente mediante este ensayo [54, 55] (**Fig.10**).

1. Tomar 500 μL de SN y agregar 2 lentejas de cadmio activo.
2. Incubar por 30 min.
3. Tomar 100 μL de SN reducido agregar 100 μL de la mezcla de reacción.
4. Leer en un espectrofotómetro de microplacas a 548 nm.

Se realizó una curva estándar de nitrato de potasio (KNO_3), con diluciones seriadas usando las siguientes concentraciones: [1 mM, 500 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12 μM], utilizando como blanco DMEM.

Mezcla de reacción: N,N naftil etilendiamina 0.1% en HCl + sulfanilamida 1% en H_3PO_4 5%, mezcla 1:1.



Fig.10. Microplaca que ejemplifica el ensayo colorimétrico de Griess para detectar NO.

Obtención de Proteína

Se obtuvo proteína lisando las células con 200 μ L de solución amortiguadora de lisis TNTE (Tris pH=7.5 [50 mM], NaCl [150 mM], Tritón X-100 [0.3%], EDTA [5 mM]) e inhibidores de proteasas por pozo, desprendiendo las células con un gendarme de plástico (*scraper*). Las muestras se almacenan a -70 °C en alícuotas de 100 μ L.

Cuantificación de Proteína

Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, utilizando el reactivo *Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent* (Biorad®). Se efectuó una curva estándar de albúmina por dilución seriada empleando las siguientes concentraciones: [20, 15, 10, 5, 2.5 μ g/mL], utilizando como blanco el buffer de lisis, se detectó espectrofotométricamente en un lector de micropelículas a 595 nm.

Evaluación de la cantidad de proteínas por Western Blot

Se prepararon geles de acrilamida al 15% para la separación de las proteínas. Se cargaron 20 μ g de proteína en cada pozo del gel, así como 5 μ L de marcador de peso molecular *Dual color* BioRad®. La electroforesis se realizó con solución amortiguadora de corrida SDS-Page (Trizma 25 Mm, glicina 192 mM, SDS 1%) a 100 V durante aproximadamente 2 h 30 min.

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Trans-Blot Transfer Medium*, en una cámara semiseca Biorad®, utilizando solución amortiguadora de transferencia (SDS-Page, metol 20%) 100 V durante 1 h.

Una vez que se transfirieron las proteínas (*Fig.11.*), las membranas se bloquearon con albúmina al 5% en TBS-Tween en agitación constante durante toda la noche a 4°C. La **Tabla 2** describe las condiciones de incubación y los anticuerpos usados.

| Anticuerpo 1° | Dilución | Condiciones de Incubación | Anticuerpo 2° | Dilución | Condiciones de Incubación |
|---|----------|-------------------------------------|---------------|----------|--|
| p22 santa cruz Biotechnology® | 1:1500 | Albúmina 3% toda la noche 4°C | Anticonejo | 1:5000 | Albúmina 3%, temperatura ambiente 2h |
| NOS2 (iNOS) santa cruz Biotechnology® | 1:500 | Albúmina 3% toda la noche 4°C | Anticonejo | 1:5000 | Albúmina 3%, temperatura ambiente 2h |

Tabla 2. Anticuerpos y Condiciones de incubación para Western blot

Una vez terminadas las incubaciones se revelaron las membranas con el sustrato *West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, SuperSignal®, en película fotográfica Kodak®

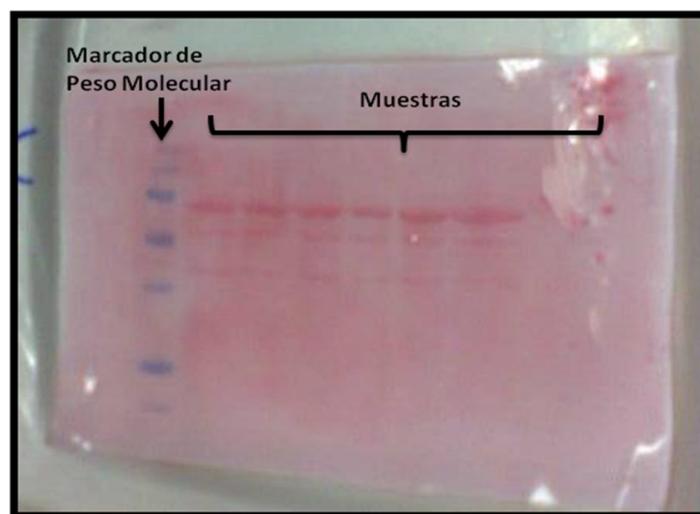


Fig.11. Membrana de nitrocelulosa con tinción de *Ponceau* para la verificación de la transferencia de proteínas.

DetECCIÓN DE ERO

El diclorofluorescína diacetato (DCFH-DA) es un reactivo sensible y ampliamente utilizado para la detectar la producción los oxidantes intracelulares. El DCFH-DA entra a la célula y es modificado por esterases convirtiéndolo a diclorofluorescína (DCFH), una molécula no fluorescente hidrofílica. La oxidación del DCFH por las ERO crea un compuesto altamente fluorescente diclorofluoresceína (DCF) [56], como se muestra en la siguiente reacción:



Ensayo de DCFH-DA

Para determinar el estrés oxidante en las células mediante el ensayo con el compuesto DCFH-DA:

1. Retirar medio de cultivo
2. Lavar los pozos con PBS a 37°C
3. En cada pozo colocar el reactivo diclorofluorescína diacetato (DCFH-DA, Sigma Aldrich®) [20 µM] disuelto en DMEM libre SFB.
4. Incubar por 1 h a 37°C en oscuridad
5. Pasado el tiempo de incubación retirar el medio con el reactivo y lavar 3 veces con PBS a 37° C
6. Se analizan las células en los pozos por microscopía de fluorescencia con el microscopio IX71 OLYMPUS® mediante el programa *Image-Pro Plus 7.0*

Análisis Estadístico

Todos los valores son expresados como el promedio \pm DEM (desviación estándar de la media). Se empleó la prueba estadística *T student* pareada para determinar diferencias significativas entre cada tratamiento. La significancia que se considerara es $0.001 \leq p \leq 0.01$

7. RESULTADOS

Los estudios *in vitro* de cultivos primarios son una valiosa herramienta para la exploración de las funciones inmunológicas específicas de las KC. Varios métodos han sido descritos previamente para el aislamiento y purificación de las células sinusoidales del hígado. Sin embargo, los procedimientos de un solo paso como centrifugación por gradiente de densidad o elutriación, no son capaces de eliminar la contaminación en los cultivos KC de otros tipos de NPC debido a que su densidad y tamaño son semejantes a los de las demás células sinusoidales [49].

Con el propósito de corroborar que la población aislada corresponde a las KC, se realizó una inmunocitoquímica con el marcador de macrófagos de hígado de rata, el anticuerpo ED-2. En la **Fig.12** se muestran un par micrografías donde en el panel **A** las células presentan color café, indicando marca positiva para el anticuerpo ED-2, comparadas con el control sin ED-2 en el panel **B**, observándose que la mayoría de las células, aproximadamente 90%, son positivas.

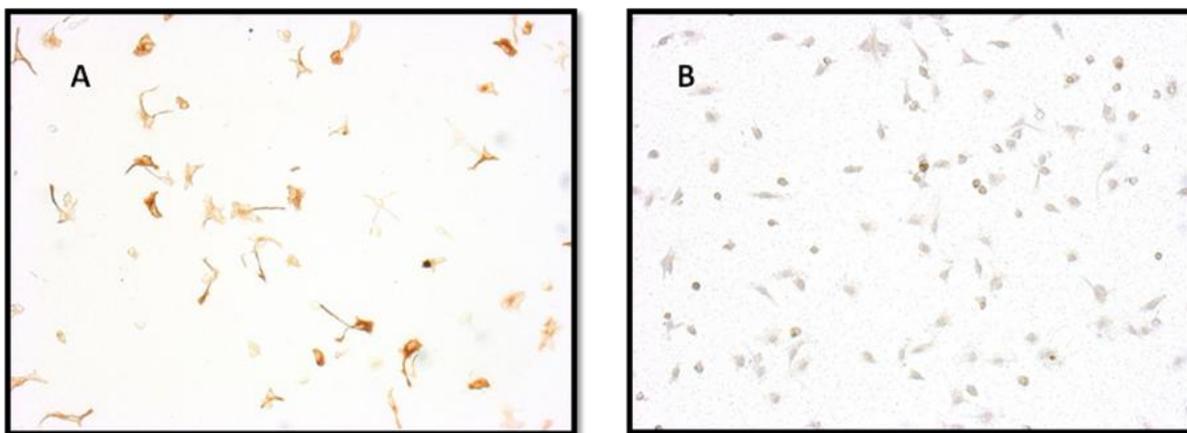
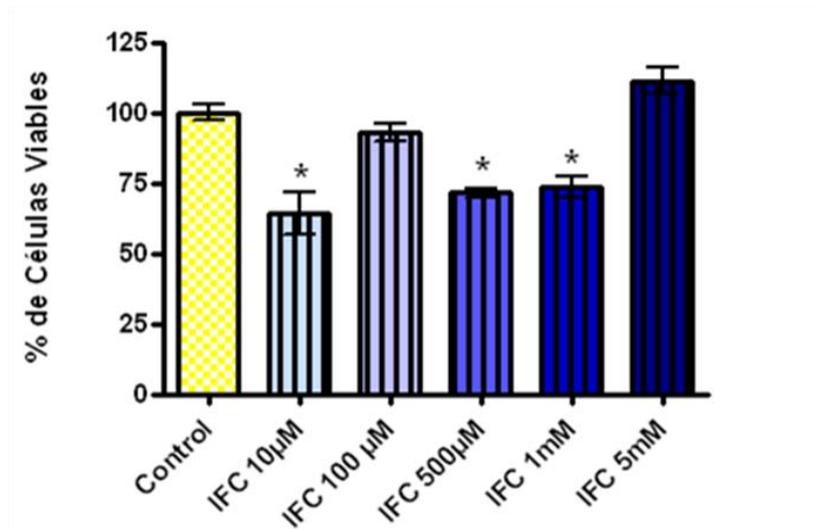


Fig.12. Identificación de células de Kupffer por inmunocitoquímica 20X. Células no-parenquimales aisladas de hígado de rata. **A.** Anticuerpo ED-2 (1:500). **B.** Control negativo.

Cambios de viabilidad por efecto del fármaco IFC-305 en células de Kupffer

Se determinaron cambios de viabilidad y citotoxicidad, evaluados mediante el ensayo de tinción con SRB y LDH. La **Graf.1** muestra el efecto citotóxico del fármaco IFC-305 dependiente de la dosis [0, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM y 5 mM], representado en porcentaje de viabilidad, donde se observa una disminución de la sobrevivencia a [10 μ M, 500 μ M, 1 mM] respecto al Control, lo que permitió discriminar las concentraciones para asegurar que en los ensayos posteriores los resultados sean inherentes al tratamiento y no al número de células.

Citotoxicidad de la dosis de IFC-305 en KC



Graf. 1. Efecto de la dosis del fármaco IFC-305 en la viabilidad de las células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h. Determinación mediante la tinción con SRB. Los valores corresponden al promedio del porcentaje \pm DEM $n=4$, * $p \leq 0.002$ respecto al Control.

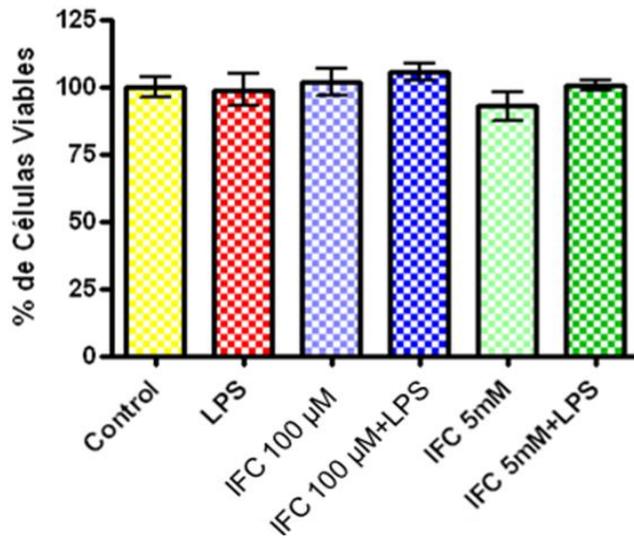
Una vez que se determinaron las concentraciones del fármaco IFC-305 a utilizar, se adicionan los siguientes tratamientos al cultivo:

- Control
- LPS [1 µg/mL]
- IFC-305 [100 µM]
- IFC-305 [100 µM] +LPS
- IFC-305 [5 mM]
- IFC-305 [5 mM] +LPS

Se realizó una tinción con SRB sobre las células y la detección de LDH en los sobrenadantes en experimentos independientes, para evaluar si ocurrían cambios en la viabilidad por efecto del IFC-305 [100 µM, 5 mM] aunado o no al LPS, estos resultados se muestran a continuación: en la **Graf.2** se observa que el LPS [1 µg/mL] por sí solo no tiene efecto sobre la viabilidad de las KC, ya se ha reportado que a esta concentración LPS induce una respuesta proinflamatoria adecuada y no modifica la sobrevivencia de las KC [49, 57], y cuando se administra IFC-305+LPS a ambas concentraciones tampoco afecta la viabilidad de las KC respecto al Control. Este mismo efecto se observa en la **Graf.3** donde se hizo la detección de LDH, que muestra que no ocurrieron cambios en la viabilidad con ningún tratamiento respecto al Control. El método indica el uso de Tritón 1% como control positivo de citotoxicidad, ya que al lisar las células permite asegurar que hay células no viables, en esta grafica se observa que no existen cambios estadísticamente significativos intrínsecos a los tratamientos a 48 h.

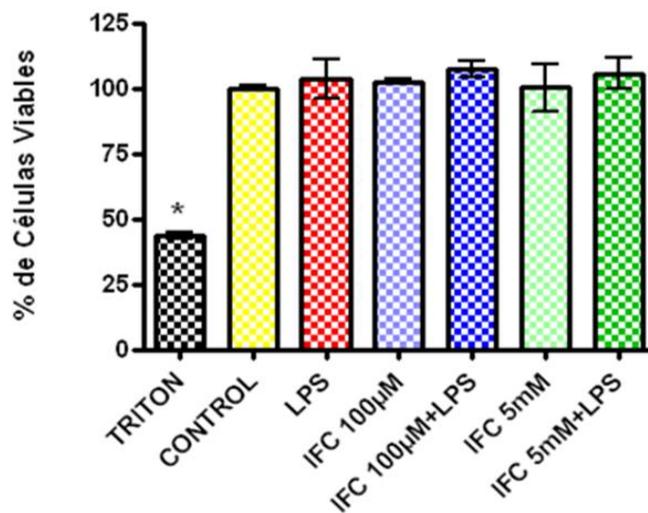
Habiendo comprobado que la incubación de las KC a las 48 h con IFC-305 [100 µM, 5 mM] al mismo tiempo que LPS no tiene un efecto citotóxico, se procede con la evaluación de la producción de NO y ERO así como de las enzimas que los generan.

Citotoxicidad del IFC-305 + LPS en KC con SRB



Graf. 2. Efecto del fármaco IFC-305 + LPS en la viabilidad de las células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h. Determinación mediante la tinción con sulforrodamina B (SRB). Los valores corresponden al promedio del porcentaje \pm DEM $n=3$, $P \leq 0.01$ respecto al control.

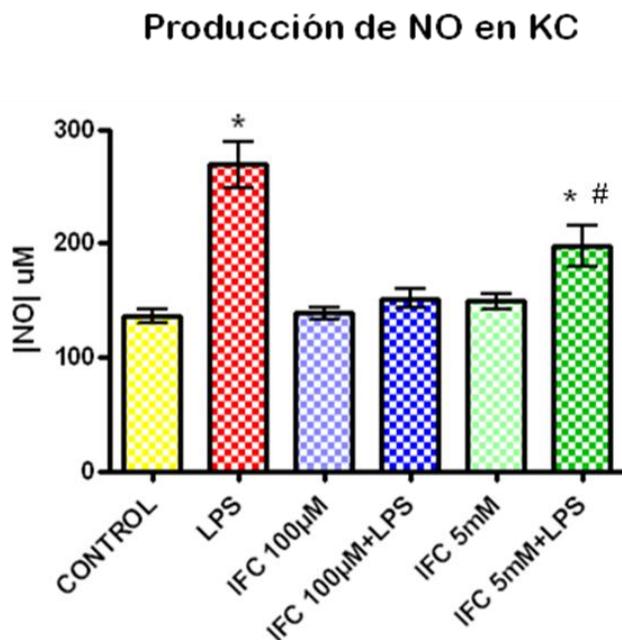
Citotoxicidad del IFC-305 + LPS en KC con LDH



Graf. 3. Efecto del fármaco IFC-305 + LPS en la viabilidad de las células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h. Determinación mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes. Los valores corresponden al promedio del porcentaje \pm DEM con una $n=4$, * $p < 0.001$ respecto al Tritón.

Detección de Oxido Nítrico

Como ya se ha mencionado el LPS induce la producción de NO por la activación de la iNOS [18]. La **Graf. 4** muestra el incremento significativo en la concentración de NO por efecto del LPS, mientras que el IFC-305 por sí solo no aumenta esta producción con respecto al Control, a ambas concentraciones, también se observa que el IFC-305 [100 μ M] tiene un efecto inhibitorio cuando se adiciona al mismo tiempo con LPS, esta disminución es menor, pero no es significativa para IFC-305 [5 mM]+LPS con respecto al Control.



Graf. 4. Concentración de nitritos y nitratos en sobrenadantes (SN) de cultivo de células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h. Determinación mediante el ensayo de Griess. Los valores corresponden al promedio \pm DEM $n=7$, * $p \leq 0.001$ respecto al Control, # $p \leq 0.001$ respecto al LPS.

Detección de ERO

Se determinó el estrés oxidante en las KC mediante el ensayo con el compuesto DCFH-DA, que se ha sugerido como un buen indicador del estado general oxidante de la célula, el cual produce una fluorescencia verde en las células al ser oxidado por ERO (*Fig. 13*). En la **Graf.5** se muestra que la producción de ERO por KC al ser incubadas con LPS incrementa significativamente con respecto al Control, observándose que el IFC-305 por sí solo no aumenta esta producción, a ambas concentraciones [100 μ M, 5 mM], cuando el IFC-305 se adiciona al mismo tiempo con LPS (IFC-305+LPS) no incrementa la producción de ERO igualmente en ambas concentraciones.

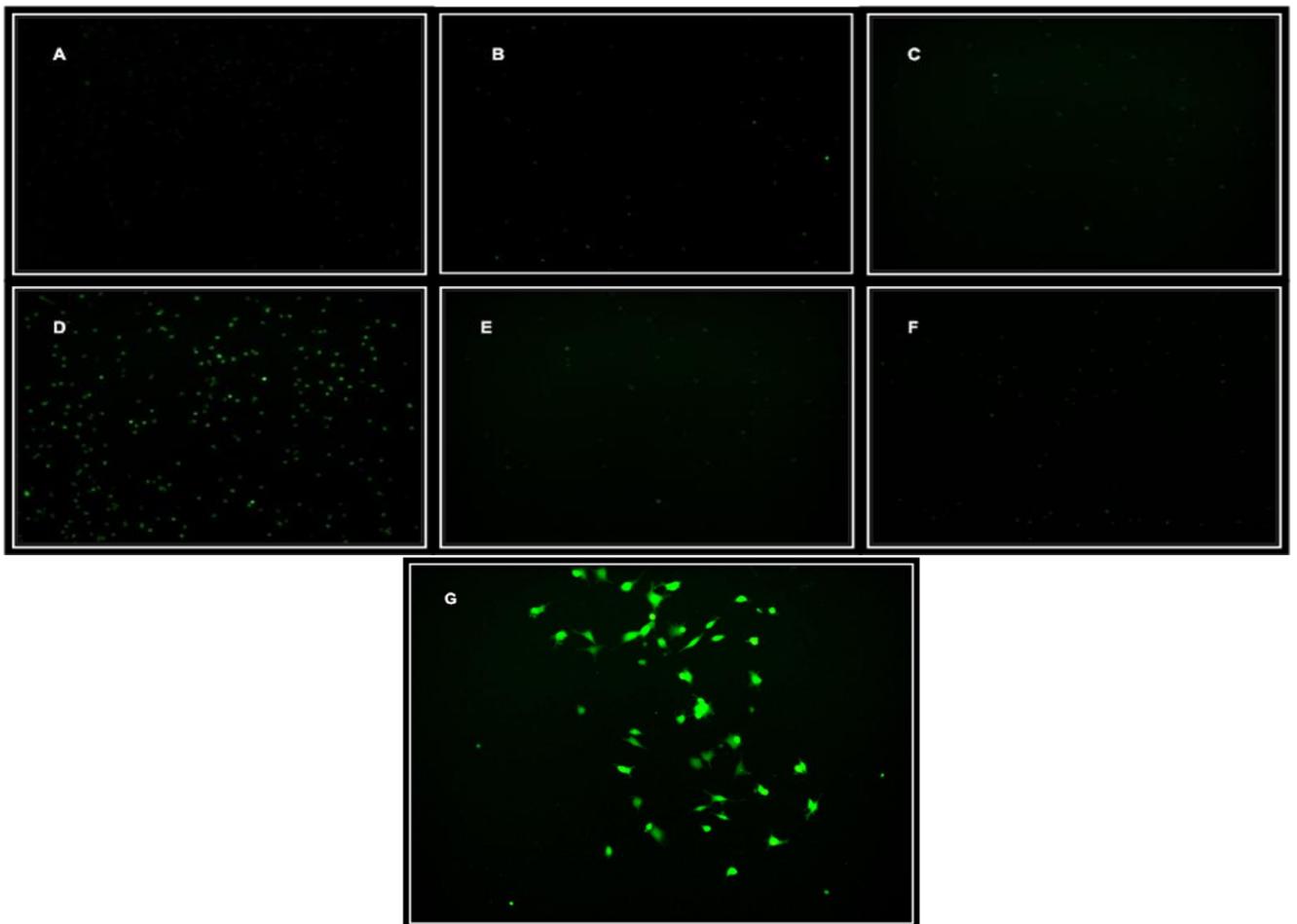
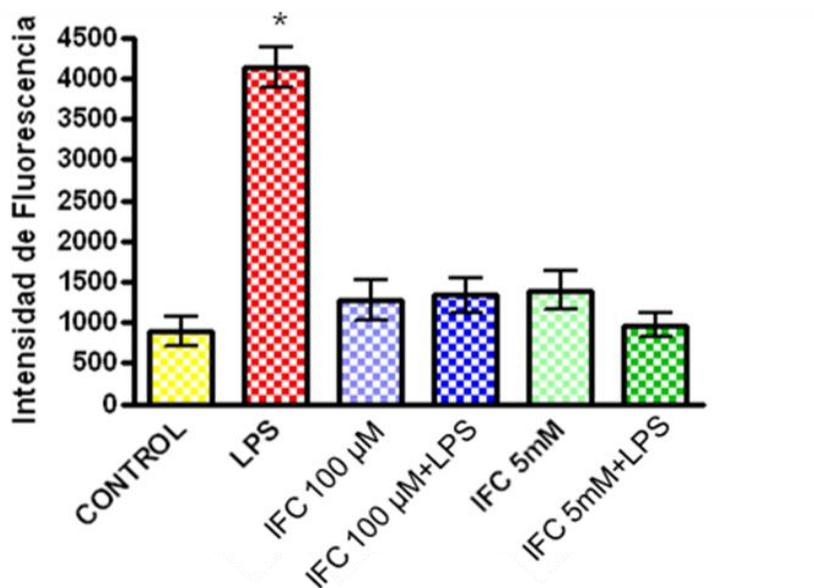


Fig.13. Micrografías de Fluorescencia en KC. Oxidación de DCFH-DA [20 μ M] por especies reactivas de oxígeno (ERO) en células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h de tratamiento. **A.** Control. **B.** IFC-305 [100 μ M]. **C.** IFC-305 [5 mM]. **D.** LPS [1 μ g/mL]. **E.** IFC-305 [100 μ M] +LPS. **F.** IFC-305 [5 mM] +LPS. **G.** LPS [1 μ g/mL]. (A-F. 10X, G. 20X).

Evaluación de ERO en KC

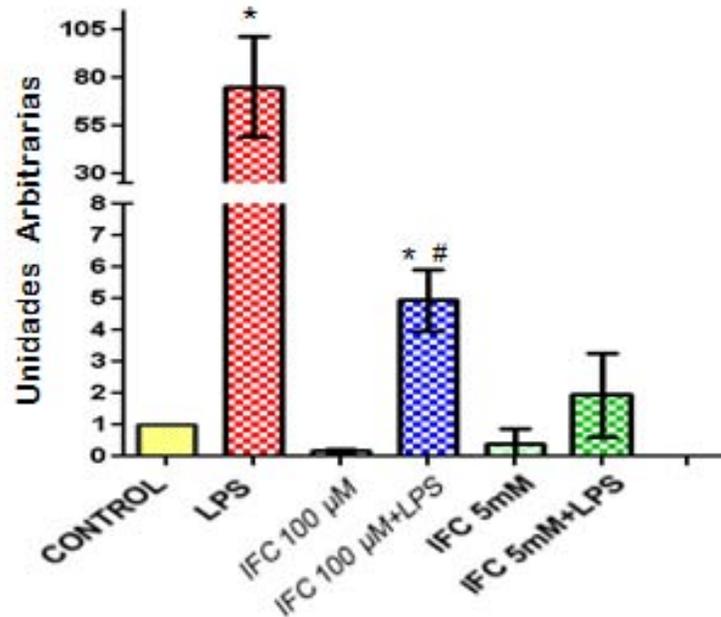


Graf. 5. Oxidación de DCFH por Especies reactivas de oxígeno (ERO) en células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h de tratamiento. Determinación por microscopía. Los valores corresponden al promedio \pm DEM n=4, * p < 0.001 respecto al control

Detección de proteínas

Se evaluaron los niveles de la enzima iNOS y de la subunidad p22^{phox} del complejo enzimático NADPH-oxidasa, mediante el ensayo de Western blot. La **Graf.6** muestra el incremento significativo en los niveles de iNOS por efecto del LPS, mientras que el IFC-305 por sí solo no aumenta esta expresión con respecto al Control, a ambas concentraciones, también se observa que el IFC-305 [5 mM] tiene un efecto inhibitorio cuando se adiciona al mismo tiempo con LPS (IFC-305 [5 mM]+LPS), esta disminución es menor, pero no es significativa para IFC-305 [100 µM]+LPS con respecto al Control.

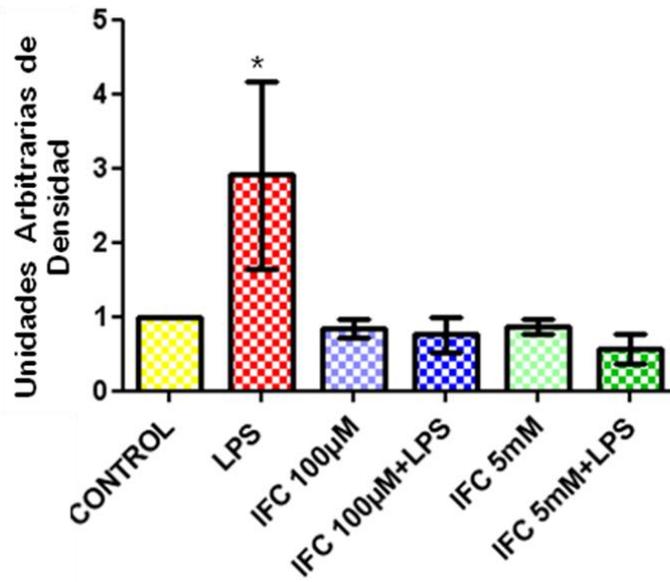
Evaluación de iNOS en KC



Graf. 6. Cuantificación de los niveles de la enzima iNOS en cultivo de células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h. Determinación mediante el ensayo de Western blot. Los valores corresponden al promedio \pm DEM $n < 3$, * $p \leq 0.001$ respecto al Control, # $p \leq 0.001$ respecto al LPS.

Como ya se ha mencionado el complejo enzimático NADPH-oxidasa se ensambla para producir $O_2^{\cdot -}$ en respuesta a la activación con LPS, la subunidad $p22^{phox}$ es necesaria para que la oxidasa se active ya que forma parte de la región catalítica (flavocitocromo b558) [31]. En la **Graf.7** se observa que la proteína $p22$ en KC al ser incubadas con LPS incrementa significativamente con respecto al Control, observándose que el IFC-305 por sí solo no aumenta esta producción, a ambas concentraciones [100 μ M, 5 mM], cuando el IFC-305 se adiciona al mismo tiempo con LPS (IFC-305+LPS) no incrementa los niveles de $p22$ igualmente en ambas concentraciones.

Evaluación de p22 en KC



Graf. 7. Evaluación de los niveles de la subunidad p22^{phox} del complejo enzimático NADPH-oxidasa en cultivo de células de Kupffer (KC) de hígado de rata a 48 h de tratamiento. Determinación mediante el ensayo de Western blot. Los valores corresponden al promedio \pm DEM $n < 3$, * $p \leq 0.001$ respecto al Control.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Varios métodos han sido descritos previamente para el aislamiento y purificación de las diferentes células sinusoidales del hígado, en particular el aislamiento de KC requiere equipos especializados y un número considerable de pasos, lo cual implica la inversión de muchas horas de trabajo en el laboratorio; para encontrar el protocolo ideal, los procedimientos se tienen que adecuar a las condiciones y necesidades de cada investigador.

La primera parte de este proyecto consistió en estandarizar el aislamiento de KC, se probaron tres distintos protocolos para el aislamiento: el método descrito por Valatas V. [49] emplea la técnica de elutriación y ésta se realiza fuera de la esterilidad, el cultivo es propenso a contaminación bacteriana y/o fúngica, además de tener un bajo rendimiento respecto al descrito [49]; por otra parte los métodos propuestos por Froh M. [48] y Pérez R. [comunicación personal] nos lleva a un cultivo contaminado con otras estirpes de CNP (*Tabla 1*).

Al probar estos protocolos nos percatamos que la principal dificultad que se presenta en la estandarización de la técnica es debido a que las densidades de las CNP son muy semejante entre sí, como anteriormente se ha reportado [49], lo cual conlleva a la contaminación del cultivo por otros tipos celulares. Cabe mencionar que los cultivos primarios provenientes del hígado son más propensos a contaminación por microorganismos debido a que este órgano se encuentra situado muy cerca de tracto gastrointestinal y la perfusión se realiza *in situ*, lo cual limita la disponibilidad de las células y por tanto la reproducibilidad.

Por lo anterior se montó un protocolo que combina diversas modificaciones de los métodos reportados anteriormente, el cual se adaptó a las necesidades del proyecto en cuestiones de pureza y de rendimiento. Las ventajas que presentan el aislamiento y cultivo de KC aquí reportado son:

- a) Un cultivo con menos contaminación bacteriana y/o fúngica.
- b) Un cultivo con menos contaminación de otras estirpes de CNP, con una pureza del 90%.

Una vez obtenido el cultivo fue importante el identificar la población y determinar la pureza de este para asegurar que los resultados sean efecto directamente producidos por macrófagos del hígado y no un efecto que pudiera ser enmascarado por otro tipo de células sinusoidales. La identificación de las KC se realiza habitualmente mediante la detección de la actividad peroxidasa endógena junto con la actividad fagocitaria mediante partículas de látex, oro coloidal o carbón. Sin embargo, estos criterios deben utilizarse con precaución ya que la técnica de peroxidasa es más fiable en tejido incluido en parafina, además en el hígado de rata y según el método de fijación las células endoteliales sinusoidales (CES) también pueden presentar una actividad peroxidasa, en ratón se ha observado que el 60% de las CES presentan actividad peroxidasa y pueden incorporar partículas de látex. Uno de los métodos más confiables para la identificación de las KC es quizá la inmunocitoquímica mediante el empleo de anticuerpos para marcadores específicos, para el caso del hígado de rata el anticuerpo ED-2 reconoce un antígeno de membrana específico de las KC. Existen otros anticuerpos capaces de detectar proteínas específicas de las KC en el hígado de rata tales como Ki-M2R, UFT-4, Ku-1 y anti-KCA-3 [2, 5]. Una vez identificadas; es necesario realizar pruebas de viabilidad con los tratamientos a probar, para que los resultados sean producto de una activación y no del número de células (*Fig.12*)

En la segunda parte del proyecto se evaluó en el cultivo el efecto de la dosis del fármaco IFC-305 en la viabilidad de las KC, observándose que a las concentraciones de [10 μ M, 500 μ M y 1 mM] la viabilidad disminuye, no así para [100 μ M y 5 mM] (*Graf.1*), esto pudiera ser explicado por qué cada uno de los 4 receptores de adenosina es sensible a diferentes concentraciones de dicha molécula, variando tanto la afinidad a estos receptores como su activación. En el laboratorio de la Dra. Chagoya se ha reportado que altas concentraciones de adenosina en el intervalo mM en cultivo primario de células estelares de hígado de rata, los receptores se saturan activando otro mecanismo de acción independiente a receptores, ejerciendo su efecto por transportadores, inhibiendo la activación de estas células [36], este mismo fenómeno pudiera estar sucediendo para las KC, habrá que profundizar en estos mecanismos.

En esta parte del proyecto también se determinó en el cultivo de KC el efecto del fármaco IFC-305 a las concentraciones [100 μ M y 5 mM] en la producción de NO (precursor de la cascada de ERN) y el estrés oxidante en respuesta a una activación clásica con LPS. Como ya se ha mencionado la producción de estos mediadores inflamatorios son esenciales para la eliminación de patógenos, sin embargo la sobreproducción de estas moléculas conlleva al desarrollo de una lesión hepática. Varios reportes indican que agentes tóxicos de exposición crónica como CCl_4 y etanol pueden inducir una respuesta inflamatoria desregulada, dando lugar a una lesión tisular grave [2, 9, 32, 57].

Por lo anterior es que este estudio adquiere relevancia dado que los resultados obtenidos muestran que el fármaco IFC-305 disminuye la producción de NO (**Graf.4**), el estrés oxidante (**Graf.5**) en las KC al ser estimuladas por LPS a 48 h de tratamiento, al tiempo que reduce los niveles de las enzimas que producen estas moléculas inflamatorias la iNOS (**Graf.6**) y la subunidad $\text{p}22^{\text{phox}}$ del complejo NADPH-oxidasa (**Graf.7**). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado en nuestro laboratorio en donde la M. en C. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca demostró en un modelo *in vivo* de cirrosis inducida con CCl_4 en rata, que el IFC-305 es capaz de modular el estado de activación de las KC de un fenotipo M1 (inflamatorio) a uno M2 (antiinflamatorio); en dicho estudio evaluó varias de las enzimas relacionadas con el equilibrio oxidante/antioxidante encontrando que el fármaco recupera el estado de oxido/reducción de las KC, además demostró que la arginasa I, enzima asociada directamente al fenotipo de activación M2, se encuentra aumentada en un mecanismo de reversión de la cirrosis [2],

La enzima arginasa I cobra mucha importancia porque está vinculada con la disminución de NO y la antiinflamación (macrófagos M2), es una enzima exclusiva del hígado, requiere como sustrato a la arginina entrando en competencia con la iNOS por el sustrato, por lo que el hecho de que alguna de las dos se encuentre activa hará que la otra se inhiba [2, 13]. El encontrar una disminución de la iNOS (**Graf.6**) y de su producto NO (**Graf.4**) a causa del tratamiento con IFC-305 sugiere que la arginasa I se encuentra activa mediando la polarización de las KC.

Por otra parte es importante mencionar que para determinar la presencia de la NADPH-oxidasa se decidió evaluar a la subunidad p22^{phox}, dado que es una proteína limitante para la actividad de la enzima, recordando que la NADPH-oxidasa es un complejo enzimático multicomponente que comprende de seis proteínas (citosólicas y membranales), y sabiendo que la falta de alguna de las proteínas citosólicas la enzima puede ejercer su función, mientras que la proteína membranar p22^{phox} forma el heterodimero flavocitocromo b558 junto con gp91^{phox}, fundamental para la actividad catalítica.

Otro aspecto importante de mencionar es que el papel del NO en el sistema inmune es único, porque es una molécula mensajera no específica, puede señalar para activar una respuesta, a la vez que puede dañar tanto a patógenos como a las propias células [58]. Las KC son la principal fuente de NO durante el choque endotoxémico y se cree que la inhibición selectiva de esta estimulación puede tener futuras implicaciones terapéuticas. Los mecanismos por los cuales se regula la producción de NO son importantes en el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo y todavía deben aclararse [25].

La relevancia del presente estudio radica en fortalecer la investigación de la M. en C. Rebeca Pérez, quién describe el fármaco IFC-305 como un mediador de la inflamación y de la polarización de macrófagos (PATENTE UNAM MX/a/2013/005735). Abriendo nuevas perspectivas en el tratamiento para el daño hepático y otras patologías que involucran los procesos de inflamación crónica.

9. CONCLUSION

El fármaco IFC-305 en un cultivo primario de células de Kupffer aisladas de hígado de rata, a las concentraciones [100 μ M y 5 mM] es capaz de modular los mecanismos oxidante, nitrosante y citotóxico de las células en respuesta a una activación con LPS.

Durante la activación clásica con LPS las KC inician una respuesta inflamatoria llevando a la expresión de las enzimas iNOS y NADPH-oxidasa, promoviendo la producción de NO y O₂⁻ respectivamente, estas moléculas son las iniciadoras de la cascada de generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. El fármaco IFC-305 a las concentraciones [100 μ M y 5 mM] en un cultivo primario de KC aisladas de hígado de rata a 48 h de tratamiento es capaz de disminuir la producción de NO (ERN) y de ERO, cuando son activadas con LPS, evitando la formación de moléculas mucho más reactivas que pudieran llevar a un desequilibrio del sistema oxidante/antioxidante y al estrés nitrosante, al disminuir la producción de estas moléculas se impide el establecimiento de la inflamación crónica y por ende el daño al tejido, al tiempo que el fármaco tiende a inhibir los niveles de la enzima iNOS y de la subunidad p22^{phox} del complejo NADPH-oxidasa fagocítica, mientras que el IFC-305 por sí solo no estimula la expresión de estas enzimas.

Los resultados señalan que el fármaco IFC-305 tiene la capacidad de regular la activación de las células de Kupffer *in vitro* inhibiendo la producción ERO y ERN derivadas de enzimas como la iNOS y la NADPH-oxidasa, corroborando la hipótesis planteada.

Lo anterior apunta a que el IFC-305 podría estar mediando un fenómeno de activación de las KC de un fenotipo inflamatorio (M1) a uno antiinflamatorio (M2), lo cual abre las posibilidades de continuar con este estudio donde se tendrá que profundizar en las vías de señalización para determinar el mecanismo de acción del fármaco a este nivel.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar en las células de Kupffer otras enzimas relacionadas con el equilibrio oxidante/antioxidante como: superóxido dismutasa 1 (SOD1), glutatión peroxidasa (GSHP), catalasa y hemo-oxigenasa 1 (HO-1), para establecer si el fenómeno que estamos observando es un mecanismo antioxidante.
- Identificar las cascadas de señalización por las cuales el fármaco IFC-305 está ejerciendo su actividad en el equilibrio oxidante/antioxidante.
- Caracterizar la polarización del fenotipo M1-M2 evaluando citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , INF- γ .

11. REFERENCIAS

- [1] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 2008;8:958-69.
- [2] Pérez-Cabeza-de-Vaca R. Efecto del Hepatoprotector IFC-305 en las Células de Kupffer en un Modelo Experimental de Cirrosis Inducida por CCL₄. México, D.F. : Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM; 2012.
- [3] Regueiro J, Larrea CL. *Inmunología: biología y patología del sistema inmune*. 3° Ed. ed. Madrid, España 2008.
- [4] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews Immunology* 2011;11:723-37.
- [5] Claria J, Titos E. [Kupffer cell]. *Gastroenterología y hepatología* 2004;27:264-73.
- [6] Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MM, van Furth R. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *The Journal of experimental medicine* 1978;148:1-17.
- [7] Chagoya-de-Sánchez V, Suárez-Cuenca JA, Hernández-Muñoz R. Investigación y Desarrollo de un Fármaco para el Tratamiento de la Cirrosis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 2005;2:106-14
- [8] Dufour JF, Clavien PA. *Signaling Pathways in Liver Diseases* 2° ed: Springer; 2010.
- [9] Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 2006;12:7413-20.
- [10] McCuskey RS, McCuskey PA. Fine structure and function of Kupffer cells. *Journal of electron microscopy* 1990;14:237-46.
- [11] Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2006;26:1175-86.
- [12] Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *European journal of biochemistry / FEBS* 1990;192:245-61.
- [13] Laskin DL. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chemical research in toxicology* 2009;22:1376-85.
- [14] Chabalgoity J, Pereira M, Rial A. Inmunidad contra los agentes infecciosos. In: Universidad de la República de Montevideo FdM, editor. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2° edition ed. Uruguay 2006. p. 99-110.
- [15] Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annual review of pharmacology and toxicology* 2011;51:267-88.
- [16] Hasko G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Frontiers in immunology* 2013;4:85.
- [17] Luckey SW, Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Experimental and molecular pathology* 2001;71:226-40.
- [18] Kolios G, Valatas V, Manousou P, Xidakis C, Notas G, Kouroumalis E. Nitric oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 2008;319:91-8.
- [19] Bohlson SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Frontiers in immunology* 2014;5:402.
- [20] Laskin JD, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity. *Antioxidants & redox signaling* 2001;3:261-71.

- [21] Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 2012;33:829-37, 37a-37d.
- [22] Zelnickova P, Matiasovic J, Pavlova B, Kudlackova H, Kovaru F, Faldyna M. Quantitative nitric oxide production by rat, bovine and porcine macrophages. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2008;19:36-41.
- [23] Tengan CH, Rodrigues GS, Godinho RO. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International journal of molecular sciences* 2012;13:17160-84.
- [24] MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* 1997;15:323-50.
- [25] Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* 1998;14:376-90.
- [26] Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 2004;113:427-37.
- [27] Carnovale CE, Ronco MT. Role of nitric oxide in liver regeneration. *Annals of hepatology* 2012;11:636-47.
- [28] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 2007;87:245-313.
- [29] El-Benna J, Dang PM, Perianin A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochemical pharmacology* 2010;80:778-85.
- [30] Garcia T, Saldaña B, Garcia Piñeiro JC, Bastarrechea Milian M. NADPH-oxidasa fagocítica: Componentes, ensamblaje y mecanismo de acción *Revista Cubana de Investigación Biomedica* 2001;20:59-63.
- [31] Babior BM. NADPH oxidase. *Current opinion in immunology* 2004;16:42-7.
- [32] Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, et al. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *The Journal of clinical investigation* 2000;106:867-72.
- [33] Altenhofer S, Kleikers PW, Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans JJ, Schiffers P, et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012;69:2327-43.
- [34] de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scandinavian journal of immunology* 2011;73:420-7.
- [35] Perez-Carreón JI, Martínez-Pérez L, Loredó ML, Yáñez-Maldonado L, Velasco-Loyden G, Vidrio-Gómez S, et al. An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl(4)-induced rat cirrhosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010;42:287-96.
- [36] Velasco-Loyden G, Perez-Carreón JI, Agüero JF, Romero PC, Vidrio-Gómez S, Martínez-Pérez L, et al. Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochemical pharmacology* 2010;80:1690-9.
- [37] Pilar CRMd. Modulación de la vía intrínseca de la apoptosis por efecto del derivado de adenosina IFC-305 en cultivos primarios de hepatocitos expuestos a tetracloruro de carbono. In: *Bioquímica SMd*, editor. XXVIII Congreso Nacional de Bioquímica Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México 2010.
- [38] Rodríguez-Aguilera JR. Modificaciones de la Regulación Epigenética por el Hepatoprotector IFC-305 en Cirrosis. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.
- [39] Chagoya de Sánchez V, Martínez-Pérez L, Hernández-Munoz R, Velasco-Loyden G. Recovery of the Cell Cycle Inhibition in CCl(4)-Induced Cirrhosis by the Adenosine Derivative IFC-305. *International journal of hepatology* 2012;2012:212530.

- [40] Hernandez-Munoz R, Glender W, Diaz Munoz M, Adolfo J, Garcia-Sainz JA, Chagoya de Sanchez V. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical pharmacology* 1984;33:2599-604.
- [41] Chagoya de Sanchez V, Hernandez-Munoz R, Yanez L, Vidrio S, Diaz-Munoz M. Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. *Journal of biochemical toxicology* 1995;10:41-50.
- [42] Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta biochimica Polonica* 2005;52:749-58.
- [43] Lazarowski ER, Schwarzbach PJ. Señales Purinérgicas *Medicina Buenos Aires* 2009;69:267-76.
- [44] Csoka B, Hasko G. Adenosine, inflammation pathways and therapeutic challenges. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 2011;78:4-6.
- [45] Titos E, Planaguma A, Lopez-Parra M, Villamor N, Miquel R, Jimenez W, et al. 5-Lipoxygenase (5-LO) is Involved in Kupffer Cell Survival. Possible Role of 5-LO Products in the Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Comparative hepatology* 2004;3 Suppl 1:S19.
- [46] van der Bij GJ, Oosterling SJ, Meijer S, Beelen RH, van Egmond M. Therapeutic potential of Kupffer cells in prevention of liver metastases outgrowth. *Immunobiology* 2005;210:259-65.
- [47] Mirodzhov GK, Pavlov VL. [Liver sinusoidal cells: nature, functional characteristics, and cooperative relationships]. *Arkhiv patologii* 1991;53:72-6.
- [48] Froh M. KA, Thurman R.G. . Isolation of Liver Kupffer Cells. *Current Protocols in Toxicology* 2002;14.4.1-4.2
- [49] Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, Kolios G, Kouroumalis EA. Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell biology international* 2003;27:67-73.
- [50] Smedsrod B, Pertoft H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. *Journal of leukocyte biology* 1985;38:213-30.
- [51] Rebeca PCdV. Influencia de los sustituyentes periféricos de Fenantrolina de las casiopeínas y las modificaciones que producen en los efectos apoptóticos y citotóxicos en 3 líneas celulares. México, D.F.: UNAM; 2009.
- [52] Voigt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in molecular medicine* 2005;110:39-48.
- [53] Escobar L, Alfonso P, Aristizábal F. Assessing two staining methods for cytotoxicity test on tumor cell lines. *Rev Colomb Biotecnol* 2009;XI.
- [54] Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2007;851:51-70.
- [55] Li W, Chan AC, Lau JY, Lee DW, Ng EK, Sung JJ, et al. Superoxide and nitric oxide production by Kupffer cells in rats with obstructive jaundice: effect of internal and external drainage. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2004;19:160-5.
- [56] Imrich A, Kobzik L. Fluorescence-based measurement of nitric oxide synthase activity in activated rat macrophages using dichlorofluorescein. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 1997;1:359-69.

- [57] Wheeler MD. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 2003;27:300-6.
- [58] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual review of biochemistry* 1994;63:175-95.